

## 出國報告 (出國類別：研究)

# 家禽精子新型態保存活用技術之產業應用

服務機關：行政院農業委員會畜產試驗所

姓名職稱：林秀蓮助理研究員

派赴國家：日本

出國期間：104年8月23日至104年9月21日

報告日期：104年11月21日

# 目 錄

	頁次
壹、摘要 -----	3
貳、目的 -----	5
參、過程 -----	7
肆、心得與建議-----	23
伍、附錄 -----	24

## 壹、摘要

目前用於長期保存種畜禽精液之方式，仍以添加抗凍保護劑後將生殖細胞凍存於液態氮中為主。然超低溫凍存之液態氮設備需耗費高成本維護其運作，而在跨國運輸時亦需克服高壓氣體空中運輸安全性及時效性等問題。因應前述問題尋求改善之道，本出國研習計畫規劃派遣畜產試驗所林秀蓮助理研究員，前往日本國立農業生物資源研究所及德島大學研習相關技術，包括精子冷凍乾燥、單一精子注射及體外系統生精作用等科技。本次研習行程有幸透過亞太糧肥中心 (FFTC) 副主任 Takashi Nagai 博士積極協助安排，使林助理研究員得以順利展開研習行程。

林助理研究員於本 (104) 年 8 月 23 日出發赴日，首先抵達國立農業生物資源研究所，在其研究人員 Dr. Thanh Quang Dang-Nguyen、Dr. Thi Men Nguyen、Dr. Shinya Ishihara 及 Dr. Elisa Sentos 指導協助下，學習精子冷凍乾燥及單一精子注射技術各項操作；隨後來到德島大學，在 Dr. Fuminori Tanihara 指導下研習豬胚體外培養技術，並與 Takeshige Otoi 教授進一步討論現今體外系統生精作用發展之趨勢，以及該項技術倘若欲於本所實驗室建立所需突破的困難點。研習行程之尾聲，則前往宮崎大學參加「第 108 回日本繁殖生物學會大會」，與來自日本全國各地之研究人員

討論最新動物生殖發育研發趨勢及科技等議題。

林助理研究員於9月21日返臺，旋即將其於日本研習所得之相關技術資訊與本所研究人員討論，並規劃相關試驗正進行中，期可早日突破關鍵盲點而建立研習之各項技術於本所實驗室，並重現日本實驗室所完成之數據結果。

## 貳、目的

目前種畜禽精液主要以添加抗凍保護劑後，將生殖細胞凍存於液態氮中，以作長途運送及長期保存。抗凍保護劑廣泛使用於保存各種動物之雄、雌配子及胚胎，然高濃度之抗凍保護劑具細胞毒性且造成滲透壓不平衡，而若於解凍後進行移除，則將對細胞造成二度傷害。此外，超低溫凍存之液態氮設備需耗費高成本維護，在跨國輸出時亦需考量運輸安全性及時效性等問題。因應此等問題，目前各國研究人員積極尋求可改善傳統方式缺點之新型式保存技術，包括不添加抗凍保護劑凍存 (Cryoprotectant-free)、真空低溫乾燥 (Lyophilization) 及冷凍乾燥 (Freeze-Drying) 等方式。真空低溫乾燥/冷凍乾燥乃利用水分子昇華/吸附原理，將溶劑移除而達到乾燥保存目的，最新研究成果指出，應用此技術乾燥後之精子，可長期貯存於 4°C 環境，且可於室溫下作短期運輸。

精子冷凍乾燥技術目前所遭遇的最大瓶頸，即乾燥後精子細胞膜及染色體雖完整，卻會失去泳動性，必須借助單一精子注射技術 (Intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 將精子送入卵子完成受精作用。此方法在哺乳類動物可行，卻無法在生殖系統更加複雜的鳥類進行，因而對於家禽精子的冷凍乾燥操作，必須尋求更多精子體外培養操作技術，用以解決目前所面臨的困境。

因此，本出國研習計畫之主要目的有二，其一為赴日本筑波市農業生物資源研究所及德島市德島大學，研習精子冷凍乾燥及體外系統生精作用科技。返國後將積極應用此相關技術於臺灣家禽產業，期將來於種畜禽保種上可發揮加乘之裨益；其二乃為加強臺日合作交流，期能建立長期國際合作團隊，以借助日本於畜牧產業及動物試驗研究之寶貴經驗，加速臺灣於相關領域發展之效率。

## 參、過程

### 一、研習行程

本次研習行程有幸透過亞太糧肥中心 (FFTC) 副主任 Takashi Nagai 博士協助安排下積極促成，得以前往日本相關研究單位研習。Takashi Nagai 博士為豬胚體外受精培養專家，其研究團隊於全球相關研究領域位居領先地位。於其團隊中，服務於日本農業生物資源研究所的 Kazuhiro Kikuchi 博士及德島大學的 Takeshige Otoi 教授在精子冷凍乾燥、單一精子注射科技及體外系統生精作用之相關研究有卓越的學術成果。

本次研習行程 (表 1) 規劃至日本國立農業生物資源研究所及德島大學研習相關技術，包括精子冷凍乾燥、單一精子注射科技 (指導人員：Dr. Thanh Quang Dang-Nguyen、Dr. Thi Men Nguyen、Dr. Shinya Ishihara 及 Dr. Elisa Sentos) 及體外系統生精作用 (指導人員：Dr. Fuminori Tanihara)，並於返國前參加於日本宮崎市所舉辦的「第 108 回日本繁殖生物學會大會」討論最新動物生殖發育研發趨勢及科技議題。

### 二、研習重點

- (一) 國立農業生物資源研究所 (National Institute of Agrobiological Sciences, NIAS)

## 1. 精子冷凍乾燥科技

目前用於長期保存種畜禽精液之方式，仍以添加抗凍保護劑後將生殖細胞凍存於液態氮中進行。然超低溫凍存之液態氮設備需耗費高成本維護其運作，而在跨國運輸時亦需克服高壓氣體空中運輸安全性及時效性等問題。因應前述問題，目前各國研究人員積極尋求可改善傳統方式之新型式保存技術，包括真空低溫乾

表 1. 林秀蓮赴日研習行程

Date 日期	City 城市	Location 參訪單位	Study Course 研習內容
8/23	去程：臺灣（桃園國際機場）→ 日本（東京成田機場）		
8/24-9/6	Tsukuba 筑波市	National Institute of Agrobiological Sciences 國立農業生物資源 研究所	精子冷凍乾燥科技 單一精子注射科技
9/7-9/15	Tokushima 德島市	Tokushima University 德島大學	體外系統精子形成作用 科技
9/16-9/20	Miyazaki 宮崎市	Miyazaki University 宮崎大學	最新動物生殖發育研發 議題趨勢及科技
9/21	回程：日本（宮崎機場）→ 臺灣（桃園國際機場）		



燥 (Lyophilization) 及冷凍乾燥 (Freeze-Drying) 等方式。真空低溫乾燥/冷凍乾燥乃利用水分子昇華/吸附原理，將溶劑移除而達到乾燥保存之目的。最新研究成果指出，應用此技術乾燥後之精子，可長期貯存於 4°C 環境，且可於室溫下作短期運輸。此次前往 NIAS 研習精子冷凍乾燥科技，是由 Dr. Thi Men Nguyen 進行指導，她於 2013 年已將豬冷凍乾燥精液透過單一精子注射方式，成功產製豬胚（成功率 12.6%），其成果發表於國際期刊 Theriogenology 80 (2013) 1033-1044。試驗流程如下：

(1) 精子冷凍乾燥培養液 (FD medium) 製備

Basic FD medium : 10 mM Tris-HCl buffer supplemented with 50 mM EGTA

Working medium : Basic FD medium was then supplemented with 15 mM trehalose and 40 mM NaCl

Osmolarity : adjust to 265~270 mOsm/kg

pH value : adjust to 8.0 to 8.5

(2) 精液處理流程：

① 採集精液離心 (10 mins/900xg/30°C)，移除上清液

② 加入 Working medium，調整精液濃度至  $4 \times 10^8$  cells/mL

③ 注入 1 mL 精液至 5 mL glass vial (圖 1)

④ 精液 vials 置入 -80°C 冰箱 4hrs 後，移入 FD system (圖 2)

- ⑤ FD system 壓力條件設定:0.13 hPa for 19 h→0.13 hPa for 3h
- ⑥ FD system 溫度設定:-30°C →30°C (final 1h20n, 0.75°C/min)
- ⑦ Liquid nitrogen flush 精液 vial 後，以 aluminum cap 封口
- ⑧ 將 FD 精液保存於 4°C 冰箱，以進行後續試驗



圖 1. 精子冷凍乾燥用冷凍小瓶



圖 2. 冷凍乾燥設備 (FTS system, DuraDry)

## 2. 單一精子注射科技

精子冷凍乾燥技術目前所遭遇最大瓶頸，即乾燥後精子細胞膜及染色體雖完整，卻會失去泳動性，因而必須藉助單一精子注

射技術 (ICSI) 將精子送入卵子完成受精作用。此部分除 ICSI 操作，有關豬卵體外成熟培養系統 (IVM 與 IVC) 及孤雌激活 (Parthenogenetic) 之效率，亦為關鍵技術必須建立。此部分研習乃由 Dr. Thanh Quang Dang-Nguyen、Dr. Shinya Ishihara 及 Dr. Elisa Sentos 進行指導 (各項技術 protocols 如附錄 1)。

(1) 豬卵體外成熟 (In vitro maturation, IVM)

- Get ovaries from the slaughterhouse and keep ovaries in warm water
- Use PBS to wash ovaries 3 times (without antibiotics)
- Remove blood from ovaries (cutting by scissors from the middle, tissue is without ethanol) (圖 3)
- Put ovaries in a 3.5cm dish and use surgery slide to cut the follicles on the ovaries to get the follicle fluid
- Transfer follicle fluid to a tube by a drop and then wait at least 5 mins
- Add 4mL M199 in a 10cm dish, and then take the bottom part from step6 and put into the M199 drop by drop
- Use mouth-glass pipette to pick out the oocytes
- Use IVM1 to wash oocytes for 3 times (2mL IVM1 per well)

- Use 4-well plate to culture oocytes in 39C for 22 hours (each well contains 500uL IVM1 and about 40~50 oocytes)



圖 3. 剪去卵巢上血管分佈，以減少濾泡液污染機率

## (2) 單一精子注射 (Intracytoplasmic sperm injection, ICSI)

### ① Preparation of injection/holding pipettes for ICSI (圖 4)

- Use machine FLAMING/BROWN MICROPIPETTE PULLER
- ICSI pipette 7~10 um: use microscope scale to check the size of the glass pipette, and then move it to the position just touch on the glass ball. Step on the paddle to heat the glass ball (about 80~90°C) to cut the glass pipette
- Holding pipette 20~30um in the middle: use microscope scale to check the size of the glass pipette, and then move it to the position upper to the glass ball. Step on the paddle to heat the glass ball (about 100°C) to wait the middle becomes 20~30um

- Bending holding pipette and injection pipette: put the pipette to the position upper to the glass ball, and step on the paddle to heat the glass ball (about 15~20 degrees)



圖 4. Preparation of injection/holding pipettes for ICSI

## ② ICSI

- Remove the cumulus cell from oocytes
- Sperm preparation (Washing cryoprotectants away)
  - ✓ sperm put into 1mL M199+PBS-BSA(50mg/mL) wash once
  - ✓ Centrifuge at 2000rpm for 2 mins
  - ✓ remove the supernatant and resolve in 1mL
  - ✓ Move sperm into IVC-PVP-HEPES medium, then keep at roomT
- Oocyte preparation

- ✓ 20uL M199 drops (for oocytes)
- ✓ 2 uL IVC-PVP-HEPES drops (for sperm and washing)
- ✓ Coverall drops with mineral oil
- ICSI processing (圖 5 及 6)
  - ✓ Take some sperm and transfer to one drop and mix a bit
  - ✓ Washing Injection pipette: take 1 cm Fluorinert FC-700 into the pipette and then push to the tip → spit out some Fluorinert FC-700 drops → take in some medium → spit out some medium → repeat 3 times
  - ✓ Take in some sperm (sperm's head part must be heading to the tip of the injection pipette)
  - ✓ Use PIEZO to penetrate the zona of the oocytes
  - ✓ Inject one sperm to each oocyte
  - ✓ Sperm-injected oocytes are recovered in IVC-PyrLac for 1 hr before electrical activation
  - ✓ After electrical activation, wash all oocytes for 3 times and then culture oocytes in IVC PyrLac.
- 建議可將精液 sonication 方便 ICSI 操作，但為了確保精子品質是好的，必須以 swim-up 技術篩選精子。

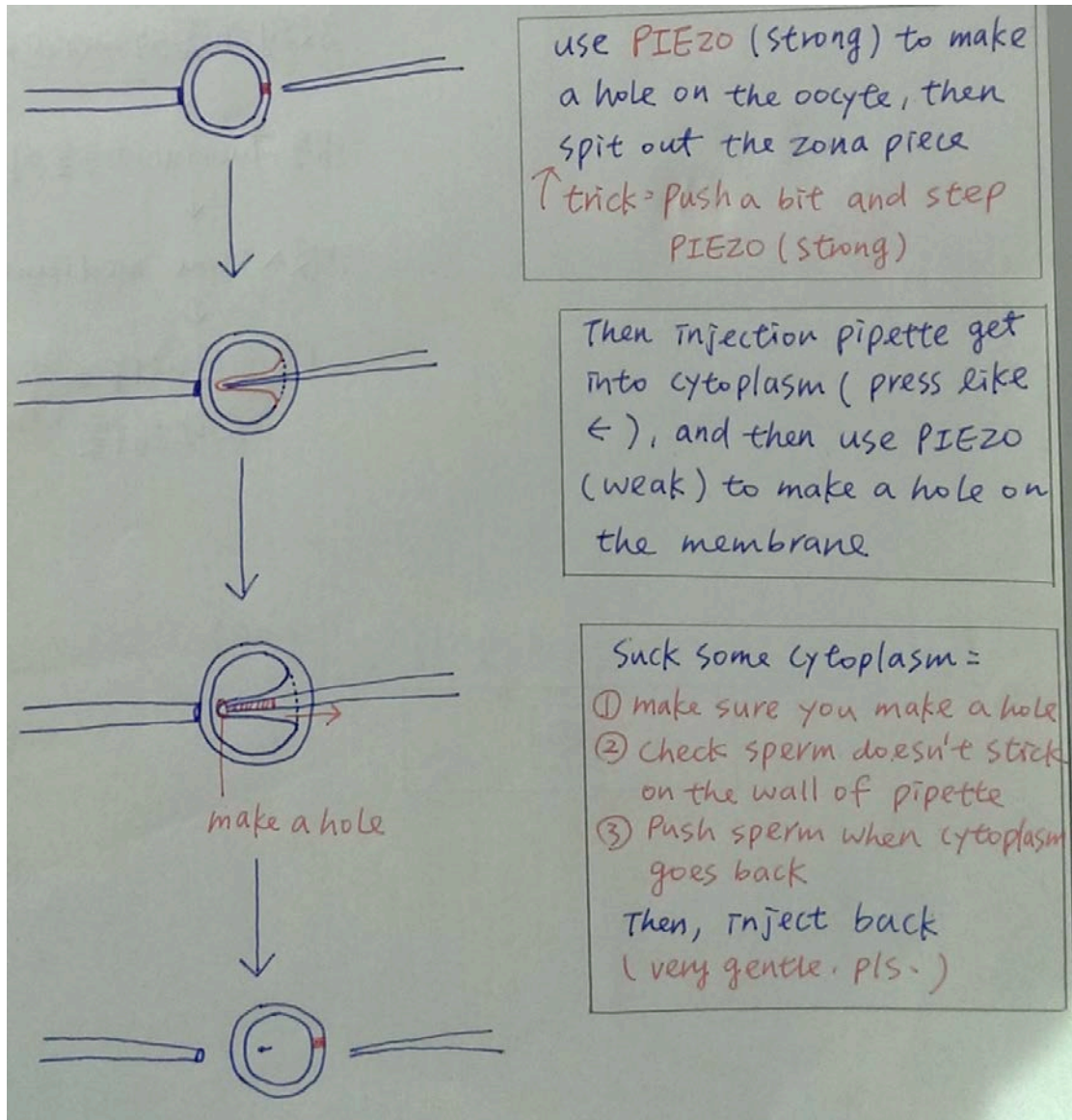


圖 5. ICSI 操作流程

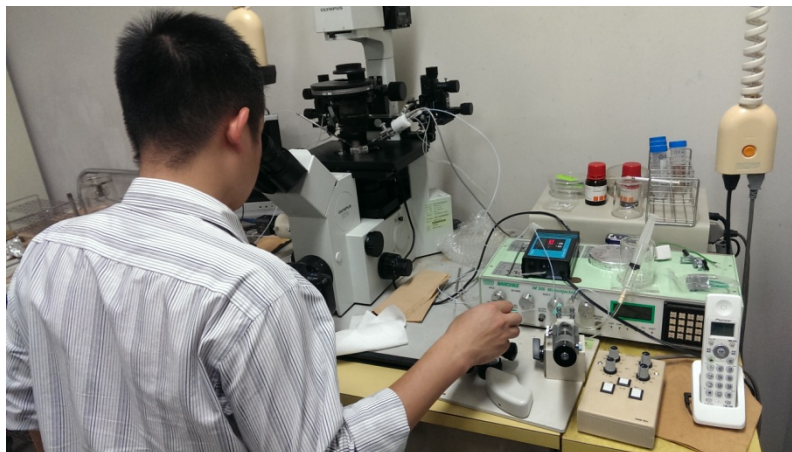


圖 6. Dr. Thanh Quang Dang-Nguyen 示範 ICSI 操作



(3) 孤雌激活 (Parthenogenetic) : 電激活 (圖 7)

- Check oocytes polar body: use mouth pipette to blow medium to roll oocytes to see different angles

- Preparation of activation (fusion) medium in 4-well dish

① 500uL M199 (well ①)

② 250uL M199+250uL fusion medium (well ②)

③ 500uL fusion medium (well ③)

Notice: Because fusion medium contains many sugars, which means it is high- osmotic, so oocytes need to be adapted gradually

- Take out oocytes, put them into well ① → then well ② → then well ③ (washing)
- Add some fusion medium in the middle of the electrodes
- Distribute the oocytes in the middle of the electrode
- Start to activate (Voltage=150) (圖 8)
- Finishing activation, transfer oocytes to well ③ → well ② → well ① (washing back)
- Transfer oocytes to IVC1 (containing cytochalasin) for 3hrs
- Transfer oocytes to IVC PyrLac for 2 days



- Transfer oocytes to IVC Gly for 4 days
- Check the cell numbers of blastocyst

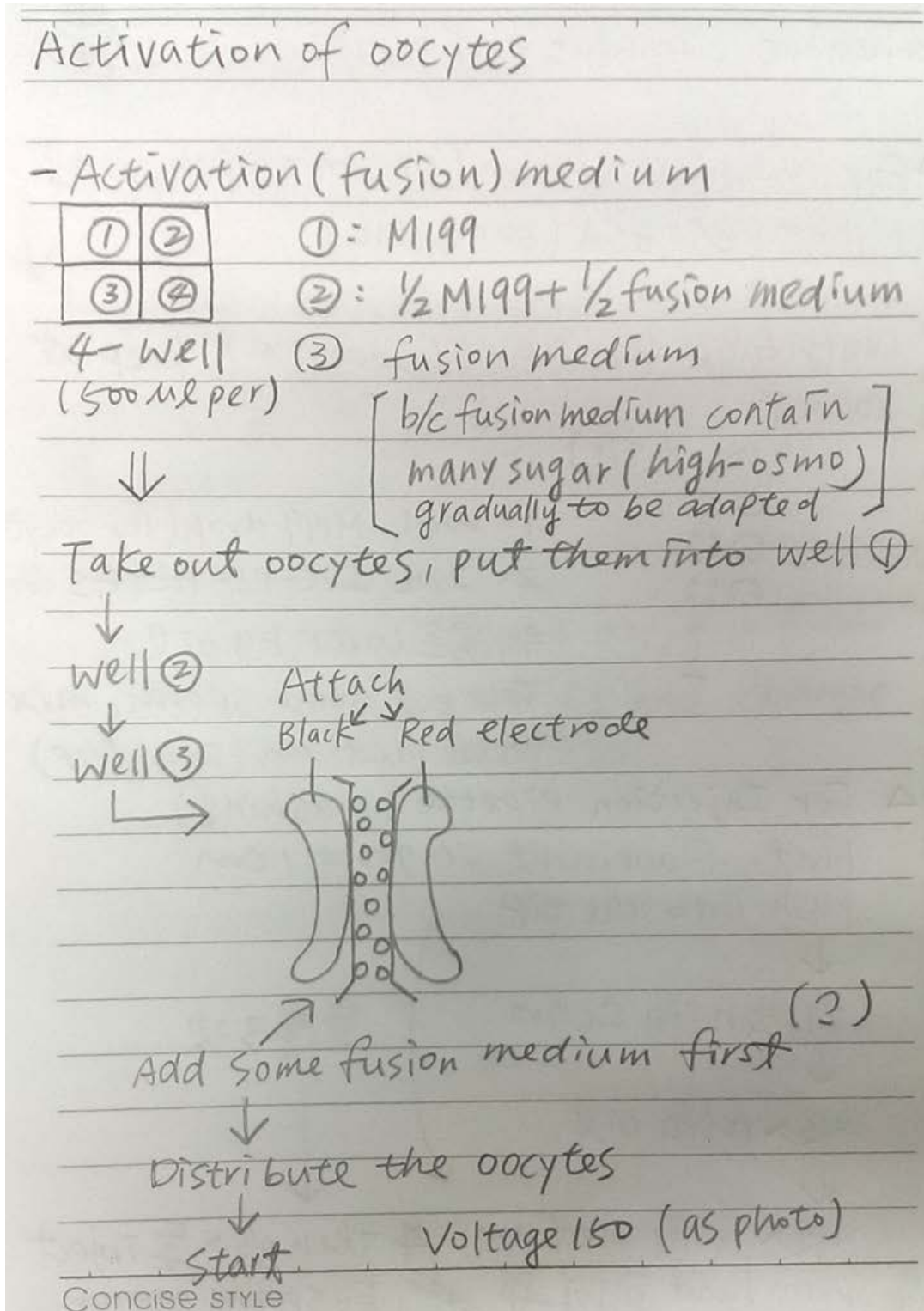


圖 7. Electrical activation of oocytes

(4) 螢光染色觀察 embryos 發育情形

- 可使用之螢光包括 Hoechst/PI/DAPI，本次使用 Hoechst33342
- Treat embryos with pronase for 5 mins (圖 8, pronase can remove zona to make embryos flat and clearer to see embryos are alive or dead)



圖 8. 豬胚以 pronase 移除透明帶 (zona)

- Treat embryos with Hoechst33342 for 10 mins
- Use PBS to wash embryos
- Take small glycerol drop in the middle of a slide, 將 embryos 置於其中 (放 embryos 進入 glycerol 時，盡量減少同時吸入的 medium 的量)，蓋上蓋玻片 (圖 9)
- 以螢光顯微鏡觀察，計算細胞數 (可下載 imagej for counting)
- 囊胚細胞數平均約為 55

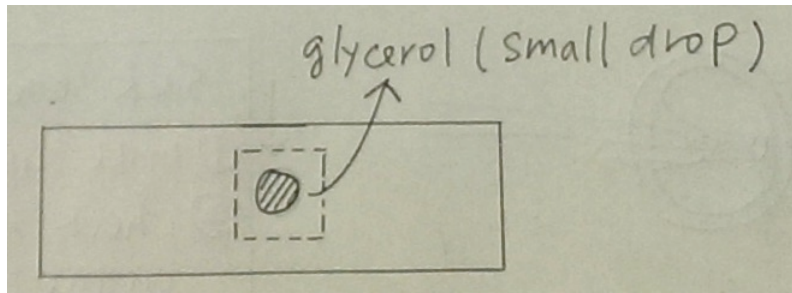


圖 9. 螢光染色隻豬胚置於甘油小滴中

## (二) 德島大學 (Tokushima University)：體外系統精子形成作用科技

精子經冷凍乾燥後，必須藉助單一精子注射技術 (ICSI) 將精子送入卵子以完成受精作用。此方法在哺乳類動物可行，卻無法在更加複雜的鳥類生殖系統中完成。因此，對於家禽精子的冷凍乾燥操作，必須尋求更多精子體外培養操作技術，用以解決所面臨的困境。

體外系統生精作用目前有二種培養模式被應用，包括 3D germ cell culture system 及 organ culture method。3D testicular cell culture (圖 10) ( J Veterinar Sci Technol (2012) 3:115) 為利用 collagen matrix gel 培養 testicular cells，目前有報告指出在此種模式之下，可成功分化出 spermatocytes；而 organ culture method (圖 11) ( Nature Protocols (2013) 8, 2098–2104) 則是利用 germ cell-free 小鼠所提供之 host testis，將 germ cells 與 feeder cells 共同培養於其中，此方法目前已可產生具功能性的精子。然 Otoi 教授指出，前述二種體外操作模式目前僅只應用於小鼠，其他物種是否可成功套用仍未知，尚待更多試驗加以驗證。

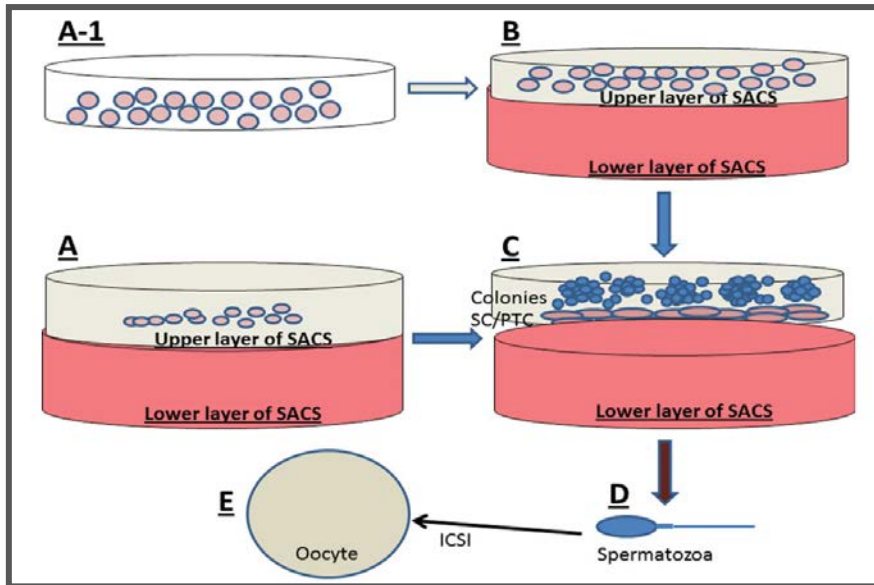


圖 10. 3D germ cell culture system  
(Journal of Veterinary Science & Technology (2012) 3:115)

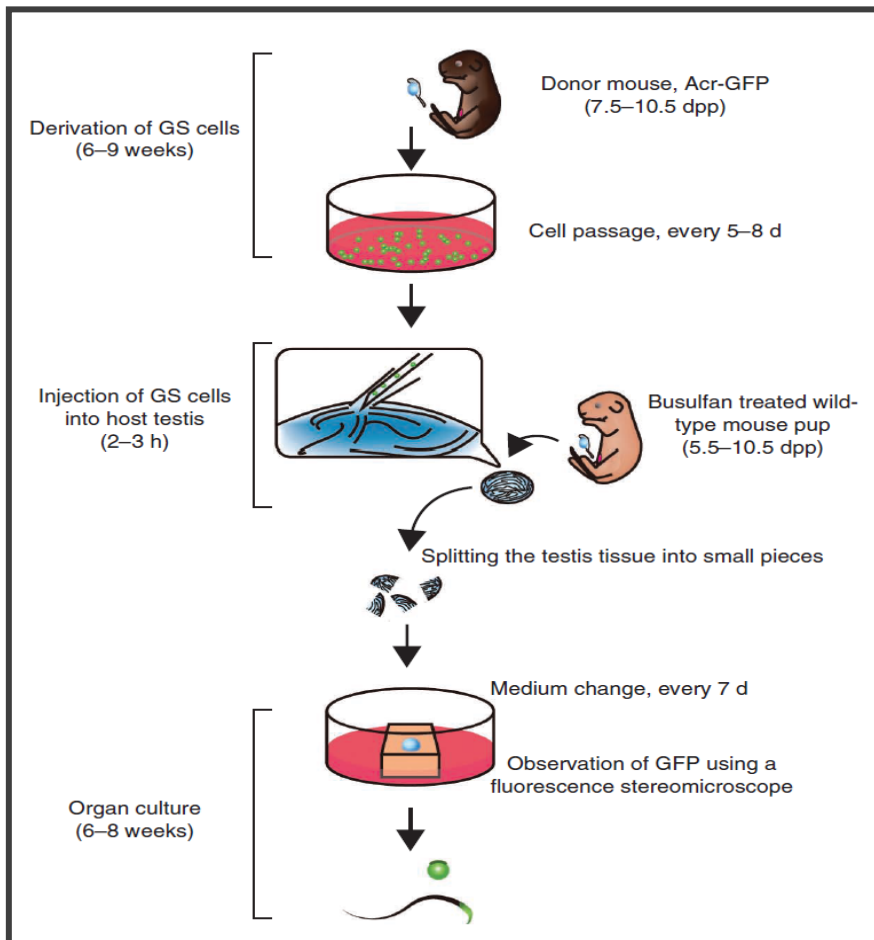


圖 10. Organ culture method for producing sperm  
(Nature Protocols (2013) 8, 2098-2104)

(三) 宮崎大學 (Miyazaki University)：最新動物生殖發育研發議題趨勢及科技

本次赴日研習之最後行程，於 9 月 16 日~20 日與 Takashi Nagai 博士、Kazuhiro Kikuchi 博士及 Takeshige Otoi 教授一同前往日本宮崎縣宮崎市之宮崎大學所舉行之第「108 回日本繁殖生物學會大會」(圖 11)。



圖 11. 第 108 回日本繁殖生物學會大會於宮崎大學舉行

為期 5 天的議程中 (附錄 2)，共包括論文口頭發表 70 篇及海報發表 109 篇 (圖 12)，區分為卵巢精子研究、生殖工學研究、內分泌研究、性週期妊娠研究及臨床應用研究等五大主題。比較特別的是，此大會除了研究人員發表論文以外，亦舉辦市民公開講座邀請各方專



家演講，包括有「體外生殖細胞形成研究最新概況」、「肉牛的繁殖飼養」及「Novel concepts of immune system for regulating early pregnancy: Attack or tolerance」等講題，提供有興趣之民眾參與討論。



圖 12. 日本繁殖生物學會大會論文海報發表區

#### 肆、心得與建議

- 一、本次研習行程得以成行，首先感謝行政院農業委員會國際農業科技政策及人才培育計畫支持提供研習相關經費；另外，特別感謝亞太糧肥中心副主任 Takashi Nagai 博士鼎力相助，負責聯繫日本研究團隊，積極促成此次研習計畫並協助規劃豐富完整的研習行程。
- 二、此次前往研習之研究單位，其實驗室團隊之研究方向脈絡清晰，研究人員分工架構完整各司其職，每位研究人員均擔任團隊主要研究計畫大架構之下的各項重要專業技術研究操作負責人。或許此種方式的分工，更能突顯及善用每位研究人員專長，用精湛的專業技術以最短時間完成試驗並得到期望結果。期研究成果產出豐碩，每年均有多篇國際期刊論文發表。
- 三、實驗室專業儀器均有專人操作，此種運作模式除可維持儀器正常運作並可降低因閒置期過長而導致故障機率，同時亦可節省其他研究人員於試驗前適應儀器之時間，使試驗更加準確並且有效率。
- 四、如能借助日本於畜牧產業及動物試驗研究之寶貴經驗，必能加速臺灣於相關領域發展之效率，故未來擬研提國際合作邀請專家訪臺計畫，期可加強及延續臺日合作交流，形成長期合作團隊。

—Full Paper—

## Defined System for *In Vitro* Production of Porcine Embryos Using a Single Basic Medium

Koji YOSHIOKA<sup>1)</sup>, Chie SUZUKI<sup>1)</sup> and Akira ONISHI<sup>2)</sup><sup>1)</sup>National Institute of Animal Health, Tsukuba 305-0856 and <sup>2)</sup>National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba 305-0901, Japan

**Abstract.** We have previously indicated that porcine blastocysts can be produced by *in vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC) in chemically defined porcine gamete medium (PGM) and porcine zygote medium (PZM)-5, respectively. In the present study, the effects of basic media and macromolecular components on *in vitro* maturation (IVM) were investigated to develop a defined system for *in vitro* embryo production using a single basic medium through IVM, IVF and IVC. Porcine immature oocytes were matured in porcine oocyte medium (POM) or modified North Carolina State University (mNCSU) 37, which were supplemented with either 10% (v/v) porcine follicular fluid (pFF) or 3 mg/ml polyvinyl alcohol (PVA) as a macromolecular component (designated POM+pFF, POM+PVA, mNCSU37+pFF and mNCSU37+PVA). In the maturation with mNCSU37+PVA, the percentages of oocytes that reached the metaphase II stages were significantly lower than those in the other treatments. Following IVM with the above media, oocytes were treated with an electrical stimulus and cycloheximide for parthenogenetic activation and were cultured in PZM-5 for 5 days. The rates of cleavage and blastocyst formation of parthenogenetic oocytes were significantly lowered for maturation with mNCSU37+PVA compared with the other treatments, while there were no significant differences in the total numbers of cells in blastocysts among the treatments. Following IVF and IVC, the rates of penetration, male pronucleus formation, cleavage and blastocyst formation were significantly lower when oocytes were matured in mNCSU37+PVA than in other maturation media. The normal fertilization rate was significantly higher in POM+PVA compared with the other treatments, although the total number of cells in blastocysts was reduced with the addition of PVA to both POM and mNCSU37 compared with pFF supplementation. These results demonstrate that porcine blastocysts can be produced by the defined system using a single basic medium.

**Key words:** Defined system, *In vitro* production (IVP), Maturation, Porcine embryo, Porcine zygote medium (PZM) (J. Reprod. Dev. 54: 208–213, 2008)

The establishment of an *in vitro* production (IVP) system for preimplantation embryos that can develop to full term after transfer will contribute to a better understanding of the physiology of embryonic development in early pregnancy and the control of animal reproduction, including embryo transfer, transgenesis and cloning [1]. Numerous studies have investigated the ability of porcine oocytes and embryos to develop *in vitro* using a wide variety of culture media [2–7]. Recently, we developed a chemically defined medium (porcine zygote medium: PZM) for *in vitro* culture (IVC) of porcine zygotes based on the composition of pig oviduct fluid [8]. Moreover, we established a chemically defined system for *in vitro* fertilization (IVF) of porcine *in vitro*-matured oocytes using porcine gamete medium (PGM), modified from PZM, as a basic medium [9], and the *in vivo* viability of blastocysts produced in the chemically defined IVF and IVC media has been confirmed after embryo transfer to recipients [9, 10].

The standard medium for *in vitro* maturation (IVM) of porcine oocytes is either North Carolina State University (NCSU) 23 or NCSU37 [3] with porcine follicular fluid supplementation. However, follicular fluid contains numerous undefined factors and may be contaminated with viral pathogens [11–13]. A chemically defined medium is not only useful for analyzing the physical action

of substances, such as inorganic compounds, energy substrates, hormones, cytokines and vitamins in the development of preimplantation embryos, but also for improving the reliability of media formulations and thereby yielding higher reproducibility of results. Moreover, application of the defined system for IVP of embryos may decrease the risk of viral contamination during IVP.

In standard IVP protocols, an embryo may be exposed to three discrete media during *in vitro* development due to the use of different medium for each phase of *in vitro* embryo production; namely, IVM, IVF and IVC. The effect of transferring the developing embryo between different culture environments is unknown, although the embryo may make efforts to adjust to changes in osmolarity, pH and/or substrate availability, possibly resulting in reduced developmental potential. The IVP system using a single medium throughout IVM, IVF and IVC may be easier to use and maintain compared with media employed in standard IVP systems. In cattle, oocytes can be matured, fertilized and cultured in a single basic medium; namely, modified synthetic oviductal fluid (mSOF) appropriately supplemented for specific stages of development [14].

The objective of the present study was to establish a defined system for IVP of porcine blastocysts. Moreover, we attempted to determine whether media based on the composition of porcine oviductal fluid could support IVP of porcine blastocysts through IVM, IVF and IVC.

Accepted for publication: March 14, 2008

Published online in J-STAGE: April 14, 2008

Correspondence: K. Yoshioka (e-mail: kojiyos@affrc.go.jp)



Table 1. Composition of culture media for *in vitro* production of porcine embryos

Component (mM)	POM (for IVM)	PGMtac4 (for IVF)	PZM-5 (for IVC)	PXM-Hepes (for air)
NaCl	108.00	108.00	108.00	108.00
KCl	10.00	10.00	10.00	10.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.35	0.35	0.35	0.35
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.40	0.40	0.40	0.40
NaHCO <sub>3</sub>	25.00	25.00	25.00	5.00
Hepes	—	—	—	25.00
Glucose	4.00	1.00	—	—
Na-pyruvate	0.20	0.20	0.20	0.20
Ca-(lactate) <sub>2</sub> · 5H <sub>2</sub> O	2.00	4.00	2.00	2.00
L-glutamine	2.00	—	2.00	—
Hypotaurine	5.00	—	5.00	—
BME amino acids (ml/l)	20.00	—	20.00	—
MEM non-essential amino acids (ml/l)	10.00	—	10.00	—
Theophylline	—	2.5	—	—
Adenosine (μM)	—	1.00	—	—
L-cysteine (μM)	600	0.25	—	—
Gentamicin (mg/ml)	0.01	0.01	0.01	0.01
Polyvinyl alcohol (mg/ml)	—	3.00	3.00	3.00
Osmolarity (mOsm)*	286 ± 1	280 ± 1	284 ± 1	268 ± 1

\*Mean ± SD. Each medium was prepared from the same stock solutions (100 mM NaHCO<sub>3</sub> and a mixture of 10-fold strengths of NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O), which were stored at 4 C in a refrigerator for several months. All media were adjusted to pH 7.3.

## Materials and Methods

### Oocyte collection and IVM

Cumulus-oocytes complexes (COCs) were collected from the antral follicles of ovaries by a previously reported method [9]. After the COCs were washed twice with porcine X medium (PXM)-Hepes, only those with uniform ooplasm and a compact cumulus cell mass were selected for IVM and placed in groups of 15 into 100 μl droplets of each maturation medium. The formulations of PXM-Hepes, as well as other media based on the composition of PZM, are shown in Table 1. The porcine oocyte medium (POM) was modified PZM-5 supplemented with 5 mM glucose and 0.6 mM cysteine, which are known as stimulatory substances on porcine oocyte maturation [15, 16]. For IVM of immature oocytes, POM or modified NCSU (mNCSU) 37 [7] was used as the base IVM medium and was supplemented with either 10% (v/v) porcine follicular fluid (pFF) or 3 mg/ml polyvinyl alcohol (PVA) as a macromolecular component (designated POM+pFF, POM+PVA, mNCSU37+pFF and mNCSU37+PVA).

COCs were cultured for 20 h in each maturation medium supplemented with 10 IU/ml eCG (Peamex; Sankyo, Tokyo, Japan), hCG (Puberogen; Sankyo) and 1 mM dibutyryl cAMP and subsequently for 0–28 h in the same medium, but without the hormones and dibutyryl cAMP, at 39 C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>.

### IVF and oocyte activation

The culture procedures employed in IVF of oocytes following IVM were as described previously [9] with some modifications. For IVF, motile spermatozoa from the same batch of frozen semen were obtained by centrifugation (700 × g for 20 min) of frozen-

thawed semen on a 40%/80% Percoll (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK) gradient. The sperm pellet was resuspended with PGM supplemented with theophylline, adenosine and cysteine [9] with the concentration of Ca-(lactate)<sub>2</sub> · 5H<sub>2</sub>O adjusted from 2.5 to 4 mM (PGMtac4) and was then washed twice by centrifugation at 500 × g for 5 min. COCs at 44 h after IVM were coincubated for 8 h with spermatozoa at a concentration of 1 × 10<sup>6</sup> spermatozoa/ml in 100 μl droplets of PGMtac4. The incubation was carried out at 39 C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. Each droplet contained 15–20 COCs.

Some oocytes were activated by an electrical stimulus and cycloheximide (CHX) at 48 h after IVM. Briefly, oocytes were stripped of cumulus cells by vortexing in PXM-Hepes. Oocytes with the first polar body were placed in a fusion medium [17] and activated by a single DC pulse of 150 V/mm for 99 μsec. After electrical stimulation, the oocytes were cultured for 6 h in PZM-5 (Research Institute for the Functional Peptides, Yamagata, Japan) [18] supplemented with 5 μg/ml cytochalasin B and 10 μg/ml CHX.

### Embryo culture

After 8 h of coincubation with sperm, presumptive zygotes were stripped of cumulus cells by vortexing in PXM-Hepes. Presumptive zygotes after both IVF and electrical activation were washed three times with PZM-5 and then cultured in 50 μl PZM-5 in a Reproplate (Research Institute for the Functional Peptides) for 5 days at 39 C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>.

### Evaluation of nuclear maturation, activation and fertilization

Oocytes were mounted on a glass slide, fixed with 25% (v/v)

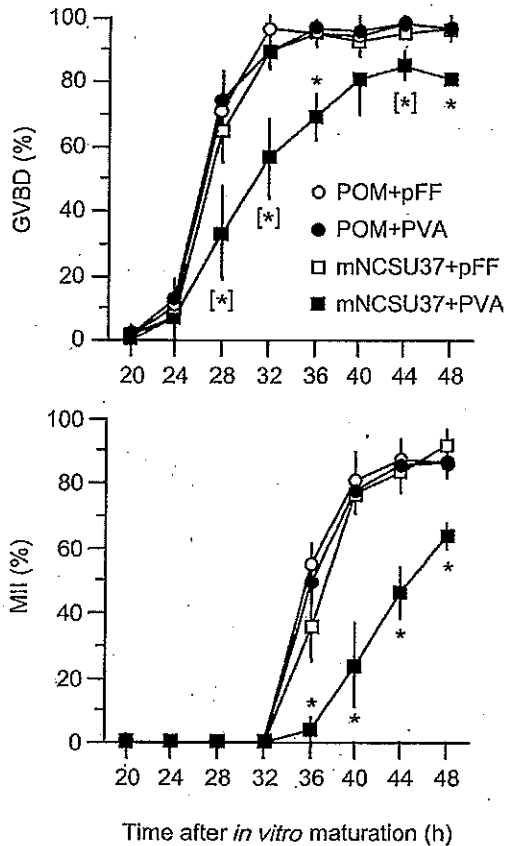


Fig. 1. Time course of porcine oocyte maturation in different basic media and macromolecules. The incidences of germinal vesicle breakdown (GVBD) and metaphase II (MII) were monitored from 20 h to 48 h after IVM. Data are presented as means  $\pm$  SD. Each group had four replicates and 51–58 COCs. Stars indicate significant differences from one or two ([\*]) or all others (\*;  $P < 0.05$ ).

acetic acid in ethanol for 24–48 h, stained with 1% (w/v) aceto-orcein and then examined under a phase-contrast microscope.

#### Evaluation of embryo development

The percentages of presumptive parthenotes and zygotes that had cleaved and developed to blastocysts were recorded on Days 2 and 5, respectively. The total cell number of blastocysts was assessed on Day 5 of culture using an air-drying method [9].

#### Experimental design

In Experiment 1, the time course of maturation in different IVM media and macromolecular components were examined. COCs were further cultured in either POM+pFF, POM+PVA, mNCSU37+pFF or mNCSU37+PVA for 0–28 h following cultivation in each medium supplemented with hormones and dbcAMP for 20 h. The meiotic progress of the oocytes was examined at 4 h intervals for 28 h from 20 to 48 h after the onset of maturation culture.

The objective of Experiment 2 was to determine the effects of different IVM media and macromolecular components during IVM on oocyte activation and subsequent embryo development without any effects of fertilization, such as polyspermic penetration and timing of sperm penetration. After COCs were cultured for maturation for a total of 48 h, as described in Experiment 1, denuded oocytes were activated by an electrical stimulus and cultured in CHX for 6 h. After activation, some oocytes were fixed for evaluation of meiotic progress and pronucleus formation, while the remaining oocytes were cultured in PZM-5 for 5 days.

Experiment 3 was conducted to determine the effects of different IVM media and macromolecular components during IVM on fertilization and subsequent embryo development. After COCs were cultured for maturation for a total of 44 h, as described in Experiment 1, COCs were coincubated with spermatozoa in PGMtac4 for 8 h. After IVF, some oocytes were fixed for evaluation of fertilization, while the remaining oocytes were cultured in PZM-5 for 5 days.

#### Statistical analysis

Data analyses were carried out by general linear model procedures and Tukey's HSD using the Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary, NC, USA). All percentage data and total numbers of cells in blastocysts were subjected to arcsine and logarithmic transformation, respectively. A probability of  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## Results

#### Effect of basic media and macromolecules on the kinetics of oocyte maturation

In the maturation with mNCSU37+PVA, the percentages of oocytes that showed germinal vesicle breakdown (GVBD) were significantly lower ( $P < 0.05$ ) than those in other treatments (Fig. 1) at 36 and 48 h after the onset of IVM. Moreover, the percentage of oocytes that reached the metaphase II (MII) stage from 36 to 48 h of maturation culture was significantly reduced ( $P < 0.05$ ) in mNCSU37+PVA compared with those of the other treatments. However, there were no significant differences in the percentages of GVBD and MII oocytes matured in POM+PVA, POM+pFF or mNCSU37+pFF.

#### Effects of basic media and macromolecules during IVM on oocyte activation and subsequent embryo development

The percentages of oocytes that were activated and formed two pronuclei did not differ among the treatments (Table 2). The rates of cleavage and blastocyst formation were significantly lowered ( $P < 0.05$ ) for maturation with mNCSU37+PVA compared with the other treatments (Table 3). However, there were no significant differences in the total numbers of cells in blastocysts among the treatments.

#### Effects of basic media and macromolecules during IVM on fertilization and subsequent embryo development

The rates of penetration and male pronucleus formation were significantly lower ( $P < 0.05$ ) when oocytes were matured in

**Table 2.** Activation of porcine oocytes matured *in vitro* with different media

Medium	No. of oocytes examined	Activated	No. (%) of oocytes PN-formed*	2 PN-formed*
POM+pFF	102	86 (84.8 ± 9.6)	81 (93.8 ± 10.0)	76 (87.5 ± 13.5)
POM+PVA	111	100 (91.0 ± 8.1)	99 (99.0 ± 2.4)	88 (88.1 ± 11.3)
mNCSU37+pFF	111	93 (85.6 ± 14.3)	91 (97.4 ± 6.3)	79 (84.3 ± 15.3)
mNCSU37+PVA	104	87 (86.2 ± 16.3)	82 (93.9 ± 10.4)	73 (83.5 ± 14.7)

Data from six replicates. Percentages are expressed as means ± SD. \*Calculated as a percentage of activated oocytes.

**Table 3.** *In vitro* development of porcine parthenogenic oocytes matured *in vitro* with different media

Medium	No. of parthenogenic oocytes cultured	Cleaved at Day 2 (%)	Blastocyst at Day 5 (%)	Total No. of cells in blastocysts (mean ± SD)
POM+pFF	162	126 (77.4 ± 11.8) <sup>a</sup>	73 (45.0 ± 9.4) <sup>a</sup>	46.1 ± 15.0
POM+PVA	159	136 (85.7 ± 7.1) <sup>a</sup>	77 (48.5 ± 4.4) <sup>a</sup>	41.4 ± 13.5
mNCSU37+pFF	162	138 (85.3 ± 8.4) <sup>a</sup>	65 (40.8 ± 15.8) <sup>a</sup>	41.2 ± 15.6
mNCSU37+PVA	154	87 (56.8 ± 10.9) <sup>b</sup>	34 (22.2 ± 6.4) <sup>b</sup>	38.2 ± 13.9

Data from six replicates. Percentages are expressed as means ± SD. <sup>a, b</sup>Values with different superscripts within each column are significantly different (P<0.05).

**Table 4.** *In vitro* fertilization of porcine oocytes matured *in vitro* with different media

Medium	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes					No. of sperm penetrated in a penetrated oocyte (mean ± SD)
		Matured	Penetrated	Normal*	Polyspermy*	MPN-formed*	
POM+pFF	135	130 (96.3 ± 3.8) <sup>a</sup>	118 (87.6 ± 10.3) <sup>a</sup>	53 (44.8 ± 10.6) <sup>a</sup>	65 (55.2 ± 10.6) <sup>a</sup>	118 (100.0 ± 0) <sup>a</sup>	1.8 ± 0.9 <sup>a</sup>
POM+PVA	123	113 (91.8 ± 6.7) <sup>a</sup>	92 (74.3 ± 12.8) <sup>a</sup>	67 (72.4 ± 10.2) <sup>b</sup>	19 (21.0 ± 8.0) <sup>b</sup>	86 (93.4 ± 5.7) <sup>b</sup>	1.2 ± 0.4 <sup>b</sup>
mNCSU37+pFF	137	135 (98.5 ± 2.5) <sup>a</sup>	120 (87.6 ± 9.6) <sup>a</sup>	54 (45.5 ± 12.4) <sup>a</sup>	63 (51.9 ± 13.3) <sup>a</sup>	117 (97.5 ± 4.5) <sup>ab</sup>	1.8 ± 1.0 <sup>a</sup>
mNCSU37+PVA	124	60 (47.1 ± 17.1) <sup>b</sup>	34 (26.8 ± 14.2) <sup>b</sup>	10 (35.5 ± 25.8) <sup>a</sup>	9 (28.3 ± 20.3) <sup>b</sup>	15 (53.3 ± 28.2) <sup>c</sup>	1.3 ± 0.5 <sup>b</sup>

Data from seven replicates. Percentages are expressed as means ± SD. \*Calculated as a percentage of penetrated oocytes. <sup>a, b, c</sup>Values with different superscripts within each column are significantly different (P<0.05).

mNCSU37+PVA than in other maturation media (Table 4). The normal fertilization rate was significantly higher (P<0.05) in POM+PVA compared with the other treatments. The proportion of zygotes that cleaved and developed to blastocysts was significantly lower (P<0.05) in mNCSU37+PVA than in the other media (Table 5). The addition of PVA to both POM and mNCSU37 significantly reduced (P<0.05) the total number of cells in blastocysts compared with pFF supplementation.

### Discussion

The present study clearly demonstrates that porcine oocytes can be matured, fertilized and cultured in media based on the composition of porcine oviductal fluid and appropriately supplemented for specific stages of development. Moreover, porcine blastocysts can be produced in the defined IVP system, which consists of POM+PVA, PGMtac4 and PZM-5 for IVM, IVF and IVC, respec-

tively, as well as in the standard IVP system performed in IVM with pFF-containing media.

When POM+pFF was used for oocyte maturation, all results from the present study, including rates of maturation, fertilization, cleavage and blastocyst formation, as well as total numbers of cells in blastocysts, were similar to those obtained using mNCSU37+pFF, which is one of the standard maturation media for porcine oocytes [3, 7]. Thus, the single medium we developed based on the composition of porcine oviductal fluid can be used for IVP of porcine blastocysts as an alternative to discrete media for each phase of IVM, IVF and IVC. This method provides several advantages. Since the media used in this study (POM, PGMtac4, PZM-5, and PXM-Hepes) were prepared from the same basic stock solutions, which can be prepared and kept at refrigerator temperature (approximately 4 °C) for several months, less time is spent on medium preparation. In addition, the use of stock solutions lends itself very well to experimental work, as several variants of a

Table 5. *In vitro* development of porcine oocytes matured *in vitro* with different media after *in vitro* fertilization

Medium	No. of presumptive zygotes cultured	Cleaved at Day 2 (%)	Blastocyst at Day 5 (%)	Total No. of cells in blastocysts (mean $\pm$ SD)
POM+pFF	189	152 (80.3 $\pm$ 4.8) <sup>a</sup>	78 (38.4 $\pm$ 7.8) <sup>a</sup>	52.0 $\pm$ 18.8 <sup>a</sup>
POM+PVA	178	135 (75.7 $\pm$ 10.0) <sup>a</sup>	58 (33.4 $\pm$ 12.1) <sup>a</sup>	39.4 $\pm$ 21.9 <sup>b</sup>
mNCSU37+pFF	192	141 (73.5 $\pm$ 7.6) <sup>a</sup>	79 (41.3 $\pm$ 10.0) <sup>a</sup>	47.5 $\pm$ 16.6 <sup>a</sup>
mNCSU37+PVA	178	56 (30.5 $\pm$ 16.7) <sup>b</sup>	12 (6.5 $\pm$ 5.9) <sup>b</sup>	31.8 $\pm$ 18.0 <sup>b</sup>

Data from seven replicates. Percentages are expressed as means  $\pm$  SD. <sup>a,b</sup>Values with different superscripts within each column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

medium can be compared simultaneously with minimal variation [14].

It has been reported that addition of pFF to maturation medium enhances the cytoplasmic maturation of porcine oocytes as measured by male pronucleus formation after IVF [19] and blastocyst formation rate [20]. However, pFF can be replaced by PVA to produce a chemically defined medium, such as modified TCM199 [21] and mNCSU23 [22]. In the present study, immature oocytes developed to blastocyst stage embryos using the defined IVP system for embryos when pFF was replaced by PVA in both POM and mNCSU37 for IVM. Generally, pFF contains various unknown factors that have not only growth stimulatory effects but also detrimental effects. The effects of pFF, therefore, vary greatly from batch to batch, leading to unpredictable results. Application of the defined system to IVP of embryos is considered important to address the exact effects of any supplement of interest in the medium on oocyte maturation, fertilization or embryo development by eliminating these unknown factors from medium preparation [23].

The maturation rate and meiotic progression of oocytes in POM+PVA were similar to those in POM or mNCSU37 containing pFF, while they declined in mNCSU37+PVA. The reason why POM as a basal medium did not reduce maturation ability under the chemically defined conditions is unclear. POM contains a total of 22 amino acids (glutamine, hypotaurine, cysteine, 12 basal medium Eagle [BME] essential amino acids and seven minimum essential medium [MEM] nonessential amino acids), whereas the only amino acid components of mNCSU37 are glutamine and cysteine. Amino acids in a protein-free medium may play important roles, including as osmolytes [24–26], intracellular buffers [27, 28], heavy metal chelators [29] and energy substrates [29, 30]. The beneficial effects of essential and/or nonessential amino acids in chemically defined mNCSU23 medium on porcine oocyte maturation have also been reported [22].

A variety of processes occurring within the oocyte cytoplasm independently of nuclear maturation during meiosis, referred to as cytoplasmic maturation, are required for complete developmental competence following fertilization [31–33]. Oocytes matured in mNCSU37+PVA showed lowered rates of cleavage and blastocyst formation after activation by an electrical stimulus and culture in CHX compared with the other groups. Maturation age of porcine oocytes affects the potential of subsequent embryo development. In pigs, newly matured oocytes showed lower developmental competence after IVF [34] or parthenogenetic activation [35] compared

with oocytes cultured for an additional 8–10 h. This might be due to inadequate cytoplasmic maturation and/or immaturity of the metaphase spindle of MII stage oocytes immediately after MII-arrest [36]. The time at which the oocytes reached the MII stage in mNCSU37+PVA was delayed compared with the other maturation media (Fig. 1). On the other hand, the percentages of oocytes that formed two pronuclei did not differ among the treatments after parthenogenetic activation when only oocytes having a polar body were selected before activation in the present study. Thus, mNCSU37+PVA seems to be inferior to the other media in terms of ability to induce complete nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes.

The reduced penetration rate of oocytes matured in mNCSU37+PVA may result in decreased numbers of oocytes reaching the MII stages during *in vitro* insemination. On the other hand, porcine oocytes matured in POM+PVA were found to be equally penetrable compared with oocytes matured in the presence of pFF in the present study. This result is similar to that obtained in a previous study in which porcine oocytes matured in protein-free TCM199 or protein-free Waymouth medium did not reduce sperm penetration [21]. In contrast, the frequency of occurrence of polyspermy and the number of sperm that penetrated an oocyte decreased when pFF was replaced by PVA in both IVM media. In porcine IVF, the high incidence of polyspermic penetration is a major obstacle to the production of normal porcine embryos *in vitro* [37]. Polyspermic penetration *in vitro* has been considered to be due to delayed or incomplete cortical granule exocytosis and/or zona reaction resulting from inadequate IVM of oocytes as well as simultaneous sperm penetration by a number of spermatozoa with a reacted acrosome [37–40]. Different types of macromolecules added to maturation media, such as PVA and pFF, may affect the polyspermy blocking function. Therefore, different types of macromolecules added to such maturation media might influence the status of cortical granule exocytosis and/or zona reaction during IVF. Further histological and biochemical analyses of fertilized oocytes are required in order to understand the mechanism of polyspermy in the porcine embryo IVP system.

In conclusion, the present study describes successful IVP of porcine blastocysts in a defined system using a single basic medium. The use of a defined IVP system yields higher reproducibility of results and ensures the biosafety of culture media by eliminating protein preparations, which may be contaminated with pathogens. Although the percentages of embryos that developed to blastocysts after IVF did not differ between POM+PVA and POM+pFF, the

total number of cells in blastocysts was reduced by the use of PVA in place of pFF. Since these indications of *in vitro* developmental competence for IVP embryos did not differ in the artificially activated oocytes matured in POM+PVA and POM+pFF, the reduced number of cells in blastocysts seems to be attributable to inadequacy closely related to fertilization. Further improvements of this porcine defined IVP system are therefore required to optimize embryonic growth and maximize the number of IVP embryos of high quality that can survive after embryo transfer.

### Acknowledgment

This research was supported by a grant from the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan.

### References

- Day BN. Reproductive biotechnologies: current status in porcine reproduction. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 161-172.
- Beckmann LS, Day BN. Effects of media NaCl concentration and osmolarity on the culture of early-stage porcine embryos and the viability of embryos cultured in a selected superior medium. *Theriogenology* 1993; 39: 611-622.
- Pettiers RM, Wells KD. Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil* 1993; (Suppl 48): 61-73.
- Pollard JW, Plante C, Leibo SP. Comparison of development of pig zygotes and embryos in simple and complex culture media. *J Reprod Fertil* 1995; 103: 331-337.
- Dobrinsky JE, Johnson LA, Rath D. Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. *Biol Reprod* 1996; 55: 1069-1074.
- Marchal R, Feugang JM, Ferreux C, Venturi E, Terqui M, Mermillod P. Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology* 2001; 56: 17-29.
- 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.
- Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IMK, Iwamura S. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod* 2002; 66: 112-119.
- Yoshioka K, Suzuki C, Itoh S, Kikuchi K, Iwamura S, Rodriguez-Martinez H. Production of piglets derived from *in vitro*-produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: effects of theophylline, adenosine, and cysteine during *in vitro* fertilization. *Biol Reprod* 2003; 69: 2092-2099.
- Suzuki C, Iwamura S, Yoshioka K. Birth of piglets through the non-surgical transfer of blastocysts produced *in vitro*. *J Reprod Dev* 2004; 50: 487-491.
- Galik PK, Givens MD, Stringfellow DA, Crichton EG, Bishop MD, Eilerksen KJ. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and anti-BVDV antibodies in pooled samples of follicular fluid. *Theriogenology* 2002; 57: 1219-1227.
- Devaux A, Soula V, Sifer C, Branger M, Naouri M, Porcher R, Poncet C, Neuraz A, Alvarez S, Benifla JL, Madelenat P, Brun-Vazinet F, Feldmann G. Hepatitis C virus detection in follicular fluid and culture media from HCV+ women, and viral risk during IVF procedures. *Hum Reprod* 2003; 18: 2342-2399.
- Kim SG, Dubovi EL. A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, and follicular fluid samples. *BioRxiv* 2003; 31: 103-106.
- Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, Krisher RL. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Hum Reprod* 2000; 15: 395-401.
- Wongsrikeao P, Otoi T, Taniguchi M, Karja NWK, Agung B, Nii M, Nagai T. Effects of hexoses on *in vitro* oocyte maturation and embryo development in pigs. *Theriogenology* 2006; 65: 332-343.
- Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, Pursel VG. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod* 1993; 49: 89-94.
- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry AC. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 2000; 289: 1188-1190.
- Suzuki C, Yoshioka K. Effects of amino acid supplements and replacement of polyvinyl alcohol with bovine serum albumin in porcine zygote medium. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18: 789-795.
- Yoshida M, Ishigaki K, Pursel VG. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 68-71.
- Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi H, Bamba K, Kojima Y. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on their subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1992; 95: 481-488.
- Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS, Day BN. Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Biol Reprod* 1998; 58: 1316-1320.
- Hong JY, Yong HY, Lee BC, Hwang WS, Lim JM, Lee ES. Effects of amino acids on maturation, fertilization and embryo development of pig follicular oocytes in two IVM media. *Theriogenology* 2004; 62: 1473-1482.
- Wang WH, Day BN. Development of porcine embryos produced by IVM/IVF in a medium with or without protein supplementation: effect of extracellular glutathione. *Zygote* 2002; 10: 109-115.
- Anbari K, Schultz RM. Effect of sodium and betaine in culture media on development and relative rates of protein synthesis in preimplantation mouse embryo *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1993; 35: 24-28.
- Biggers JD, Lawitts JA, Lechene CP. The protective action of betaine on the deleterious effects of NaCl on preimplantation mouse embryos *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 380-390.
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN. Glutathione content and embryo development after *in vitro* fertilization and various concentrations of cysteine. *Zygote* 1999; 7: 203-210.
- Bavister BD, McKiernan SH. Regulation of hamster embryo development *in vitro* by amino acids. In: Bavister BD (ed.), *Preimplantation Embryo Development*. New York: Springer-Verlag; 1993: 57-72.
- Edwards LJ, Williams DA, Gardner DK. Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffer of intracellular pH. *Hum Reprod* 1998; 13: 3441-3448.
- Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1995; 1: 91-148.
- Rose-Hellekant TA, Libersky-Williamson EA, Bavister BD. Energy substrates and amino acids provided during *in vitro* maturation of bovine oocytes alter acquisition of developmental competence. *Zygote* 1998; 6: 285-294.
- 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; 50: 434-442.
- Eppig JJ. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8: 485-489.
- Krisher RL, Brad AM, Herrick JR, Sparman ML, Swain JE. A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during *in vitro* maturation. *Anim Reprod Sci* 2007; 98: 72-96.
- Grupe CG, Nagashima H, Nottle MB. Asynchronous meiotic progression in porcine oocytes matured *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9: 187-191.
- Ikeda K, Takahashi Y. Effects of maturational age of porcine oocytes on the induction of activation and development *in vitro* following somatic cell nuclear transfer. *J Vet Med Sci* 2001; 63: 1003-1008.
- Dominko T, First NL. Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Mol Reprod Dev* 1997; 47: 456-467.
- Wang WH, Abeydeera LR, Prather RS, Day BN. Morphologic comparison of ovulated and *in vitro*-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after *in vitro* fertilization. *Mol Reprod Dev* 1998; 49: 308-316.
- Wang WH, Sun QY, Hosoe M, Shioya Y, Day BN. Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biol Reprod* 1997; 56: 1376-1382.
- Wang WH, Machaty Z, Abeydeera LR, Prather RS, Day BN. Time course of cortical and zona reaction of pig oocytes upon intracellular calcium increase induced by thimerosal. *Zygote* 1999; 7: 79-86.
- Funahashi H, Nagai T. Regulation of *in vitro* penetration of frozen-thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. *Mol Reprod Dev* 2001; 58: 424-431.



CRYOPRESERVATION AND ENSUING IN VITRO FERTILIZATION ABILITY OF  
BOAR SPERMATOZOA FROM EPIDIDYMIDES STORED AT 4°C

K. Kikuchi,<sup>1,a</sup> T. Nagai,<sup>2</sup> N. Kashiwazaki,<sup>3,b</sup> H. Ikeda,<sup>4</sup> J. Noguchi,<sup>1</sup> A. Shimada,<sup>1</sup>  
E. Soloy,<sup>1,5</sup> and H. Kaneko

<sup>1</sup>Department of Genetic Resources II, National Institute of Agrobiological Resources  
Kannondai 2-1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

<sup>2</sup>Department of Animal Industry, Tohoku National Agricultural Experiment Station  
Kuriyagawa, Morioka, Iwate 020-0123, Japan

<sup>3</sup>YS New Technology Institute, Inc.  
Simo-Ishibashi 519, Ishibashi, Shimotsuga, Tochigi 329-0512, Japan

<sup>4</sup>Saga Prefectural Livestock Experiment Station  
Miyano 23242-2, Yamauchi, Kishima, Saga 849-2305, Japan

<sup>5</sup>Department of Clinical Studies-Reproduction, Royal Veterinary and Agricultural University  
13 Bülowsvej, DK-1870, Frederiksberg C, Copenhagen, Denmark

Received for publication: July 9, 1997

Accepted: June 10, 1998

ABSTRACT

The influence of prolonged storage of boar epididymides on post-thaw sperm motility, and in vitro fertilization was evaluated. Twenty pairs of epididymides were obtained from Large White boars, and spermatozoa from one of each of the pairs were immediately collected and frozen (control group). The remaining epididymides were cooled to 4°C and stored for 1, 2 or 3 d, after which spermatozoa were collected and frozen (experimental groups Day 1, 2 and 3, respectively). Sperm motility was maintained throughout the dilution procedure and then dropped ( $P < 0.01$ ) after freezing and thawing. During storage the motility of nonfrozen spermatozoa decreased significantly ( $P < 0.01$ ), reaching a value equal to that of frozen-thawed spermatozoa on Day 3. In vitro fertilization experiments revealed significantly ( $P < 0.05$ ) lower penetration rates using Day 1, 2 and 3 stored spermatozoa (12, 13 and 2%, respectively) than that of the control group (40%). Oocyte penetration ability seemed to be reflected by acrosome integrity. However, the motility of spermatozoa with the ability to penetrate oocytes in Day 1 and Day 2 groups did not differ from that of the controls. The motility of spermatozoa lacking penetration ability, on the other hand, gradually decreased as the storage period was prolonged. This suggests that the sperm motility and penetration ability are affected by different mechanisms during the cold storage of epididymides. Finally, control and experimental groups exhibited high incidences of monospermic penetration (64 to 90%) and of male pronuclear formation (67 to 71%). These data suggest that cryopreservation of spermatozoa from boar epididymides stored at 4°C for 1 to 2 d can be used for conserving male germ cells when epididymal spermatozoa can not be collected immediately and cryopreserved.

© 1998 by Elsevier Science Inc.

Key words: pig, epididymis, sperm, refrigeration, freezing, genetic resource

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Niwa for critical discussion, Dr. Nagamine for statistical analysis, Dr. Vaughan for help with English and Ms. Aoki for technical assistance.

<sup>a</sup>Correspondence and reprint requests.

<sup>b</sup>Present address: Faculty of Veterinary Medicine, Azabu University, Fuchinobe 1-17-71, Sagami-hara, Kanagawa 229-8501, Japan.

## INTRODUCTION

Boar epididymal spermatozoa show a higher resistance to cold shock than ejaculated sperm cells (9), suggesting that they may be more suitable for cryopreservation (15). Frozen-thawed epididymal spermatozoa were successfully used for in vitro fertilization (IVF) experiments with in vitro-matured (IVM) porcine follicular oocytes. The transfer of 2- to 4-cell embryos produced by IVM-IVF to recipient resulted in the birth of live piglets (5). The above studies showed that the cryopreservation of epididymal spermatozoa was a promising method not for the conservation of pig genetic resources, but could be used to rescue male germ cells from a suddenly deceased boar of high genetic value. At many farms, however, it is not always possible to collect and freeze epididymal spermatozoa due to a lack of technicians and equipment. To overcome these limitations we proposed refrigerating epididymides and transporting them to a laboratory for subsequent sperm collection, freezing and storage in liquid nitrogen and for use in artificial insemination (AI) or IVF, followed by embryo transfer. We tested this proposal by collecting and freezing boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C for a few days and assessed the ability of the frozen-thawed spermatozoa to fertilize oocytes in vitro.

## MATERIALS AND METHODS

## Extenders for Freezing of Boar Epididymal Spermatozoa

All extenders were prepared according to Niwa (12): 1) Collecting Solution consisted of 330 mM glucose, 12.8 mM trisodium citrate dihydrate, 4.3 mM sodium hydrogen carbonate, 0.9 mM EDTA-2Na and antibiotics (1,000 IU/mL penicillin G potassium [Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA] and 1 mg/mL streptomycin sulfate [Sigma]), 2) A mixture of 80% (v/v) of 310 mM lactose, 20% (v/v) of egg yolk and antibiotics was centrifuged at 1,600×g for 15 min and the supernatant served as Niwa and Sasaki Freezing (NSF)-I extender, 3) The NSF-II extender consisted of 92.5% (v/v) of NSF-I, 1.5% (v/v) of Equex Stem (Noba Chemical Sales Inc., Scituate, MA, USA), and 5% (v/v) of glycerol and antibiotics. All extenders were prepared in advance and stored at -20°C. Before use, they were thawed and equilibrated to room temperature (25°C), 15°C and 4°C, respectively.

## Collection, Dilution and Freezing of Boar Epididymal Spermatozoa

Twenty pairs of testes and epididymides from Large White boars were obtained at a local slaughterhouse. They were transported to the laboratory at room temperature. Control spermatozoa were immediately collected from one epididymis of each pair according to the method by Nagai et al. (11). Briefly, luminal fluid containing spermatozoa was extruded from the distal portion of the cauda epididymis by air pressure from a syringe. The fluid was diluted with 30 mL Collecting Solution rewarmed to room temperature. Sperm suspension in a 50-mL glass centrifugation tube was placed in water (2,000 mL at room temperature) and transferred to a refrigerator at 15°C. Cooling down to 15°C lasted for about 3 h. Subsequently, the fluid was centrifuged at 1,200×g for 10 min and the supernatant discarded. Precipitated spermatozoa were gently resuspended in 5 mL NSF-I extender. It took about 1 h for centrifugation and resuspension at 15°C. Resuspended spermatozoa were cooled to 4°C within 2 h. Spermatozoa resuspended in NSF-I were then mixed with an equal volume of NSF-II, which determined the final 3% (v/v) concentration of glycerol as cryoprotectant. The sperm concentration was adjusted to  $5 \times 10^8$  cells/mL. The sperm suspension

men  
- affrc. 80-3P.  
2301

1867-10  
3紙

was transferred to 0.25-mL plastic straws (IMV, L'aigle, Cedex, France), which were placed in liquid nitrogen vapor for 10 min and finally stored in liquid nitrogen. The remaining epididymis of the pair was put into plastic bag containing 20 mL paraffin oil (Mineral Oil, E. R. Squibb & Sons Inc., Princeton, NJ, USA) to prevent drying. The plastic bag was tightly closed, placed in water (2,000 mL, room temperature) and transferred to a refrigerator. Cooling to 15°C lasted for 3 h, after which the bag was kept at 15°C for about 1 h and then cooled further to 4°C over 2 h. Epididymides were stored at 4°C for 1, 2 or 3 d, and afterwards the spermatozoa were collected as described previously (experimental groups Day 1, Day 2 and Day 3, respectively). The spermatozoa were diluted in Collecting Solution (4°C), and centrifuged at 1,200×g for 10 min at 4°C. The precipitated spermatozoa were resuspended in NSF-I extender (4°C), and the same volume of NSF-II (4°C) extender was added. Freezing was carried out by the procedure used for a control group.

#### Evaluation of Sperm Motility

Sperm motility was evaluated when the spermatozoa were transferred to the extenders (Collecting Solution, NSF-I and NSF-II) and after thawing. A drop of the extender containing spermatozoa was introduced into Medium 199 (M199) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco, Rockville, MD, USA; 11), which was prewarmed at 37°C. Thawing of spermatozoa was carried out as follows: a straw with frozen spermatozoa was transferred into water at 37°C and kept there for 3 min. A portion of the sperm suspension was diluted in M199 at 37°C. The spermatozoa were transferred to an examination chamber (Fujihira, Tokyo, Japan), placed on a micro warm plate (Kitasato supply, Tokyo, Japan) at 37°C, and examined under a phase contrast microscope after 3 min of incubation in M199. The percentage of motile spermatozoa was counted (4), and the speed of progression (SOP), based on the type of forward movement of spermatozoa, was evaluated under a phase contrast microscope using criteria of the World Health Organization (22) modified in our laboratory (0 = no movement, 1 = faint motility, 2 = slow, nonprogressive motility, 3 = slow forward progression or 4 = steady, rapid forward progression). Sperm motility index (SMI) was calculated according to Stachecki et al. (19):

$$\text{SMI} = [\text{percentage motility} + (\text{SOP} \times 25)] \times 1/2.$$

#### IVM of Porcine Follicular Oocytes and IVF with Frozen-Thawed Spermatozoa

In vitro maturation of porcine oocytes was carried out as described previously (8). Cumulus enclosed oocytes from prepubertal gilts were transferred to a maturation medium, modified Waymouth's MB752/1 medium (Gibco) supplemented with 10% FBS, 10% porcine follicular fluid, 2.5 µg/mL FSH (Antrin, Denka Pharmaceutical Co. Ltd., Kanagawa, Japan) and antibiotics (100 IU/mL penicillin G potassium [Sigma] and 0.1 mg/mL streptomycin sulfate [Sigma]). About 30 oocytes were cultured in 500 µL of maturation medium without oil at 39°C under 5% CO<sub>2</sub> in air for 48 h. In vitro fertilization was carried out following the same protocol (7). Frozen-thawed spermatozoa were preincubated in M199 at 37°C for 1 h (2.5×10<sup>8</sup> sperm/mL). A portion (10 µL) of the preincubated and diluted spermatozoa (5×10<sup>6</sup> live cells/mL) was added to 10 expanded cumulus-enclosed oocytes in a mineral oil-covered fertilization drop, 90 µL Bracket and Oliphant (BO) solution (2) supplemented with 2.0 mM caffeine (Sigma). Final sperm concentration was defined as 5×10<sup>5</sup> live cells/mL. The spermatozoa and oocytes were cocultured for 5 h, then transferred to Brinster's medium for ovum culture-II (1) and subsequently cultured for 5 h. At 10 h after insemination, oocytes were fixed in acetic alcohol (1:3), stained with 1% aceto-orcein and

精子洗浄.  
500×g (5 min.)  
2 min  
HITACHI 50ml  
1865 rpm  
15ml 1861 rpm  
r: 12.9um



examined with a phase contrast microscope. An oocyte with a female pronucleus and with an enlarged sperm head(s) or a male pronucleus(ei) was defined as penetrated. Thirty to 40 oocytes were inseminated with spermatozoa from each epididymis. The *in vitro* fertilization was replicated 3 times. After IVF experiments, some spermatozoa could penetrate oocytes, hereafter called penetrating spermatozoa, and some could not penetrate oocytes, hereafter called nonpenetrating spermatozoa. To measure the incidence of cleavage to the 2-cell stage or blastocyst formation, some oocytes were inseminated with a batch of penetrating Day 1 spermatozoa, transferred into North Carolina State University-37 medium (13) modified with 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol, and subsequently cultured under CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> adjusted to 5 and 90%, respectively (6). After culture for 2 or 6 d, zygotes were fixed, stained and examined for cleavage to the 2-cell stage or for blastocyst formation, respectively. The total cell numbers of blastocysts were counted.

#### Evaluation of Sperm Acrosome Integrity

A triple-stain technique (21) was used to detect acrosomal integrity of frozen-thawed and preincubated spermatozoa. Briefly, spermatozoa were introduced into BO solution containing 0.5% (w/v) Trypan Blue (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan) and then incubated for 10 min at 39°C. They were centrifuged at 25°C for 3 min at 1,200 $\times$ g; then the supernatant was discarded. The sperm pellet was resuspended with BO solution, and spermatozoa were air-dried onto glass slides. Spermatozoa were fixed for 30 min with 3% (v/v) glutaraldehyde in 0.2 M phosphate buffer solution (pH 7.4), stained first with 0.4% (w/v) Bismark brown Y (Sigma, pH 1.8) at 40°C for 5 min and then with 0.8% (w/v) Rose Bengal (Kanto Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan) in 0.1 M Tris buffer (pH 5.3) at 25°C for 5 min. Three preparations were made for each sperm sample and 100 spermatozoa were observed in each preparation. Four types of spermatozoa were identified (Table 5). Type 1 cells had a pink acrosomal region and a pale brown post-acrosomal region. These spermatozoa were considered to have an acrosome and to be live. Type 2 cells had a pink acrosomal region and a dark purple post-acrosomal region. These spermatozoa were considered to have an acrosome but to be dead. Type 3 cells had a white acrosomal region and a pale brown post acrosomal region. These spermatozoa were considered to be lacking an acrosome and to be live. Type 4 cells had a white acrosome region and a dark purple post-acrosomal region. These spermatozoa were considered to be lacking an acrosome and to be dead. Motile and nonmotile sperm cells could not be identified in Type 1 and 3 live spermatozoa.

#### Statistical Analysis

All data were subjected to the analysis of variance using GLM procedures of Statistical Analysis System (SAS, 16). Least squares means in SMI were tested by the Least Significant Differences test. The results from IVF experiments and acrosome status were analyzed by the Duncan's multiple range test after transformation using arcsin of percentage (20).

### RESULTS

The *in vitro* penetration ability of frozen-thawed spermatozoa from 20 pairs of epididymides was evaluated after IVF experiments. Control spermatozoa collected from the epididymides of 16 boars penetrated IVM oocytes. In this group of 16 boars, spermatozoa collected from 11 epididymides stored at 4°C for 1 to 3 d maintained their ability to penetrate IVM oocytes.

### Sperm Motility

The motility index of spermatozoa (SMI) from 20 boars was analyzed. Motility of control spermatozoa was well maintained throughout the whole dilution procedure; however, it dropped ( $P<0.01$ ) after freezing and thawing (Table 1). During a storage period of the epididymides lasting for 1, 2 or 3 d, the motility of unfrozen spermatozoa immediately after the collection generally decreased ( $P<0.01$ ) in comparison with that of control spermatozoa from nonrefrigerated epididymides (Table 2). Nevertheless, spermatozoa collected on Day 1 and Day 2 showed better motility than those collected on Day 3. Motility of frozen-thawed spermatozoa did not vary among the groups and was found to be similar to the motility of unfrozen spermatozoa collected on Day 3 (Table 2). The SMI of spermatozoa divided into penetrating and nonpenetrating groups after IVF experiments was finally evaluated. Penetrating spermatozoa maintained their motility by Day 2 in contrast with that of the nonpenetrating cells, the motility of which decreased ( $P<0.01$ ) as the refrigeration period was prolonged (Table 3).

### IVF

Data of IVF experiments using spermatozoa from 16 pairs of epididymides, the control spermatozoa of which penetrated oocytes *in vitro* are analyzed in Table 4. The incidence of penetration in this group of control spermatozoa was significantly ( $P<0.05$ ) higher than that observed in groups of experimental spermatozoa collected Days 1, 2 and 3. Percentage of monospermic penetration and male pronuclear formation, on the other hand, did not differ among examined groups. When oocytes were inseminated with Day 1 sperm, the percentages of monospermic penetration with a male pronucleus, cleavage to the 2-cell stage and blastocyst formation were 12% (3/26), 6% (4/68) and 2% (3/126), respectively. The mean  $\pm$  SE of the total cell number of blastocysts was  $35 \pm 12$ .

### Acrosome Integrity of Frozen-Thawed and Preincubated Spermatozoa

Acrosome integrity in 6 pairs of sperm cells with the ability to penetrate (both control and experimental spermatozoa) were examined (Table 5). The percentage of live spermatozoa with an intact acrosome had a tendency ( $P=0.09$ ) to be lower after storage for 3 d, while the percentage of dead spermatozoa without an acrosome was increased ( $P<0.05$ ) after refrigeration for 3 d.

### DISCUSSION

The motility of ejaculated spermatozoa is impaired in the course of cooling to  $0^{\circ}\text{C}$  (cold shock), freezing (ice nucleation and crystallization) and thawing (warm shock, 23). This finding was also demonstrated in our present study using epididymal spermatozoa, the motility of which was maintained throughout the dilution procedure but declined after freezing and thawing (Table 1). Our system using NSF-I and -II extenders seems to protect spermatozoa against cold shock, possibly due to the large (18.5 and 20%) amount of egg yolk in the NSF-I and -II extenders, respectively. Egg yolk contains lecithins, and one of them, phosphatidylcholine, was found to protect sperm motility against cold shock (18). When epididymides were cooled to  $4^{\circ}\text{C}$  and stored for 1 or 2 d, the collected spermatozoa showed better motility than cells stored for 3 d (Table 2). When control spermatozoa in the Collecting Solution were cooled to  $4^{\circ}\text{C}$  and stored for 1 d, motility was reduced (Kikuchi et al., unpublished data). Although the reason for the survival of spermatozoa in

Table 1. Sperm motility index of control spermatozoa throughout the whole cryopreservation procedures

Collecting Solution	NSF-I	NSF-II	Frozen-thawed
83 ± 2 <sup>a</sup> (20)	78 ± 2 <sup>a</sup> (20)	72 ± 2 <sup>a</sup> (20)	47 ± 2 <sup>b</sup> (20)

Sperm motility indexes are presented as least squares means ± SEM.

Numbers in parentheses are numbers of epididymides used for analysis.

<sup>a,b</sup>Values with different superscripts are significantly different (P<0.01).

Table 2. Sperm motility index before and after freezing of spermatozoa

Spermatozoa	Sperm Motility Index			
	Control <sup>b</sup>	Day 1 <sup>c</sup>	Day 2 <sup>c</sup>	Day 3 <sup>c</sup>
Nonfrozen <sup>a</sup>	79 ± 3 <sup>d</sup> (20)	60 ± 5 <sup>e</sup> (8)	58 ± 5 <sup>e</sup> (7)	37 ± 6 <sup>f</sup> (5)
Frozen-thawed	44 ± 3 <sup>f</sup> (20)	38 ± 5 <sup>e</sup> (8)	33 ± 5 <sup>f</sup> (7)	30 ± 6 <sup>f</sup> (5)

Sperm motility indexes are presented as least squares means ± SEM.

Numbers in parentheses are numbers of sperm used for analysis.

<sup>a</sup>Nonfrozen spermatozoa were evaluated immediately after collection from epididymides.

<sup>b</sup>Control spermatozoa are immediately collected and frozen without refrigeration of epididymides.

<sup>c</sup>Epididymides were stored at 4°C for 1, 2 and 3 days, then spermatozoa are collected and frozen (Day 1, Day 2 and Day 3, respectively).

<sup>d-f</sup>Values with different superscripts are significantly different (P<0.01).

Table 3. Sperm motility index of frozen-thawed spermatozoa

Spermatozoa <sup>a</sup>	Sperm Motility Index			
	Control <sup>b</sup>	Day 1 <sup>c</sup>	Day 2 <sup>c</sup>	Day 3 <sup>c</sup>
Penetrating	71 ± 2 <sup>d</sup> (16)	62 ± 3 <sup>de</sup> (5)	68 ± 4 <sup>d</sup> (3)	50 ± 3 <sup>e</sup> (3)
Nonpenetrating	69 ± 3 <sup>d</sup> (4)	51 ± 4 <sup>e</sup> (3)	36 ± 3 <sup>f</sup> (4)	25 ± 4 <sup>f</sup> (2)

Sperm motility indexes are presented as least squares means ± SEM.

Numbers in parentheses are numbers of sperm used for analysis.

<sup>a</sup>Frozen-thawed spermatozoa are categorized as penetrating or nonpenetrating spermatozoa depending upon their penetration ability after the IVF experiments.

<sup>b</sup>Control spermatozoa are immediately collected and frozen without refrigeration of epididymides.

<sup>c</sup>Epididymides were stored at 4°C for 1, 2 and 3 days, then spermatozoa are collected and frozen (Day 1, Day 2 and Day 3, respectively).

<sup>d-f</sup>Values with different superscripts are significantly different (P<0.01).

Table 4. In vitro fertilization with frozen-thawed boar epididymal spermatozoa

Spermatozoa	Sperm sample analyzed	Percentage <sup>a</sup> of penetrated oocytes	Percentage <sup>b</sup> of monospermic penetration	Percentage <sup>b</sup> of oocytes with MPN
Control <sup>c</sup>	16	40 ± 7 <sup>e</sup>	64 ± 10	71 ± 10
Day 1 <sup>d</sup>	7	12 ± 10 <sup>f</sup>	90 ± 15	74 ± 22
Day 2 <sup>d</sup>	5	13 ± 12 <sup>f</sup>	85 ± 18	68 ± 26
Day 3 <sup>d</sup>	4	2 ± 13 <sup>f</sup>	80 ± 20	71 ± 29

Percentages are expressed as least squares means ± SEM.

MPN; a male pronucleus(ei).

<sup>a</sup>Calculated from matured oocytes.

<sup>b</sup>Calculated from penetrated oocytes.

<sup>c</sup>Control spermatozoa are immediately collected and frozen without refrigeration of epididymides.

<sup>d</sup>Epididymides were stored at 4°C for 1, 2 and 3 days, then spermatozoa are collected and frozen (Day 1, Day 2 and Day 3, respectively).

<sup>e,f</sup>Percentages within each column with different superscripts are significantly different (P<0.05).

Table 5. Acrosome integrity of frozen-thawed boar epididymal spermatozoa

Spermatozoa	Sperm sample analyzed	Percentage of live spermatozoa with acrosome (Type 1)	Percentage of live spermatozoa without acrosome (Type 2)	Percentage of dead spermatozoa with acrosome (Type 3)	Percentage of dead spermatozoa without acrosome (Type 4)
Control <sup>a</sup>	6	35 ± 5	18 ± 3	28 ± 4	20 ± 4 <sup>c</sup>
Day 1 <sup>b</sup>	2	28 ± 8	17 ± 6	34 ± 8	21 ± 7 <sup>c</sup>
Day 2 <sup>b</sup>	2	26 ± 8	22 ± 6	29 ± 8	23 ± 7 <sup>c</sup>
Day 3 <sup>b</sup>	2	18 ± 8	22 ± 6	21 ± 8	39 ± 7 <sup>d</sup>

Percentages are expressed as least squares means ± SEM.

<sup>a</sup>Control spermatozoa are immediately collected and frozen without refrigeration of epididymides.

<sup>b</sup>Epididymides were stored at 4°C for 1, 2 and 3 days, then spermatozoa are collected and frozen (Day 1, Day 2 and Day 3, respectively).

<sup>c,d</sup>Percentages within each column with different superscripts are significantly different (P<0.05).

epididymides at 4°C is unclear at present, epididymal fluid may contain an unknown cold shock protective factor(s) such as lecithin (17) which, however, is effective for less than 3 d.

The motility of penetrating spermatozoa in the Day 1 and Day 2 groups did not differ from that of the control cells. The motility of spermatozoa lacking penetration ability, on the other hand, gradually decreased as the storage period was prolonged (Table 3). The incidence of penetration in the experimental groups was significantly lower than in the control group (Table 4). These results suggest that the sperm motility and penetration ability are affected by different mechanisms during the cold storage of epididymides. In addition to motility, acrosome integrity may be damaged during cryopreservation, and this causes a decrease in sperm fertilizing ability (3, 14). Our data, after evaluation of frozen-thawed and preincubated spermatozoa, also suggested that the acrosome was damaged when the storage period of epididymides was prolonged (Table 5). Penetration by frozen-thawed boar epididymal spermatozoa seems to be affected by both sperm motility and acrosome status. On the other hand, sperm penetration ability seems to differ among individuals even after same storage period (shown as SEM in Table 4). Factors other than sperm motility or acrosome integrity may be causing differences in the ability of sperm cells to penetrate oocytes following refrigeration of the epididymides.

Cryopreserved spermatozoa collected on Days 1 to 3 from stored epididymides showed a lower penetration ability than control spermatozoa collected from nonrefrigerated epididymides (Table 4). The incidence of monospermic penetration in all groups, on the other hand, was high compared with the results of our previous study using frozen-thawed epididymal spermatozoa (50%; 7) and with results using fresh or frozen-thawed ejaculated spermatozoa (34 to 56%; 10). The occurrence of male pronuclear formation was also high (Table 4). Oocytes inseminated with a batch of Day 1 sperm cells can develop to the blastocyst stage after showing normal cleavage to the 2-cell stage. The percentage of blastocyst formation was low (2%) compared with that of an earlier study using frozen-thawed spermatozoa without refrigeration of Meishan epididymides (13%, Kikuchi et al., unpublished data); however, the total cell number of blastocysts was nearly the same (35 and 39, respectively). This may indicate that the quality of *in vitro* produced embryos is not affected by refrigeration of epididymides. Normal fertilization, cleavage and blastocyst formation in these trials suggest the possibility of reproduction in pigs when IVM-IVF oocytes are transferred to recipients.

Because low temperature transportation within and between many countries is available, it is possible to deliver epididymides to a laboratory within 1 or 2 d after their collection. The method of storing epididymides described here can be used to conserve male genetic resources in pigs when epididymal spermatozoa can not be collected and cryopreserved. Further study combined with AI or embryo transfer of IVM-IVF produced oocytes is needed to confirm the advantage of this method.

#### REFERENCES

1. Brinster RL. Studies on the development of mouse embryos *in vitro*. IV. Interaction of energy source. *J Reprod Fertil* 1965;10:227-240.
2. Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod* 1975;12:260-274.
3. Clarke RN, Johnson LA. Effect of liquid storage and cryopreservation of boar spermatozoa on acrosomal integrity and the penetration of zona-free hamster ova *in vitro*. *Gamete Res* 1987;16:193-204.

4. Howard JG, Brown JL, Bush M, Wildt DE. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. *J Androl* 1990;11:204-215.
5. Jiang JY, Zhong S, Xiong HQ, Fan BQ. In vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro by frozen boar epididymal spermatozoa (in Chinese). *Acta Zoologica Sinica* 1991;37:313-316.
6. Kashiwazaki N, Kikuchi K, Hirabayashi M, Shimada A, Noguchi J, Takahashi R, Shino M, Kaneko H, Ueda M. Viability after transfer to recipients of porcine embryos produced in vitro. *Theriogenology* 1998;49:244.
7. Kikuchi K, Nagai T, Motlik J, Shioya Y, Izaike Y. Effect of follicle cells on in vitro fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology* 1993;39:593-599.
8. Kikuchi K, Naito K, Daen FP, Izaike Y, Toyoda Y. Histone H1 kinase activity during in vitro fertilization of pig follicular oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 1995;43:523-532.
9. Losley JF, Bogart R. A comparative study of epididymal and ejaculated spermatozoa of the boar. *J Anim Sci* 1944;3:360-370.
10. Nagai T. In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. *Anim Reprod Sci* 1996;42:156-163.
11. Nagai T, Takahashi T, Masuda H, Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S, Hanada A. In-vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1988; 84:585-591.
12. Niwa T. Preparation of extenders. In: Niwa T (ed), *Manual for Cryopreservation of Pig Spermatozoa* (in Japanese). Tokyo: Japanese Artificial Insemination Association, 1989:19-23.
13. Petters RM, Wells KD. Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 1993;48:61-73.
14. Pursel VG, Johnson LA, Rampacek GB. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J Anim Sci* 1972;34:278-283.
15. Rath D, Niemann H. In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology* 1997;47:785-793.
16. SAS Institute. *SAS/STAT User's Guide*, 6.11 ed. SAS Institute Inc, Cary NC: 1988.
17. Setchell BP, Maddocks A, Brooks DE. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: Knobil E, Neill JD, Greenwald GS, Markert CL, Pfaff DW (eds), *The Physiology of Reproduction*. New York: Laven Press, 1994:1063-1175.
18. Simpson AM, Swan MA, White IG. Susceptibility of epididymal boar sperm to cold shock and protective action of phosphatidylcholine. *Gamete Res* 1987;17:355-373.
19. Stachecki JJ, Ginsburg KA, Armant DR. Stimulation of cryopreserved epididymal spermatozoa of the domestic cat using the motility stimulants caffeine, pentoxifylline, and 2'-deoxyadenosine. *J Androl* 1994;15:157-164.
20. Snedecor GW, Cochran WG (eds), *Statistical Methods* 6th ed. Iowa: Iowa State University Press; 1967.
21. Talbot T, Chacon RS. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J Exp Zool* 1981;215:201-208.
22. World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. New York: Cambridge University Press; 1992.
23. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:871-891.

# NCSU-37 for in vitro maturation

## First NCSU-37 IVM Sol. IVM 1

Second NCSU-37 IVM sol.	10 ml	20 ml	30 ml
Hormons <sup>C*</sup>	100 µl	200 µl	300 µl
dbcAMP <sup>C**</sup>	100 µl	200 µl	300 µl
Total (about)	10 ml	20 ml	30 ml

\*Stock Sol.<sup>B</sup> of mixture of 1,000IU/ml PMSG and 1,000IU/ml hCG  
 \*\*Sigma #D0627, 100 mM Stock solution<sup>B</sup>

(7本+11本) 6本+9本  
 + stock A 7.2 ml  
 " B 1.8 ml.  
 → 7.109 → -20°C

## Second NCSU-37 IVM Sol. IVM 2

Stock Sol. A	36 ml	72 ml	144 ml
Stock Sol. B	9 ml	18 ml	36 ml
PFF	5 ml	10 ml	20 ml
Glucose	45 mg	90 mg	180 mg
Sorbitol (powder) <sup>A</sup>	98.4 mg	196.7 mg	393.4 mg
β-ME (50 mM Stock Sol. <sup>B</sup> )	50 µl	100 µl	200 µl
L-cystein (60 mM Stock Sol. <sup>B</sup> )	500 µl	1.0 ml	2.0 ml
Anitibiotics (Stock Sol.)	50 µl	100 µl	200 µl
Total (about)	50 ml	100 ml	200 ml

<sup>A</sup>If you want to use NCSU-23 for maturation culture, 7 mM taurine and 5 mM hypotaurine will be supplemented instead of 12 mM sorbitol. In my preliminary experiments, there was no significantly difference in rates of maturation and blastocyst formation.

<sup>B</sup>Stock Sols were prepared using mixture of Stock Sol. A and B (4:1), stored at -20°C and thawed at room temperature before use.

β-ME 39.89 mg (solution) + 10 ml (stock A+B) L-cysteine 9  
 $60 \text{ mM} = 9.4572 \text{ mg/ml}$   
 $= 9.4572 \text{ mg/ml}$   
 $= 47.286 \text{ mg/5ml}$

<sup>C</sup>Maturation medium supplemented with hormones and dbcAMP is used for the first 20-22 h of maturation, and medium without hormones and dbcAMP was used for the next 24 h.

In the original method by Funahashi et al., insulin was also supplemented in the first maturation medium. I did not use insulin, however, the effect of insulin was not examined.

Because dbcAMP is expensive, I usually prepare 10 ml for the maturation medium. This means only 100 µl stock solution is necessary for a trial.

Pig-FM for IVF

	mM	mg/100 ml	mg/200ml	mg/500ml
NaCl	90	525.96	1,051.92	2,629.8
KCl	12	89.46	178.92	447.30
NaHCO <sub>3</sub>	25	210.03	420.06	1,050.15
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anhydrous	0.5	6.00	12.00	30.00
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.5	12.33	24.66	61.65
Sodium lactate	10	112.10	224.20	560.50
(60% syrup*)		0.19 ml	0.38 ml	0.95 ml
Hepes	10	238.30	476.60	1,191.50
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	8	117.60	235.20	588.00
Sodium pyruvate	2	22.00	44.00	110.00
Caffeine anhydrous	2	38.84	77.68	194.20
BSA (Fatty acid free**)	5 (mg/ml)	500.00	1,000.00	2,500.00
Antibiotics (Stock Sol.***)		100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	500 $\mu$ l

\*モル濃度より換算

\*\* Fraction Vでも可

\*\*\* $\times 1000$ でストックしています。最終濃度は、ストレプトマイシン0.1mg/ml、ペニシリンG100 IU/ml

Osmol 295 前後  
13<3u

30ml Pig-FM  
caffeine 2mM  $\rightarrow$  5mM  
17.478 mg 追加.  
  
2mM  $\rightarrow$  10mM  
46.608 mg 追加.



# NCSU-37 for culture of IVF oocytes

## NCUS-37 IVC-Pru.+Lac. Sol. for Day 0-2.

Stock Sol. A	40 ml	80 ml	160 ml	400 ml
Stock Sol. B	10 ml	20 ml	40 ml	100 ml
Na-Lactate <sup>a</sup>	25.5 μl	51 μl	102 μl	204 μl
Na-Pruvate (×1000 sol.=9.086 mg/ml) <sup>b</sup>	100 μl	200 μl	400 μl	1 ml
Sorbitol (powder)	109.3 mg	218.6 mg	437.2 mg	1,093.0 mg
β-ME (50 mM Stock Sol.*)	50 μl	100 μl	200 μl	500 μl
BSA (Fraction V)	200 mg	400 mg	800 mg	2,000 mg
Antibiotics	50 μl	100 μl	200 μl	500 μl
Total (about)	50 ml	100 ml	200 ml	500 ml

4:1に Na-pruvate  
の粒は 0.1mlに  
を入れ、水を入れ  
9.086mg/mlに  
調整 → 0.1mlに用いる

<sup>a</sup>60% (W/V) syrup (Kanto Chemical #\*\*\*\*\*), FW = 112.18

$$0.51 \text{ ml}/1000 \text{ ml} = 0.306 \text{ mg}/1000 \text{ ml}, 0.306/112.18 = 2.728 \text{ mM}$$

<sup>b</sup>Sigma #\*\*\*\*, FW = 110.0

$$\times 1000 \text{ sol. conc.} = 9.086 \text{ mg/ml} = 9.086 \text{ g}/1000 \text{ ml},$$

$$9.086/110.0 = 0.0826 \text{ M.}$$

$$\text{Final conc.} = 0.0826 \text{ M} \times 0.200/100 = 0.165 \text{ mM}$$

Osmol 285前後

## NCUS-37 IVC-Glu. Sol. for Day 2-6.

Stock Sol. A	40 ml	80 ml	160 ml	400 ml
Stock Sol. B	10 ml	20 ml	40 ml	100 ml
Glucose	50 mg	100 mg	200 mg	500 mg
Sorbitol (powder)	109.3 mg	218.6 mg	437.2 mg	1,093.0 mg
β-ME (50 mM Stock Sol.*)	50 μl	100 μl	200 μl	500 μl
BSA (Fraction V)	200 mg	400 mg	800 mg	2,000 mg
Antibiotics	50 μl	100 μl	200 μl	500 μl
Total (about)	50 ml	100 ml	200 ml	500 ml

\*Stock Sols were prepared using mixture of Stock Sol. A and B (4:1), stored at -20°C and thawed at room temperature before use.

## Medium 199 (M199)/pH 7.8

for the preincubation of pig spermatozoa

M199 <sup>a</sup>	44.0 ml	88.0 ml	176 ml
Calcium lactate	45.0 mg	90.0 mg	180.0 mg
D-glucose	27.5 mg	55.0 mg	110.0 mg
Antibiotics (Stock Sol.*)	0.05 ml	0.10 ml	0.20 ml
total vol.	50.0 ml	100.0 ml	200.0 ml

a) Medium 199 with Earls' salts, L-glutamine/2.2g/l NaHCO<sub>3</sub>/25mM HEPES ← M199 (11150-059)  
 (GIBCO No.380-2340AG for 100ml, -AJ for 500ml)\*\* 13 NaHCO<sub>3</sub> 含有液.

Add FBS.	FBS	6 ml	12 ml	24 ml
	total vol.	50 ml	100 ml	200 ml

Adjust pH to 7.6-7.7 with 0.1N-NaOH.

Filtration with 0.22μm Millipore<sup>R</sup> filter.

Store at 4 °C.

\*×1000でストックしています。最終濃度はストレプトマイシン0.1mg/ml、ペニシリンG100 IU/ml

\*\*型番が変わったと思います。当方ではパウダーを購入して作製しています。

$$\begin{aligned}
 & \text{Hepes: } 238.31 \\
 & 25 \text{ mM} = 238.31 \times 25 \times 10^{-3} \text{ g/l} \\
 & = 5.95775 \text{ g/l} \\
 & = 0.26214 \text{ g/44ml}
 \end{aligned}$$

Medium 199 (M199) Air  
for the collection of oocytes

a) M199 Air (Stock Solution)

M199 with Hank's salts*	1 bottle
HEPES	4.766 g
Antibiotics (Stock)	1 ml
<u>finally, NaHCO<sub>3</sub></u>	<u>0.35 g</u>
add Milli-Q <sup>R</sup> to	1000 ml

\*MEDIUM199 powder Sigma M-0399<sub>3</sub>

- 4) Filtration with 0.22µm Miliipore<sup>R</sup> Filter.
- 5) Store at 4°C.

b) Preparing M199 Air

- 1) for FCS Use,

M199 Air (Stock Sol.)	90 ml
<u>FCS</u>	<u>10 ml</u>
Total	100 ml

- Filtration with 0.22µm Miliipore<sup>R</sup> Filter.
- Store at 4°C.

- 1) for BSA Use,

M199 Air (Stock Sol.)	100 ml
<u>BSA (Fraction V)</u>	<u>0.3 g</u>
Total	100 ml

- Filtration with 0.22 µm Miliipore<sup>R</sup> Filter.
- Store at 4°C.

M199 solution (M17653) の場合  
(NaHCO<sub>3</sub> 含有時)

500ml M199	100 ml
0.05g L-glutamine	0.01 g
<del>500ul</del> AB	100 ul
<u>2.383g</u> HEPES	<u>0.4766 g</u>
500 ml.	

→ PH は 7.3 ~ 7.4 に調整

Hyalronidase (150 IU/ml) in PBS(-) or M199 Air  
for removing of follicle cells

Hyalronidase <sup>a</sup>	5.2mg	25.9mg	51.7mg	103.4mg
Add PBS(-) <sup>b</sup> or M-199 Air	10ml	50ml	100ml	200ml

a) Hyaluronidase type I-S: From bovine testes (Sigma H-3506 1g/bottle)

b) Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> free phosphate buffered saline containing 1-4mg/ml BSA

Filtration with 0.22µm Millipore<sup>R</sup> filter.

Store at -10°C.

Antibiotics (x1,000 Stock Solution)

containing 0.1g/ml Streptomycin sulfate (SM)

and 1.0x10<sup>5</sup> IU/ml Penicillin G potassium (PG).

力価の計算あり

SM <sup>a</sup>	100mg	1,000mg	2,000mg
PG <sup>b</sup>	63.3mg	632.9mg	1,265.8mg
add pure H <sub>2</sub> O (Milli-Q <sup>R</sup> ) to	1ml	10ml	20ml

a) Sigma No.

b) Sigma No. 1,580 IU/mg P7794.

Filtration with 0.22µm Millipore<sup>R</sup> filter.

Store in 1ml/cryotube at -10°C.

Use at x1,000 in medium.

(Final concentration is 0.1mg/ml SM and 100 IU/ml PG.)

Penicillin G

(Lot 093K0522  
1667 units/mg)

の場合

15910/mg

→ 59,988 ng/ml.

1199.16 mg/20ml

→ 62.85 mg/ml.

628.5 mg/10ml.

Pig IVM <sub>I</sub>		
1.	TCM 199 with Earle's salt	36 ml
2.	PFF	4 ml
3.	L-cys (0.6 mM)	400 $\mu$ l
4.	$\beta$ -Me (50 mM)	40 $\mu$ l (= 0.1)
5.	Na-pyruvat (50 mM)	40 $\mu$ l
6.	Gent (50 Mg/ml)	40 $\mu$ l
7.	D-Sorb (2 mg/ml)	0,08 g

Pig IVM <sub>I</sub>		
1.	IVM <sub>II</sub>	20 ml
2.	hCG 10 IU/ml	20 $\mu$ l
3.	eCG 10 IU/ml	20 $\mu$ l
4.	Estriadiol 1 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ l
5.	EGF (400 $\mu$ g/ml) Filter	10 $\mu$ l

## Stock Solutions for NCSU

### *NCSU Stock solution A*

	Conc.(mM)	g	g	
NaCl	136	3.971	7.943	1.9865
KCl	5.98	0.223	0.445	0.1115
CaCl <sub>2</sub> (2H <sub>2</sub> O)	2.13	0.156	0.312	0.078
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.49	0.101	0.202	0.0505
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	1.49	0.183	0.367	0.0915
Glutamine	1.25	0.091	0.183	0.0455
Total		500 ml	1000 ml	250ml.

### *NCSU Stock Solution B*

	Conc.(mM)	g	g	
NaHCO <sub>3</sub>	125	5.265	10.531	2.6325
Total		500 ml	1000 ml	250ml.

Stock Solutions A and B are filtered and stored at 4°C. They can be stored for several months.

Modena.

Cont 液 (対照液)

試薬名	(g)			
Glucose — グルコース (無水)	5.5	11.0	27.5	55
Sodium Citrate Dhydrate — クエン酸 3 ナトリウム 2 水和物	1.38	2.76	6.9	13.8
Sodium Hydrogen Carbonate — 炭酸水素ナトリウム	0.20	0.40	1	2
EDTA-2Na	0.47	0.94	2.35	4.7
citric acid Monohydrate — クエン酸 1 水和物	0.58	1.16	2.9	5.8
tris (hydroxymethyl) — トリスヒドロキシアミノメタン	1.13	2.26	5.65	11.3
AMYCAMICIN, — アミカマイシン	400µl	800 µL	2000µl	4ml
超純水	2000µl	400 ml	1000 ml	2000ml

SM 液 (試験液)

試薬名	20 ml	100 ml	500ml
Cont 液	20 ml	100 ml	500 ml
スキムミルク	0.225 g	1.125g	5.625 g

試薬品

試薬名	会社名	品番	容量
グルコース (無水)	和光	041-00595	500g
クエン酸 3 ナトリウム 2 水和物	和光	191-01785	500g
炭酸水素ナトリウム	和光	191-01305	500g
EDTA-2Na	和光	345-01865	500g
クエン酸 1 水和物	和光	035-03495	500g
トリスヒドロキシアミノメタン	sigma	T-1378	500g
アミカマイシン	明治	AMAMN201	200mg/2ml

スキムミルク 溶解は、  
最終的にモイタイメスで  
可也。



Journal of Reproduction and Development

Vol. 61 September 2015 Supplement

CONTENTS

第108回 日本繁殖生物学会大会

日程表 .....	j 2
会場案内図 .....	j 4
第 108 回 日本繁殖生物学会大会開催要領 .....	j 8

プログラム

第 108 回 日本繁殖生物学会大会プログラム .....	j 22
-------------------------------	------

講演要旨

学会賞講演 .....	j 51
市民公開講座 .....	j 54
シンポジウム .....	j 58
ワークショップ .....	j 70
口演発表 .....	j 73
ポスター発表 .....	j 111
著者索引 .....	j 171

2015年度 日本繁殖生物学会 総会 .....	j 181
--------------------------	-------



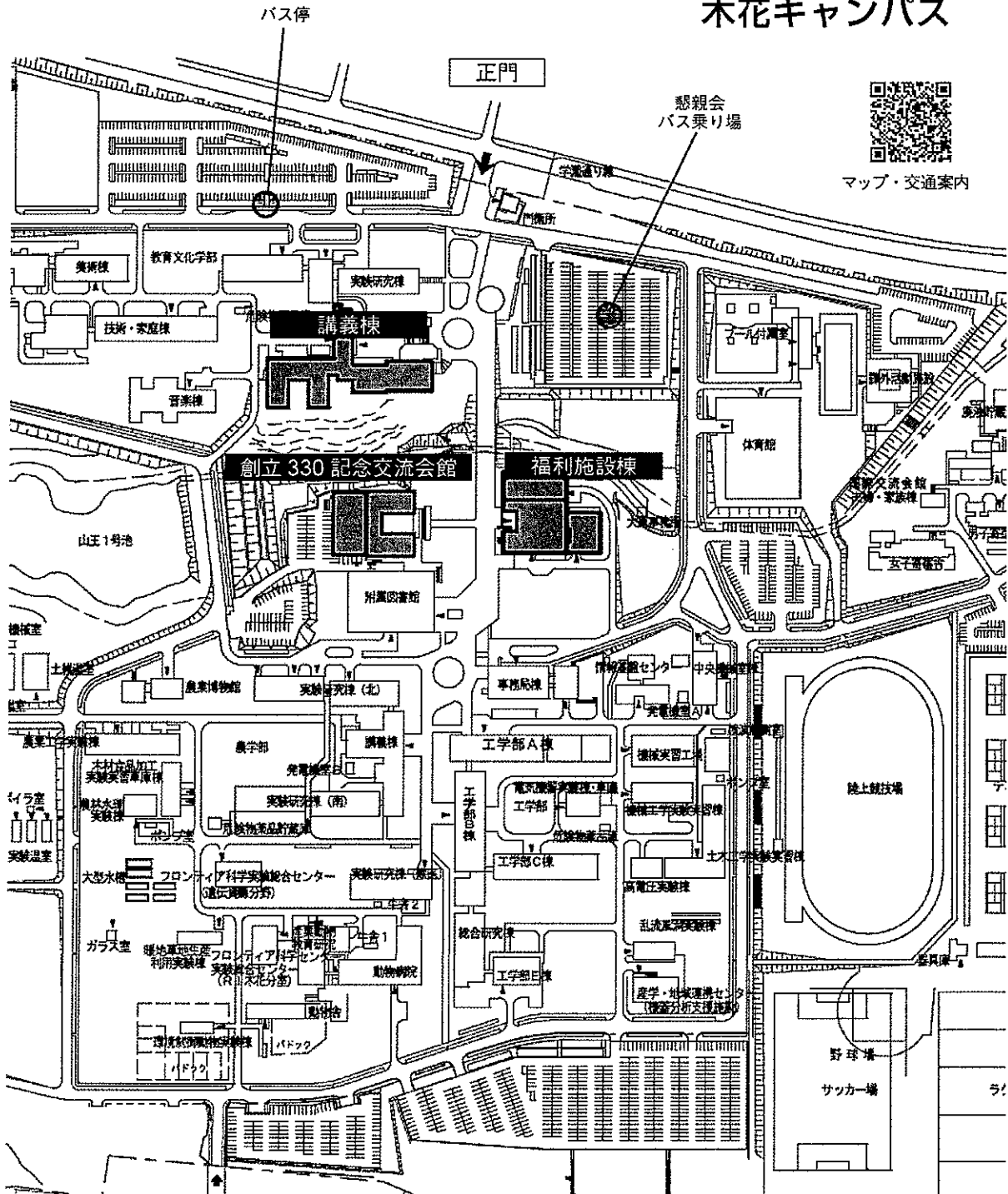
# 第 108 回 日本繁殖生物学会 大会日程表

	9月16日(水)		9月17日(木)	
	宮崎市民プラザ		宮崎大学木花キャンパス	
7:00				
8:00				
9:00			9:00	WCRB2017 組織委員会 【L205】
10:00			10:00	一般口演 精巢・精子 【第1会場】 OR1-1~7
11:00				一般口演 内分泌 【第2会場】 OR2-1~6
12:00			12:00	ランチオン セミナー 【第1会場】
13:00				評議委員会 【第2会場】
13:00	13:00	プログラム委員会 【中会議室】	13:00	優秀発表賞(口頭) 二次審査AW1-AW6 【第3会場】
14:00	14:00	広報委員会 【中会議室】	14:30	
15:00	15:00	表彰選考委員会 【小会議室】		
15:00	15:00	編集委員会 【中会議室】	15:00	ポスター発表 優秀発表賞審査(P-1~21) コアタイム15:00-16:30 一般演題(P-22~119の偶数番号) コアタイム15:30-16:30 【宮崎大学創立330記念 交流会館コンベンションホール】
16:00	16:00	常務理事会 【大会議室】	16:30	
17:00	17:00	理事会 【大会議室】		
18:00	18:00			
18:00	18:00	受胎率Special Interest Group 【大会議室】	17:00	若手企画シンポジウム 【福利施設棟多目的ホール】
19:00	19:30		20:00	
20:00				

	9月18日(金)		9月19日(土)		9月20日(日)			
	宮崎大学木花キャンパス				宮崎市民プラザ			
7:00								
8:00								
9:00		一般口演 精巣・精子 【第1会場】 OR1-8~12	一般口演 【第2会場】 内分泌 OR2-7~8 卵巢 OR2-9~12		一般口演 性周期・妊娠 【第2会場】 OR2-17~22			
10:00	9:00 ~ 10:30			9:00 ~ 10:45	一般口演 生殖工学 【第1会場】 OR1-18~24	9:30 ~ 12:00	シンポジウム3 生命のリサイクル: 初期発生から次世代へ 【オルブライトホール】	ワークショップ Novel concepts of immune system for regulating early pregnancy; Attack or tolerance? 【大会議室】
11:00	10:30 ~ 11:45	一般口演 生殖工学 【第1会場】 OR1-13~17	一般口演 性周期・妊娠 【第2会場】 OR2-13~16	10:45 ~ 12:00	一般口演 卵・受精 【第1会場】 OR1-25~28			
12:00								
13:00	12:00 ~ 13:00	男女共同参画推進 ランチョンセミナー 【第1会場】		12:00 ~ 13:00		12:00 ~ 13:00	WCRB2017ブレ企画 ランチョンセミナー 【大会議室】	
14:00	13:00 ~ 14:30	ポスター発表 一般演題 (P-22~119の奇数番号) コアタイム13:15~14:15 【宮崎大学創立330記念 交流会館コンベンションホール】		13:00 ~ 15:00	シンポジウム1 <i>in vitro</i> における 生殖細胞形成 研究の最新 トピックス 【第1会場】	13:00 ~ 16:00	市民公開講座 宇宙における 動物繁殖の可能性 【オルブライトホール】	
15:00	14:45 ~ 15:45	総会 【第3会場】						
16:00	15:45 ~ 17:15	受賞者記念講演 【第3会場】		15:00 ~ 17:00	一般口演 卵・受精 【第1会場】 OR1-29~36			
17:00								
18:00		移動		17:00 ~ 18:00	男女共同参画 推進委員会 【L205】			
19:00	18:30 ~ 20:30	懇親会 【シーガイア・バインテラス】						
20:00								

# 会場案内図

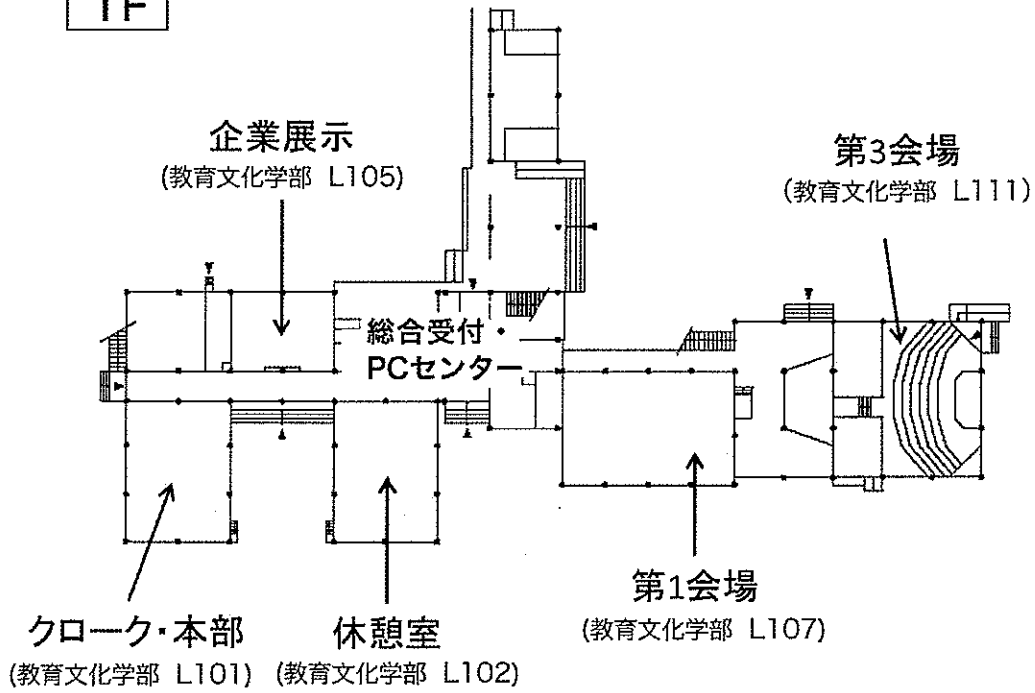
## 宮崎大学 木花キャンパス



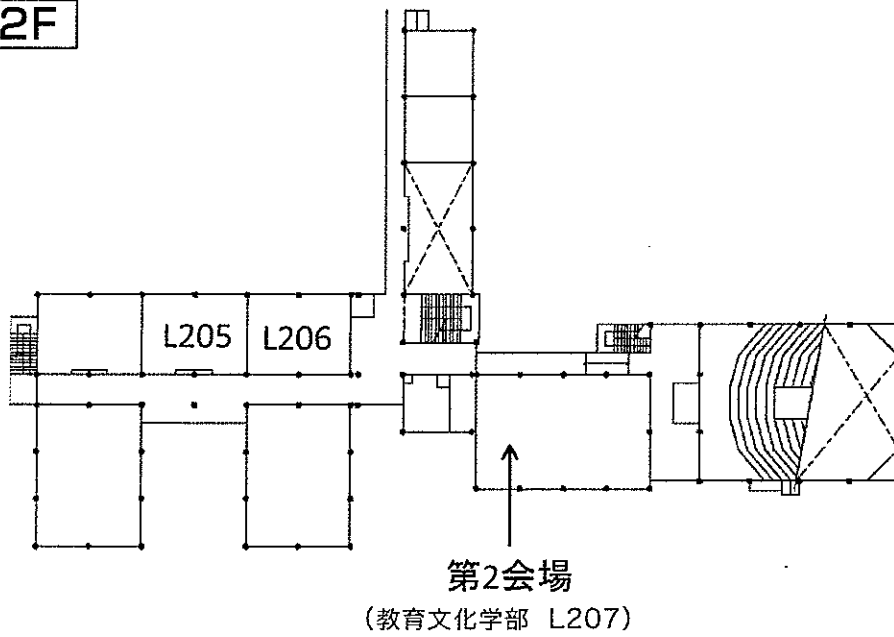
マップ・交通案内

宮崎大学木花キャンパス 教育文化学部講義棟

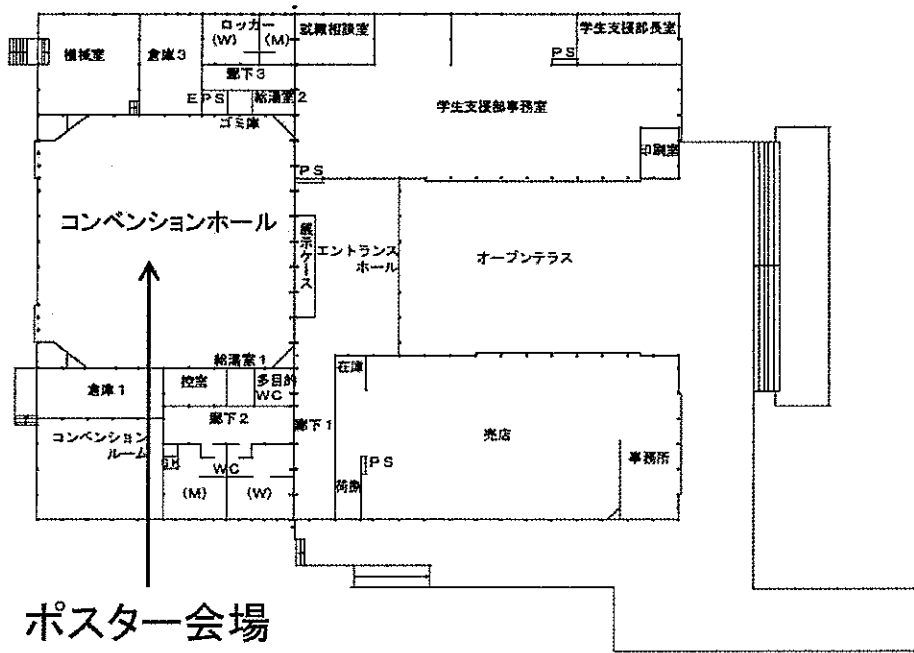
1F



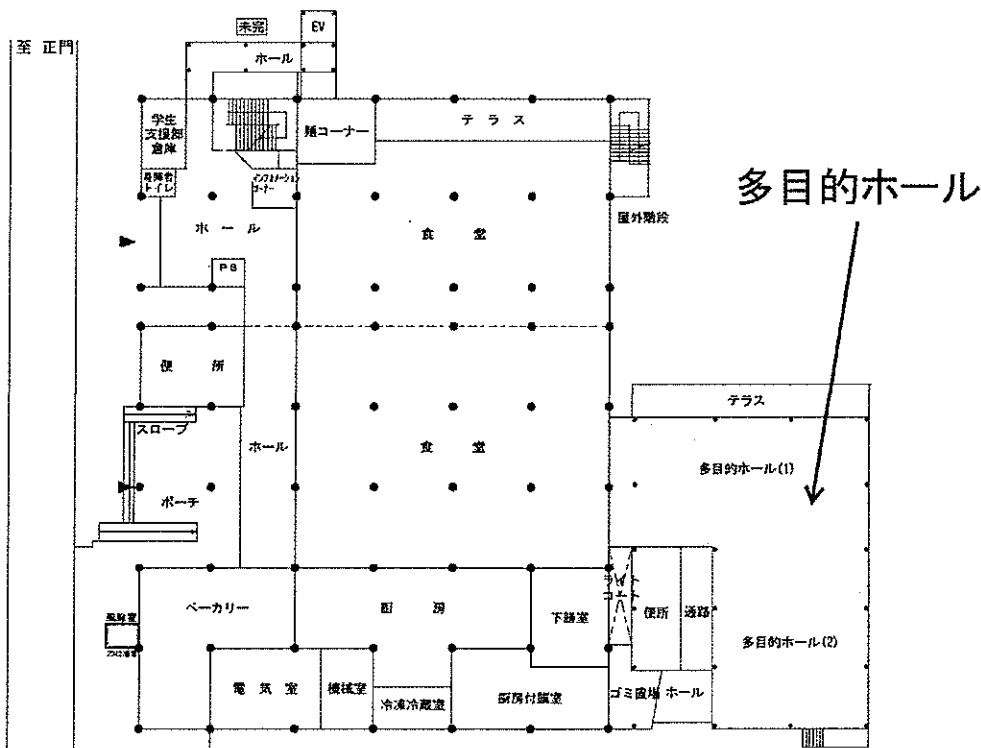
2F



**宮崎大学木花キャンパス  
創立330記念交流会館コンベンションホール 1階**

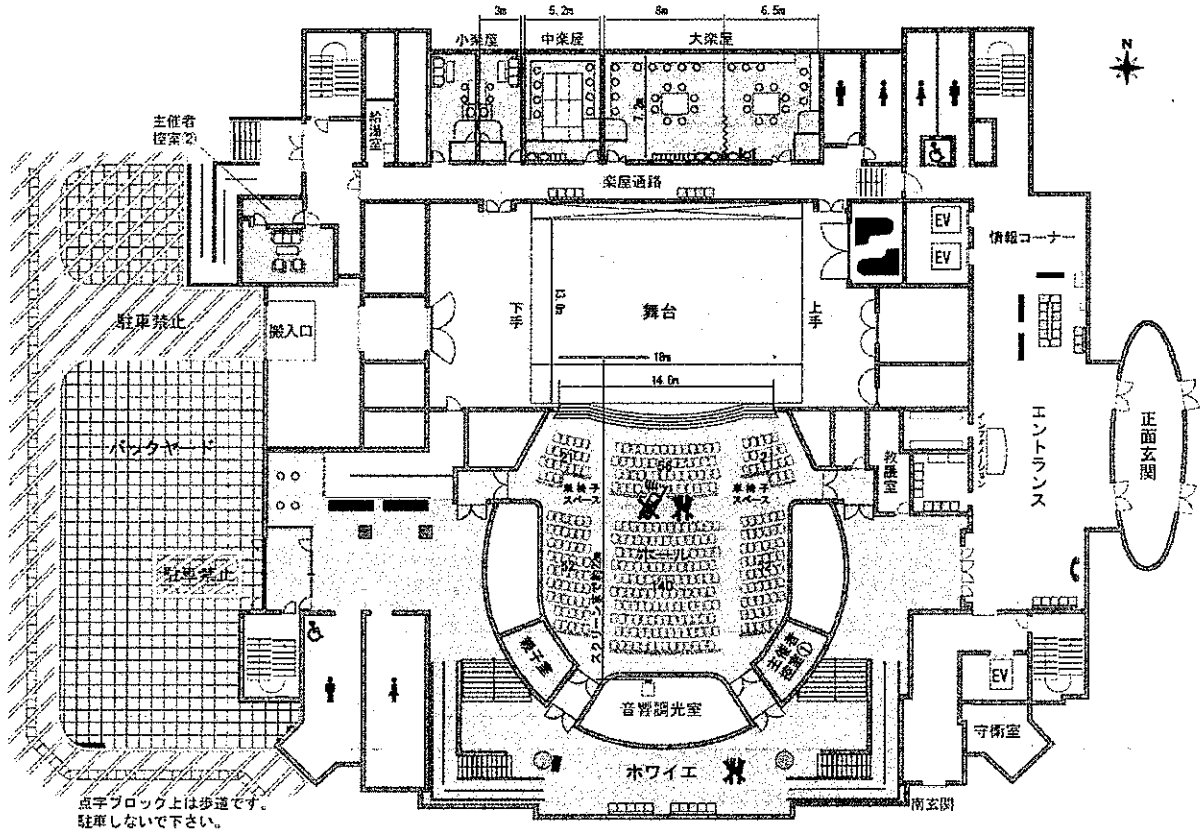


**宮崎大学木花キャンパス 福利施設棟 1階**

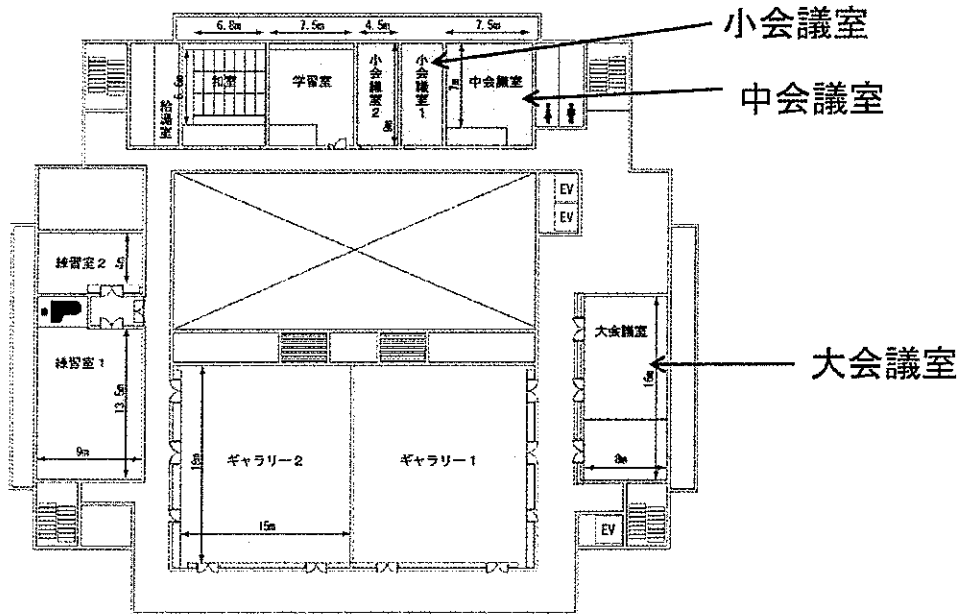


# 宮崎市民プラザ

## 1F オルブライトホール



## 4F



# 第108回 日本繁殖生物学会大会開催要領

## 1. 期 日

- 2015年9月 16日(水) プログラム委員会、広報委員会、表彰選考委員会、編集委員会、常務理事会、理事会、受胎率 Special Interest Group
- 17日(木) 優秀発表賞応募講演と一般講演(口頭発表およびポスター)、評議員会、ランチョンセミナー、若手企画シンポジウム
- 18日(金) 一般講演(口頭発表およびポスター)、総会、受賞者講演、優秀発表賞授与、男女共同参画推進ランチョンセミナー、懇親会
- 19日(土) シンポジウム(2会場)、一般講演(口頭発表)、若手奨励策検討委員会、男女共同参画推進委員会
- 20日(日) シンポジウムおよびワークショップ(各1会場)、WCRB2017プレ企画ランチョンセミナー、市民公開講座

2. 会 場 17日～19日 宮崎大学木花キャンパス  
〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1-1
- 16日、20日 宮崎市民プラザ  
〒880-0001 宮崎県橘通西1丁目1番2号

3. 会 長 大澤 健司

4. 連絡先 〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1-1  
宮崎大学農学部産業動物臨床繁殖学研究室内  
第108回日本繁殖生物学会 大会事務局  
(Tel/Fax: 0985-58-7655)  
大会専用 E-mail: srd108@cc.miyazaki-u.ac.jp

会 長 大澤健司  
事務局長 北原 豪  
事務局 越本知大、佐々木羊介、續木靖浩、鍋西 久、西野光一郎、本多 新

## 5. 参加費

	前納	当日
名誉会員	無料	
正会員・シルバー会員	5,000円	6,000円
学生会員	3,000円	3,500円
非会員	6,500円	

\* 今春大学(大学院)を卒業し、平成27年度に学生会員から正会員に切り替え申請をした方には、参加費の優遇措置がありますので学会事務局にお問い合わせください。

上記の参加費金額には講演要旨集代が含まれます。前納いただいた方には講演要旨が事前送付されますので、会場受付では名札をお受け取り下さい。当日お支払いの方は、大会受付で参加費をお支払いの上、名札と講演要旨集をお受け取り下さい。なお、正会員および演題登録・参加登録をした学生会員には前納の有無に関わらず講演要旨集が事前送付されます。大会当日は講演要旨集をご持参ください。

## 6. 懇親会

日 時：9月18日(金) 18:30～20:30

場 所：フェニックス・シーガイア・リゾート パインテラス

懇親会費		前 納	当 日
	名誉会員：無料 (オンライン前納システムでの登録をお願いします。)		
	正会員・シルバー会員	6,000 円	7,000 円
	学生会員	3,500 円	4,000 円
	非会員	7,000 円	8,000 円

前納の申し込みをされずに参加を希望される方は大会受付までお越し下さい。

尚、宮崎大学木花キャンパスから懇親会場まで、直行バスを運行します。

宮崎大学で生産された畜産物(牛肉、牛乳)を用いた料理を用意しています。

和太鼓やフラダンスなど、宮崎が誇る、そして南国らしいパフォーマンスも用意しています。

## 7. 学会会場

### 宮崎空港—宮崎大学の交通機関

シャトルバス：日本繁殖生物学会参加者専用の直行バスを運行します。

「18. その他」に記載の時刻表をご覧ください。

尚、バス乗り場は、空港に臨時で設置いたします。大会デスクにお尋ね下さい。

### 宮崎市内在—宮崎大学の交通機関

#### 【バス】

通常の路線バスに加え、臨時バスを運行します。(「18. その他」に記載の時刻表をご覧ください)

最寄りのバス停留所は「宮崎大学」です。「大学病院前」では降りないでください。

バスの路線図及び時刻表は、<http://www.miyakoh.co.jp/bus/rosen> でご確認ください。

- 宮崎交通バス 811 番線「木花台方面宮崎大学・大学病院」行  
(宮崎駅前バスセンターより約40分610円、宮交シティより約25分490円)  
宮崎駅前バスセンター～デパート前～宮交シティ(17・18番乗り場)～国富小～木花～木花台入口～宮崎大学
- 宮崎交通バス 822 番線「まなび野方面宮崎大学・大学病院」行  
(宮崎駅前バスセンターより約50分640円、宮交シティより約35分520円)  
宮崎駅前バスセンター～デパート前～宮交シティ(17・18番乗り場)～県立看護大学～清武総合支所前～技術センター前～上木原～宮崎大学
- 宮崎交通バス 832 番線「清武方面宮崎大学・大学病院」行  
(宮崎駅前バスセンターより約45分640円、宮交シティより約30分520円)  
宮崎駅前バスセンター～デパート前～宮交シティ(17・18番乗り場)～産経大入口～清武駅前～技術センター前～黒坂観音前～宮崎大学
- 宮崎交通バス 835 番線「清武方面熊野経由宮崎大学・大学病院」行  
(宮崎駅前バスセンターより約55分640円、宮交シティより約40分520円)  
宮崎駅前バスセンター～デパート前～宮交シティ(17・18番乗り場)～産経大入口～清武駅前～技術センター前～黒坂観音前～熊野～木花台入口～宮崎大学



### 【鉄道】

○日豊本線「清武駅」下車：バスもしくはタクシーをご利用ください。

#### バス利用の場合

宮崎交通バス「清武駅前」バス停より631番線「清武方面宮崎大学・大学病院」行をご利用ください。清武駅より清武総合支所（徒歩約6分）へ移動し、宮崎交通バス「清武総合支所前」バス停より621番線「まなび野方面宮崎大学・大学病院」行または631番線「清武方面宮崎大学・大学病院」行をご利用ください。

#### 【タクシーで宮崎大学に向かう場合】

タクシー会社は、宮崎県タクシー協会（0985-51-8081）にお問い合わせください。

JR清武駅から： 約15分 1,500～1,900円程度

JR南宮崎駅から： 約25分 2,400～3,000円程度

JR宮崎駅から： 約30分 3,000～3,500円程度

宮崎空港から： 約20分 2,100～2,500円程度

## 8. 理事会、評議員会・各種委員会

宮崎市民プラザ		
プログラム委員会	9月16日（水）13:00～14:00	中会議室
広報委員会	9月16日（水）14:00～15:00	中会議室
表彰選考委員会	9月16日（水）14:00～15:00	小会議室
編集委員会	9月16日（水）15:00～16:00	中会議室
常務理事会	9月16日（水）16:00～17:00	大会議室
理事会	9月16日（水）17:00～18:00	大会議室
受胎率 Special Interest Group	9月16日（水）18:00～19:30	大会議室

宮崎大学木花キャンパス		
WCRB2017 組織委員会	9月17日（木）9:00～10:00	教育文化学部 L205
評議員会	9月17日（木）12:00～13:00	第2会場（教育文化学部 L207）
若手奨励策検討委員会	9月19日（土）12:00～13:00	教育文化学部 L205
男女共同参画推進委員会	9月19日（土）17:00～18:00	教育文化学部 L205

## 9. 一般講演発表形式

口頭発表：発表時間10分、質疑応答5分とします。会場にはWindowsコンピュータを用意いたします。搭載ソフトはMicrosoft Office PowerPoint 2013（Windows）です。別バージョンのPowerPointでファイルを作成した場合は、上記の環境で問題なく動作することを事前にチェックしてください。作成したPowerPointファイルをUSBフラッシュメモリかコンパクトディスク（CD-R）に保存し、発表の前日か遅くとも各セッション開始60分前までに総合受付に併設してあるPCセンターにて発表データの登録および内容・動作確認を行ってください。なお、USBフラッシュメモリ、PowerPointファイル等がコンピュータウイルスに感染していないことを事前に必ずご確認ください。

ポスター発表：縦120 cm、横85 cm程度のポスターを作成してください。

ポスターは、9月17日午前12時までに、会場（宮崎大学創立330記念交流会館コンベンションホール）の指定の場所に掲示して下さい。画鋏は会場に準備しております。演者は以下の時間帯には必ずポスターの前に立ち、説明と質疑応答を行ってください。

演題番号：22～119のうちの偶数番号 9月17日（木）15：30～16：30

演題番号：22～119のうちの奇数番号 9月18日（金）13：15～14：15

注意：なお、ポスターは9月18日（金）18時までに撤去してください。期限までに撤去されなかったものにつきましては、事務局で処分させていただきます。

## 10. 優秀発表賞の審査

(1) 口頭発表部門 9月17日（木）13:00～14:30 第3会場（教育文化学部L111）

優秀発表書類選考用要旨に基づく一次審査を経て6演題が選ばれております。これらの候補演題について口頭発表による二次審査を行います。審査員による評点に基づいて大会長が優秀発表賞を決定します。優秀発表賞の演者は、9月17日午前12時までに総合受付に併設してあるPCセンターにて発表データの登録および内容・動作確認を行ってください。

(2) ポスター発表部門 9月17日（木）15:00～16:30 宮崎大学創立330記念交流会館  
コンベンションホール

優秀発表賞に応募いただいた21題におきましては、審査員による質疑応答を含めたプレゼンテーションの審査を行います。応募者は上記の時間帯に必ず各自のポスターの前に立ち、説明や質疑応答を行ってください。審査員による評点に基づいて、大会長が優秀発表賞を決定します。

審査基準についての詳細な情報は、「優秀発表賞の考え方と審査方法・留意点」

([http://reproduction.jp/NewHP/Meeting/108/image/2015\\_Best\\_Presentation\\_Award.pdf](http://reproduction.jp/NewHP/Meeting/108/image/2015_Best_Presentation_Award.pdf)) をご覧ください。

## 11. 総会および受賞者講演

総会 9月18日（金）14：15～15：45 第3会場（教育文化学部L111）

(1) 功労賞の授与

(2) 学会賞の授与

・日本繁殖生物学会・学術賞

枝重圭祐 会員（高知大学 農学部）

卵子および胚の低温生物学的特性とガラス化凍結保存に関する研究

清水 隆 会員（帯広畜産大学 畜産衛生学研究部門）

ウシ卵胞機能の調節機序に関する分子細胞学的研究

・日本繁殖生物学会・技術賞

木村康二 会員（岡山大学 農学部）

水酸化アルミニウムゲルを利用したFSH単回投与によるウシ過剰排卵誘起法の開発

- ・ 日本繁殖生物学会・奨励賞  
中村隼明 会員（基礎生物学研究所 生殖細胞研究部門）  
始原生殖細胞を用いた家禽遺伝資源保存法の開発
- ・ 日本繁殖生物学会・奨励賞  
堀居拓郎 会員（群馬大学 生体情報ゲノムリソースセンター）  
CRISPR/Cas 法による DNA メチル化酵素および Tet の機能解析
- ・ 2014 年度 JRD Outstanding Paper Award 受賞者の表彰  
Kei ISHII  
Cell-cycle-dependent Colonization of Mouse Spermatogonial Stem Cells After Transplantation into Seminiferous Tubules.  
Koji KIMURA  
Successful Nonsurgical Transfer of Bovine Elongating Conceptuses and Its Application to Sexing.  
Natsumi SHIMIZU  
Possible Role of ZPAC, Zygote-specific Proteasome Assembly Chaperone, During Spermatogenesis in the Mouse.  
Ayumi HASEGAWA  
Microdroplet In Vitro Fertilization Can Reduce the Number of Spermatozoa Necessary for Fertilizing Oocytes.

(3) 学術賞受賞者講演

9月18日（金）15：45～17：15 第3会場（教育文化学部 L111）

枝重圭祐 会員（高知大学 農学部）

卵子および胚の低温生物学的特性とガラス化凍結保存に関する研究

清水 隆 会員（帯広畜産大学 畜産衛生学研究部門）

ウシ卵胞機能の調節機序に関する分子細胞学的研究

木村康二 会員（岡山大学 農学部）

水酸化アルミニウムゲルを利用した FSH 単回投与によるウシ過剰排卵誘起法の開発

**12. 第16回若手企画シンポジウム**

日 時：2015年9月17日（木）17:00～

場 所：宮崎大学福利施設棟1階多目的ホール（宮崎大学生協食堂内）

今年の若手企画シンポジウムは、繁殖学研究について、また繁殖学を通じてどのように社会に貢献するか等について熱く議論し、学生からベテランまで自由に交流を楽しめる会になるよう企画を進めています。当日は軽食とアルコール類を用意します。学生・若手研究者はもちろんのこと、様々な年代の研究者のみなさんも奮ってご参加ください。

また昨年に引き続き、大会の口頭発表プログラムにおいて「これは！」という質疑応答を繰り出した方に「若手奨励策検討委員会 優秀議論賞」として学会ロゴ入りの副賞を贈呈させてい

たきます。さらに、質問をした全ての学生さんに「議論参加賞」を贈呈する予定です。今大会でも奮って質問にお立ちください。

詳細については若手奨励策検討委員会webページや学会メーリングリストを通じてお知らせします。

\*尚、クロークは17:30までとなっておりますので、お預けになられた手荷物をお持ちになって、会場までお越しください。

### 13. 男女共同参画推進ランチョンセミナー

テーマ：「私たちの研究スタイルとライフスタイル」  
～私たちはこんなふうに取り組んできました～

日時：2015年9月18日(金) 12:00～

場所：宮崎大学木花キャンパス 第1会場(教育文化学部L107)

話題提供者：今村拓也(九州大学 大学院医学研究院)

川島千帆(帯広畜産大学 畜産フィールド科学センター)

本学会における男女共同参画の推進を目的にランチョンセミナーを開催いたします。今大会では、「私たちの研究スタイルとライフスタイル」をテーマに話題提供をしていただく予定です。老若男女を問わず、長いスパンで研究と生活に充実した日々を過ごすためにはどうしたら良いのか、制度として必要なサポート、今後のあるべき方向性など会員の皆さんと考えてゆきたいと思えます。

当日は、お弁当(飲み物付き、100名分)を用意しております。様々な働き方や年代の会員、学生の皆様の参加をお待ちしております。気軽にお越しください。

\*セミナー当日(9月18日)の8時50分から受付にて、お弁当の整理券を配布します。個数が限られていますので、先着順とさせていただきます(お一人様1枚)。

### 14. WCRB2017 プレ企画ランチョンセミナー

「Developing Practical International Conference English Presentation Skills」

日時：2015年9月20日(日) 12:00～13:00

場所：宮崎市民プラザ 大会議室

講師：マイク・ゲスト(Mike Guest)(宮崎大学 医学部)

座長：東村博子(名古屋大学 大学院生命農学研究科)

日本人が英語で口頭発表するのは大変です。特に、質疑応答にどのように対処するかは難関です。しかし、実は英語が苦手でも堂々と受け答えしているノンネイティブリサーチャーは数多くいます。研究内容のみならず、プレゼン技術に関しても自信が持てるようになるためのヒントを、「学会発表のためのサバイバル英語術」の著者であるゲスト先生が直接あなたに伝えます。特にWCRB2017沖縄大会で口頭発表にチャレンジしようとしている皆さんのお越しを心よりお待ちしております。

\*セミナー前々日(9月18日)の8時50分から受付にて、お弁当(飲み物付き)の整理券を配布します。個数が限られていますので、先着順とさせていただきます(お一人様1枚)。

## 15. 市民公開講座

テーマ：宇宙における動物繁殖の可能性

共催：日本学術会議食料科学委員会畜産学分科会

後援：宮崎県教育委員会、宮崎市教育委員会、宮崎県獣医師会、宮崎大学農学部、  
宮崎日日新聞社、NHK 宮崎放送局、MRT 宮崎放送、UMK テレビ宮崎

開催場所：宮崎市民プラザ オルブライトホール（宮崎市役所横）

開催日時：2015年9月20日（日）13：00～16：00

参加費：無料

講演1 ウシの精子保存技術のこれまでとこれから

保地真一（信州大学 繊維学部）

講演2 宇宙開発における生命科学分野の研究

矢野幸子（宇宙航空研究開発機構 有人宇宙技術部門）

講演3 宇宙に飛び立ったマウス精子

若山清香（山梨大学 発生工学研究センター）

講演4 “きぼう”におけるSpace Pup実験からみえた宇宙における動物の繁殖

若山照彦（山梨大学 生命環境学部）

本講座では、動物の繁殖や精子の保存方法についての基本的知識や先端技術を紹介した上で、「きぼう」（日本実験棟/国際宇宙ステーション）を利用した実験を募集するJAXA（宇宙航空研究開発機構）について、そして現在実施中の研究プロジェクト「ほ乳類の繁殖における宇宙環境の影響」について、中学生、高校生を含む一般の方を対象にわかりやすく講演する。

本市民公開講座は、JSPS 科研費研究成果公開促進費 15HP0030 の助成を受けたものです。

## 16. シンポジウムおよびワークショップ

本大会では、シンポジウム1および2を9月19日（宮崎大学木花キャンパス）に、シンポジウム3およびワークショップを9月20日（宮崎市民プラザ）に、開催いたします。

### シンポジウム1 *In vitro*における生殖細胞形成研究の最新トピックス

開催日時：9月19日（土）13：00～15：00

開催場所：宮崎大学木花キャンパス 第1会場（教育文化学部L107）

コーディネーター：平尾雄二（畜産草地研究所 家畜育種繁殖研究領域）

吉崎悟朗（東京海洋大学 海洋科学部）

1. 器官培養法によるマウス精子形成の誘導と維持

小川毅彦（横浜市立大学 医学部）

2. *in vitro*において産生されたマウス卵の発生能

尾畑やよい（東京農業大学 応用生物科学部）

### 3. 雌性生殖細胞系列サイクルの試験管内再構成

林 克彦 (九州大学 大学院医学研究院)

### 4. ナイーブ型多能性幹細胞を生殖細胞に直接変換する試み

松居靖久 (東北大学 加齢医学研究所)

#### 内容

生殖細胞の発生・分化に関する研究は繁殖生物学領域の根幹をなしており、その歴史は100年以上にのぼる。近年、生殖細胞の形成機構に関する多くの研究成果が日本、とりわけ本学会員から世界に発信されており、さらに深化すべく文部科学省科学研究費助成事業では新学術領域が立ち上げられている。

本シンポジウムでは、“*in vitro*において生殖細胞形成過程を再現する”研究に焦点を絞り、新学術領域「動物における配偶子産生システムの制御」の班員から、生殖細胞形成に関するOverviewを松居が、PGCの形成については林、精子形成については小川、卵子形成については尾畑が最新の研究成果を発表する。本シンポジウムは、*in vitro*系の構築から見えてきた生殖細胞形成の基礎的知見と応用的知見を学会員と討議することを目的に企画した。

## シンポジウム2 肉用牛の繁殖を考える

開催日時：9月19日(土) 13:00～15:00

開催場所：宮崎大学木花キャンパス 第2会場(教育文化学部L207)

コーディネーター：大澤健司(宮崎大学 農学部)

鍋西 久(宮崎県畜産試験場 家畜バイテク部)

### 1. 肉用牛の胚・子牛生産効率を上げるには

橋谷田豊(家畜改良センター 企画調整部)

### 2. 暑熱ストレスと肉用牛繁殖性 ―初期胚発生の観点から―

阪谷美樹(九州沖縄農業研究センター 畜産草地研究領域)

### 3. 生産現場における肉用牛(黒毛和種牛)の特性を理解した繁殖管理

上松瑞穂(みやざき農業共済組合 生産獣医療課)

#### 内容

日本国内では子牛の供給不足により肉用牛の市場価格が高騰している。その背景には飼養農家戸数の減少や口蹄疫の影響などがあげられる。未来の健全な肉用牛産業を考えると安定した供給が不可欠であり、そのために必要な繁殖管理をあらゆるアプローチから考えなければいけない。そこで今回、今ある繁殖技術をいかにして活用していくべきかを議論するために本シンポジウムを企画した。

本シンポジウムでは、日本国内における繁殖和牛の現状と課題、国が推進中の事業や一卵性双子生産技術(橋谷田氏)、黒毛和種牛の暑熱ストレスへの反応性や品種別の初期胚の高温感受性(阪谷氏)、宮崎県における肉用牛の繁殖成績や血液代謝プロファイルテストを通して得られた知見(上松氏)、などについて講演する。

### シンポジウム3 生命のリサイクル：初期発生から次世代へ

開催日時：9月20日（日）9：30～12：00

開催場所：宮崎市民プラザ オルブライトホール

コーディネーター：南直治郎（京都大学 農学研究科）

松本和也（近畿大学 生物理工学部）

1. 初期胚発生及びリプログラミングにともなうオープンクロマチン構造の変化と転写との関係  
宮本 圭（近畿大学 生物理工学部）
2. 受精後のユビキチン-プロテアソーム分解系と胚発生  
Seung-Wook Shin（アメリカ国立衛生研究所）
3. 受精後に起こるオートファジーを介したリサイクリングシステムの役割  
塚本智史（放射線医学総合研究所）
4. マウス着床前胚の細胞分化制御におけるHippo経路と細胞極性の役割  
平手良和（東京医科歯科大学 実験動物センター）
5. マウス始原生殖細胞によるエピゲノムリプログラミング  
関 由行（関西学院大学 理工学部）

#### 内容

受精から始まる生命は多種多様な分子の影響を受けて、正常な個体へと発生していく。これまでの研究から、発生過程の各ステージで特異的な遺伝子群が重要な役割を担っていることが明らかになってきた。細胞生物学的・分子遺伝学的考察から、発生には非常に複雑なメカニズムが関与していることが示されており、特に近年エピジェネティクス解析によって、発生に関わるさらに詳細な分子制御メカニズムの存在が明らかになりつつある。

本シンポジウムでは、各発生ステージで機能する分子制御メカニズムに関する最新のトピックスを紹介することで、生命の誕生である受精から、次の世代を生み出すための生殖細胞形成までの発出現象を時系列で理解することを目的とする。

### ワークショップ Novel concepts of immune system for regulating early pregnancy: Attack or tolerance?

開催日時：9月20日（日）9：30～12：00

開催場所：宮崎市民プラザ 大会議室

コーディネーター：宮本明夫（帯広畜産大学 畜産衛生学研究部門）

今川和彦（東京大学 大学院農学生命科学研究科）

1. The Innate Immune Functions of Male and Female Germ Cells  
—Does TLR family reduce the risk of infection during fertilization or induce successful fertilization?—  
Masayuki SHIMADA (Hiroshima University)
2. Local Immune System in the Oviduct  
—How do the immune cells react to sperm?: Support, ignore or attack?—  
Akio MIYAMOTO (Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine)

### 3. Early Placentation and Local Immune Regulation

—Why the function of so many immune systems is required for pregnancy establishment? :  
Does each of them function similarly?—

Kazuhiko IMAKAWA (The University of Tokyo)

#### 内容

近年、急速に進展がみられ始めた『初期妊娠に関わる免疫システム』の研究をわかりやすく紹介する。同時に、その複雑さゆえの混沌とした状況についても素直に議論したい。

3名の活発なSRD会員によって、1) 精子と排卵、2) 卵管内の免疫細胞と精子、3) 子宮内の着床／妊娠成立、の流れで構成する。

もう1点、重要な趣旨がある。本ワークショップは英語でおこなう。完成した研究の紹介ではなく、今まさに迷いながら研究を進めている問題を聴衆に問いかける雰囲気を、比較的ラフなスタイルの英語で伝えたい。特に若い世代のSRD会員に、可能な範囲の英語表現を「道具」として用いて、情報を伝え自由にクリエイティブな議論をすることの楽しさを共有してほしい。

## 17. 託児室

お子様連れの参加も可能なように、本大会では会場内に専用の託児室を用意し、専門のスタッフに委託します。準備の関係上、託児をご依頼する、あるいは託児をご利用する可能性がある方は、大会事務局にご連絡・ご相談ください。

## 18. その他

- ・ 宮崎大学木花キャンパス会場内では、大会期間中に無線LANの使用が可能です。接続方法、ID、パスワードを記したマニュアルを総合受付にて配布いたします。同受付にて記帳の上、受領頂きますようお願い申し上げます。
- ・ 宮崎大学木花キャンパス会場内のクロークは、教育文化学部 L101 で、9月17日～19日 (8:30～17:30) において開設しております。
- ・ 宮崎空港－宮崎大学木花キャンパス シャトルバス (無料) 時刻表  
j 18 ページをご参照ください。
- ・ 宮崎市内－宮崎大学木花キャンパス 通常運行・臨時バス (有料) 時刻表  
j 19～20 ページをご参照ください。
- ・ 懇親会会場  
j 21 ページをご参照ください。



## 宮崎大学－宮崎空港シャトルバス（無料）

---

9月17日、9月18日(2台運行)					
宮崎空港 発	—	宮崎大学 着	宮崎大学 発	—	宮崎空港 着
8:30	—	9:00	9:05	—	9:35
9:00	—	9:30	9:35	—	10:05
9:40	—	10:10	10:15	—	10:45
10:10	—	10:40	10:45	—	11:15
10:50	—	11:20	11:25	—	11:55
11:20	—	11:50	11:55	—	12:25
12:00	—	12:30	12:35	—	13:05
12:30	—	13:00	13:05	—	13:35
13:10	—	13:40	13:45	—	14:15

9月19日(1台運行)					
宮崎大学 発	—	宮崎空港 着	宮崎空港 発	—	宮崎大学 着
13:00	—	13:30	13:35	—	14:05
14:10	—	14:40	14:45	—	15:15
15:20	—	15:50	15:55	—	16:25
16:30	—	17:00	17:05	—	17:35
17:40	—	18:10	18:15	—	18:45
18:50	—	19:40			

## 宮崎交道路線 バス時刻表 (市内⇄宮崎大学) (有料)

### 平日 (市内→宮崎大学)

経由	宮崎駅西	高千穂通 2丁目	山形屋前	橋通 3丁目	橋通 2丁目	橋通 1丁目	橋橋南詰	宮交シティ	(途中 省略)	宮崎大学
まなび野	6:45	6:47	6:49	6:51	6:53	6:54	6:56	7:00	…	7:32
木花	7:15	7:17	7:19	7:21	7:23	7:24	7:26	7:30	…	7:54
清武				7:15	7:17	7:18	7:20	7:24	…	7:57
清武				7:16	7:19	7:19	7:21	7:25	…	8:18
まなび野	7:25	7:27	7:29	7:31	7:33	7:34	7:36	7:40	…	8:15
清武●18のみ	7:40	7:42	7:44	7:46	7:48	7:49	7:51	7:55	…	8:24
木花●18のみ	7:45	7:47	7:49	7:51	7:53	7:54	7:56	8:00	…	8:24
清武				8:03	8:06	8:06	8:08	8:17	…	8:45
木花	8:15	8:17	8:19	8:21	8:23	8:24	8:26	8:30	…	8:54
清武★17のみ	8:30	8:32	8:34	8:36	8:38	8:39	8:41	8:45	…	9:13
清武★17のみ	8:50	8:52	8:54	8:56	8:58	8:59	9:01	9:05	…	9:33
まなび野	9:05	9:07	9:09	9:11	9:13	9:14	9:16	9:20	…	9:52
木花	9:15	9:17	9:19	9:21	9:23	9:24	9:26	9:30	…	9:54
清武	9:35	9:37	9:39	9:41	9:43	9:44	9:46	9:50	…	10:18
まなび野	9:55	9:57	9:59	10:01	10:03	10:04	10:06	10:10	…	10:41
木花	10:15	10:17	10:19	10:21	10:23	10:24	10:26	10:30	…	10:54
清武	10:35	10:37	10:39	10:41	10:43	10:44	10:46	10:50	…	11:26
まなび野	10:55	10:57	10:59	11:01	11:03	11:04	11:06	11:10	…	11:42
木花	11:15	11:17	11:19	11:21	11:23	11:24	11:26	11:30	…	11:54

省 略

★印 9/17増便、●印 9/18増便

### 平日 (宮崎大学→市内)

経由	宮崎大学	(途中 省略)	宮交シティ	橋通南詰	橋通 1丁目	橋通 2丁目	橋通 3丁目	カーリーノ前	宮崎駅
木花	15:29	…	15:52	…	15:58	15:59	16:01	16:03	16:07
まなび野	15:34	…	16:06	16:10	16:12	…	16:15	16:17	16:21
まなび野	16:14	…	16:46	16:50	16:52	…	16:55	16:57	17:01
清武	16:30	…	16:59	17:03	17:05	…	17:08	17:10	17:14
木花	16:39	…	17:02	…	17:08	17:09	17:11	17:13	17:17
清武	16:44	…	17:12	17:16	17:18	…	17:21	17:23	17:27
まなび野★17のみ	16:54	…	17:26	17:30	17:32	…	17:35	17:37	17:41
清武★17のみ	17:13	…	17:41	17:45	17:47	…	17:50	17:52	17:56
木花	17:29	…	17:52	…	17:58	17:59	18:01	18:03	18:07
清武●18のみ	17:43	…	18:11	18:15	18:17	…	18:20	18:22	18:26
まなび野●18のみ	17:54	…	18:26	18:30	18:32	…	18:35	18:37	18:41
木花	18:29	…	18:52	…	18:58	18:59	19:01	19:03	19:07
清武	18:33	…	19:01	19:05	19:07	…	19:10	19:12	19:16
まなび野	18:44	…	19:16	19:20	19:22	…	19:25	19:27	19:31
清武	19:23	…	19:48	19:52	19:54	…	19:57	19:59	20:03
木花	19:29	…	19:52	…	19:58	19:59	20:01	20:03	20:07
まなび野	19:40	…	20:10	20:14	20:16	…	20:19	20:21	20:25
清武	20:03	…	20:28	20:32	20:34	…	20:37	20:39	20:43
まなび野★17のみ	20:35	…	21:05	21:09	21:11	…	21:14	21:16	21:20
清武	21:03	…	21:28	21:32	21:34	…	21:37	21:39	21:43

★印 9/17増便、●印 9/18増便

土曜日 (市内→宮崎大学)

経由	宮崎駅西	高千穂通 2丁目	山形屋前	橋通 3丁目	橋通 2丁目	橋通 1丁目	橋橋南詰	宮交シティ	(途中 省略)	宮崎大学
木花	7:15	7:17	7:19	7:21	7:23	7:24	7:26	7:30	…	7:54
まなび野★19	7:25	7:27	7:29	7:31	7:33	7:34	7:36	7:40	…	8:15
清武★19	7:45	7:47	7:49	7:51	7:53	7:54	7:56	8:00	…	8:26
木花	8:15	8:17	8:19	8:21	8:23	8:24	8:26	8:30	…	8:54
清武	8:35	8:37	8:39	8:41	8:43	8:44	8:46	8:50	…	9:18
まなび野	9:05	9:07	9:09	9:11	9:13	9:14	9:16	9:20	…	9:52
木花	9:15	9:17	9:19	9:21	9:23	9:24	9:26	9:30	…	9:54
清武	9:35	9:37	9:39	9:41	9:43	9:44	9:46	9:50	…	10:18
まなび野	9:55	9:57	9:59	10:01	10:03	10:04	10:06	10:10	…	10:41
木花	10:15	10:17	10:19	10:21	10:23	10:24	10:26	10:30	…	10:54
清武	10:35	10:37	10:39	10:41	10:43	10:44	10:46	10:50	…	11:18
まなび野	10:55	10:57	10:59	11:01	11:03	11:04	11:06	11:10	…	11:41
木花	11:15	11:17	11:19	11:21	11:23	11:24	11:26	11:30	…	11:54

省 略

★印 9/19増便

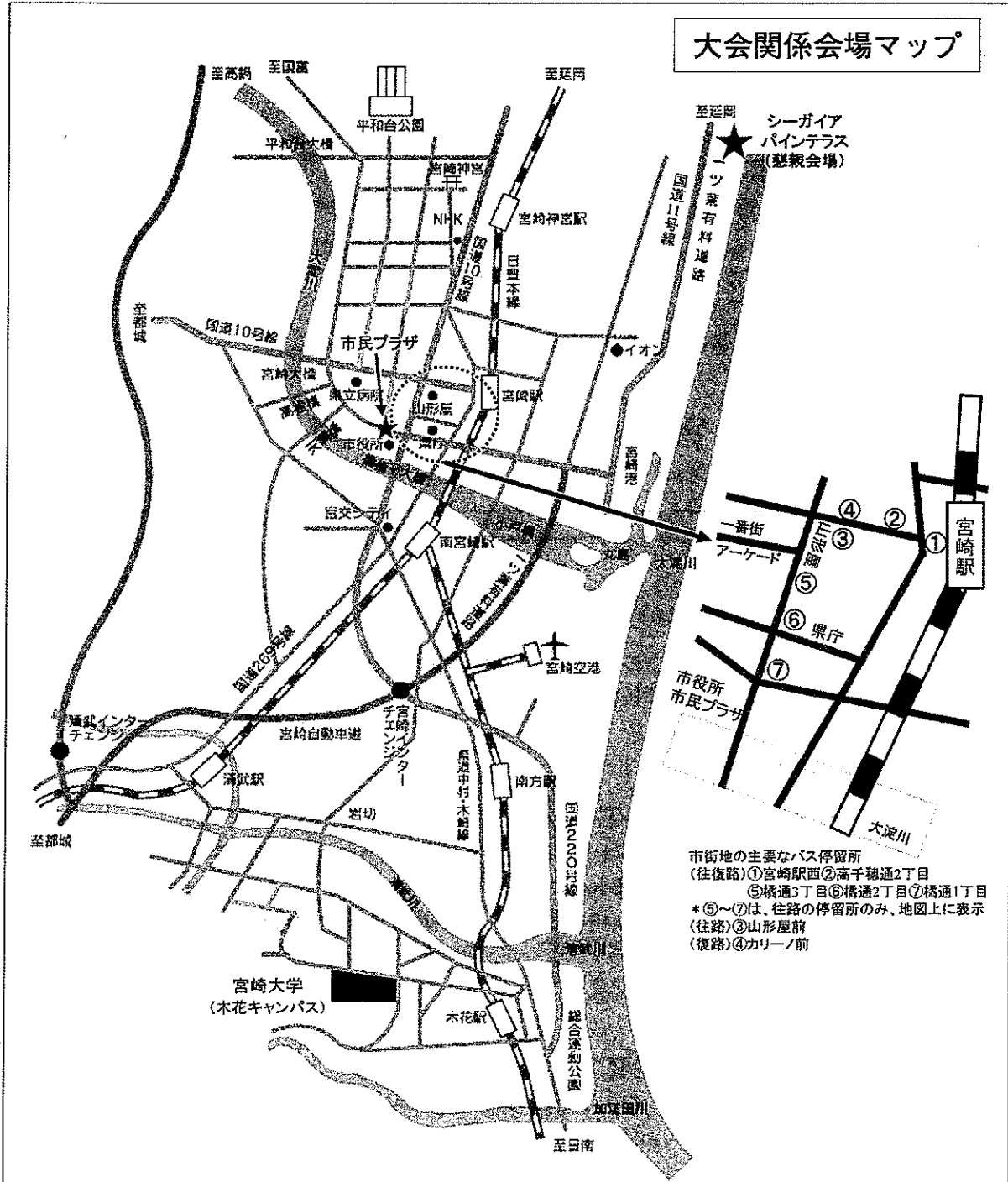
土曜日 (宮崎大学→市内)

経由	宮崎大学	(途中 省略)	宮交シティ	橋通南詰	橋通 1丁目	橋通 2丁目	橋通 3丁目	カーリーノ前	宮崎駅
省 略									
木花	15:29	…	15:52	…	15:58	15:59	16:01	16:03	16:07
まなび野	15:35	…	16:06	16:10	16:12	…	16:15	16:17	16:21
清武	15:39	…	16:07	16:11	16:13	…	16:16	16:18	16:22
まなび野	16:14	…	16:46	16:50	16:52	…	16:55	16:57	17:01
清武	16:23	…	16:51	16:55	16:57	…	17:00	17:02	17:06
木花	16:39	…	17:02	…	17:08	17:09	17:11	17:13	17:17
まなび野	16:55	…	17:26	17:30	17:32	…	17:35	17:37	17:41
清武	17:03	…	17:31	17:35	17:37	…	17:40	17:42	17:46
木花★19	17:29	…	17:52	…	17:58	17:59	18:01	18:03	18:07
清武★19	17:42	…	18:11	18:15	18:17	…	18:20	18:22	18:26
まなび野	17:55	…	18:26	18:30	18:32	…	18:35	18:37	18:41
清武	18:25	…	18:53	18:57	18:59	…	19:02	19:04	19:08
木花	18:29	…	18:52	…	18:58	18:59	19:01	19:03	19:07
まなび野	18:45	…	19:16	19:20	19:22	…	19:25	19:27	19:31
清武	19:23	…	19:48	19:52	19:54	…	19:57	19:59	20:03
まなび野	19:40	…	20:10	20:14	20:16	…	20:19	20:21	20:25
清武	20:03	…	20:28	20:32	20:34	…	20:37	20:39	20:43
まなび野	20:35	…	21:05	21:09	21:11	…	21:14	21:16	21:20

★印 9/19増便

# 懇親会会場

フェニックス・シーガイア・リゾート 1F バインテラス  
 〒 880-8545 宮崎県宮崎市山崎町浜山  
 TEL 0985-21-1111  
<http://www.seagaia.co.jp/>



# 第108回 日本繁殖生物学会大会プログラム

9月17日(木)

9月17日(木) 優秀発表賞(口頭発表二次審査) AW-1～AW-6 第3会場 13:00～14:30

## 卵巣

眞鍋 昇(大阪国際大) 久留主志朗(北里大)

AW-1 Transferrin-Fe<sup>3+</sup>は顆粒層細胞と卵丘細胞の機能性を亢進し、卵胞発育を誘導する

○河端 茜<sup>1</sup>, 内橋 しづき<sup>2</sup>, 島田 昌之<sup>3</sup>, 山下 泰尚<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>県立広島大院総合学術, <sup>2</sup>県立広島大生命環境, <sup>3</sup>広島大院生物圏科学)

AW-2 アクリルアミドゲル上での培養はブタ初期胞状卵胞の顆粒層細胞数を増加させ卵子の発育能力、脂質含量およびヒストンのアセチル化状態を向上させる

○宗像 祥久<sup>1</sup>, 河原 玲香<sup>2</sup>, 白砂 孔明<sup>1</sup>, 桑山 岳人<sup>1</sup>, 岩田 尚孝<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東農大院農畜, <sup>2</sup>東農大ゲノム)

## 卵・受精

河野友宏(東京農大) 井上貴美子(理研BRC)

AW-3 卵母細胞の紡錘体形成チェックポイントは、なぜ弱いのか？

○京極 博久, 北島 智也

(理研CDB)

## 生殖工学

長尾慶和(宇都宮大) 保地眞一(信州大)

AW-4 リンカーヒストンバリエントH1TはrDNA領域を標的とし、rRNAの発現を抑制する

○谷 瑠依子, 早川 晃司, 田中 智, 塩田 邦郎

(東大院農学生命, 細胞生化)

## 内分泌

橋爪 力(岩手大) 松田二子(名古屋大)

AW-5 コンディショナルKiss1KOマウスを用いたGnRHパルス発生機構の同定とKiss1可視化マウス in vitro系によるパルス発生分子メカニズムの解明

○池上 花奈<sup>1,3</sup>, 美辺 詩織<sup>1,3</sup>, 家田 菜穂子<sup>1,3</sup>, 渡辺 雄貴<sup>1,3</sup>, 後藤 哲平<sup>1,3</sup>, 中村 翔<sup>2,3</sup>, 井上 直子<sup>1</sup>, 前多 敬一郎<sup>2</sup>, 東村 博子<sup>1</sup>, 上野山 賀久<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>名大院生命農, <sup>2</sup>東大院農学生命, <sup>3</sup>学振特別研究員)

## 性周期・妊娠

山内伸彦(九州大) 小川英彦(東京農大)

AW-6 ウシ胚-子宮間における上皮間葉系転換(EMT)の時間特異的制御

○草間 和哉<sup>1</sup>, 白 汝嵐<sup>1</sup>, 中村 圭吾<sup>1</sup>, 安田 二郎<sup>2</sup>, 今川 和彦<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東大院農学生命 獣医繁殖育種学, <sup>2</sup>長崎大熱研 新興感染症学)

## 精巣・精子

与語圭一郎(静岡大) 鈴木伸之介(理研BRC)

- OR1-1** 自己複製因子GDNFに依存しない精子幹細胞の性状解析  
○高島 誠司  
(信州大繊維)
- OR1-2** 社会的生育環境要因が惹起する雄性生殖細胞系列および次世代へのエピジェネティック影響  
○小林 記緒<sup>1</sup>, 白形 芳樹<sup>1</sup>, 平館 裕希<sup>1</sup>, 岡江 寛明<sup>2</sup>, 樋浦 仁<sup>2</sup>, 原 健士朗<sup>1</sup>, 有馬 隆博<sup>2</sup>, 種村 健太郎<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東北大院農, <sup>2</sup>東北大院医)
- OR1-3** 低用量ビスフェノール類慢性暴露による マウス雄性生殖細胞エピジェネティック修飾への影響解析  
○白形 芳樹<sup>1</sup>, 小林 記緒<sup>1</sup>, 平館 裕希<sup>1</sup>, 岡江 寛明<sup>2</sup>, 樋浦 仁<sup>2</sup>, 原 健士朗<sup>1</sup>, 有馬 隆博<sup>2</sup>, 種村 健太郎<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東北大院農, <sup>2</sup>東北大院医)

吉崎悟郎(東京海洋大) 原健士朗(東北大)

- OR1-4** Cysteine dioxygenase 欠損マウスにおける雄性不妊メカニズムの解明  
○浅野 敦之<sup>1</sup>, Heather ROMAN<sup>2</sup>, Lawrence HIRSCHBERGER<sup>2</sup>, Martha STIPANUK<sup>2</sup>, Jacqueline NELSON<sup>3</sup>, Alexander TRAVIS<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>筑波大生命環境, <sup>2</sup>コーネル大人類生態学, <sup>3</sup>コーネル大獣医)
- OR1-5** HHV1-TKを組み込んだトランスジェニックラットの精巣に認められる精子形成異常の解析  
○陳 黙<sup>1</sup>, 西村 直人<sup>2</sup>, 菅野 尚子<sup>2</sup>, 蔡 立義<sup>4</sup>, 王 洪華<sup>4</sup>, 加藤 たか子<sup>1</sup>, 加藤 幸雄<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>明大研究知財, <sup>2</sup>明治大院農研, <sup>3</sup>明治大農, <sup>4</sup>中国無錫婦幼保健医院生殖医学センター)

野口純子(農業生物資源研) 高島誠司(信州大)

- OR1-6** 幼若期雄マウスへのペルメトリン投与による成熟期生殖機能影響解析  
○斉藤 洋克, 植松 未知, 白形 芳樹, 原 健士朗, 種村 健太郎  
(東北大院農, 動物生殖)
- OR1-7** 幼若期マウス雄性生殖細胞の放射線感受性に及ぼす線量率と照射時期の影響  
○渡部 浩之<sup>1</sup>, 香田 淳<sup>2</sup>, 立野 裕幸<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>旭川医大, <sup>2</sup>環境科学技術研究所)

## 内分泌

角川博哉(山口大) 若林嘉浩(農業生物資源研)

- OR2-1** メスとの同居はオスラットAVPVのKiss1発現およびLH分泌上昇を誘起する  
○渡辺 雄貴<sup>1,2</sup>, 井上 直子<sup>1</sup>, 池上 花奈<sup>1,2</sup>, 上野山 賀久<sup>1</sup>, 東村 博子<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>名大院生命農, <sup>2</sup>学振特別研究員DC)

**OR2-2** キスペプチン・GnRHニューロン間の ultra-short loop feedbackによる LH分泌促進機構

○家田 菜穂子<sup>1</sup>, 美辺 詩織<sup>1</sup>, 池上 花奈<sup>1</sup>, 井上 直子<sup>1</sup>, 上野山 賀久<sup>1</sup>, 前多 敬一郎<sup>2</sup>,  
東村 博子<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>名大院生命農, <sup>2</sup>東大院農生命)

田中知己(東京農工大) 家田菜穂子(名古屋大)

**OR2-3** Kappa opioid receptor (KOR) を介した性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) のパルス状分泌メカニズム解明のための遺伝子改変ラット

○高橋 宙大

(東大獣医繁殖)

**OR2-4** Deep sequencing of transcriptomes of anterior pituitary before and after ovulation in Japanese Black heifers

○Kiran PANDEY, Yoichi MIZUKAMI, Kenji WATANABE, Syuiti SAKAGUTI,  
Hiroya KADOKAWA

(Yamaguchi University)

東村博子(名古屋大) 森山隆太郎(近畿大)

**OR2-5** Effects of ERK1/2/5 and PKA pathway inhibitors on GPR30-specific agonist suppression of LH secretion from bovine anterior pituitary

○Faidiban O. RUDOLF, Hiroya KADOKAWA

(Faculty of Veterinary Medicine, Yamaguchi University)

**OR2-6** 樹脂製食器等に含まれる化合物, ビスフェノールSによるノンゲノミックな機構による LH分泌抑制作用

○大塚 緑, 角川 博哉

(山口大獣医)

---

9月17日(木) 第16回若手企画シンポジウム

多目的ホール

17:00 ~

---

9月18日(金)

9月18日(金) 一般口頭発表

OR1-8～OR1-12

第1会場

9:00～10:15

精巣・精子

原山 洋(神戸大) 種村健太郎(東北大)

OR1-8 精子免疫によるラット自己免疫性精巣炎

○野口 純子<sup>1</sup>, 渡辺 伸也<sup>2</sup>, 菊地 和弘<sup>1</sup>, 金子 浩之<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>農業生物資源研, <sup>2</sup>畜草研)

OR1-9 ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) を用いた豚精漿蛋白質の品種, 個体および採精日間で泳動パターンの比較

○松倉 大樹<sup>1</sup>, 奥山 みなみ<sup>2</sup>, 内倉 健造<sup>3</sup>, 山田 未知<sup>4</sup>, 片桐 成二<sup>2</sup>, 森好 政晴<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>酪農大獣医動物生殖, <sup>2</sup>北大獣医繁殖, <sup>3</sup>愛知農総試, <sup>4</sup>酪農大中小家畜飼養)

OR1-10 ブタ精子capacitationにおけるARとIDPcの役割の解析

○加藤 侑希<sup>1</sup>, 丹波 道子<sup>2</sup>, 菊地 和弘<sup>3</sup>, 松田 学<sup>2</sup>, 岡村 直道<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>茨城県立医療大学 人間科学センター, <sup>2</sup>筑波大学 医学医療系, <sup>3</sup>農業生物資源研)

高木優二(信州大) 絹川将史(家畜改良事業団)

OR1-11 水素分子処置がヒト精子の運動性機能を改善するメカニズムについて

○中田 久美子<sup>1</sup>, 小野 千紘<sup>1</sup>, 吉田 薫<sup>2</sup>, 吉田 雅人<sup>1</sup>, 吉田 学<sup>3</sup>, 山下 直樹<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>山下湘南夢クリニック, <sup>2</sup>桐蔭横浜大 先端医用工学センター, <sup>3</sup>東大院理)

OR1-12 グルコース非添加培養液により低下させたマウス精子の運動性は水素処置で改善する

○小野 千紘<sup>1</sup>, 中田 久美子<sup>1</sup>, 木島 大河<sup>2</sup>, 吉田 薫<sup>3</sup>, 吉田 学<sup>2</sup>, 山下 直樹<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>山下湘南夢クリニック, <sup>2</sup>東大院理, <sup>3</sup>桐蔭横浜大 先端医用工学センター)

9月18日(金) 一般口頭発表

OR1-13～OR1-17

第1会場

10:30～11:45

生殖工学

松本浩道(宇都宮大) 横尾正樹(秋田県立大)

OR1-13 性周期同期化と抗インヒビン血清を利用した効率的な近交系マウスの過排卵誘起法

○長谷川 歩未, 持田 慶司, 小倉 淳郎  
(理研BRC)

OR1-14 マウス異種間での体外受精と胚移植成績

○持田 慶司, 長谷川 歩未, 小倉 淳郎  
(理研BRC)

OR1-15 p53発現制御による4倍体マウスの作製

○堀居 拓郎<sup>1</sup>, 山本 正道<sup>2</sup>, 森田 純代<sup>1</sup>, 木村 美香<sup>1</sup>, 長尾 恭光<sup>3</sup>, 畑田 出穂<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>群馬大生調研ゲノムリソース, <sup>2</sup>京大院医, <sup>3</sup>自治医大実験医学セ)



岩田尚孝(東京農大) 杉村智史(東京農工大)

OR1-16 TEAD4発現抑制がウシ初期胚の発生および組織分化関連遺伝子発現におよぼす影響

○櫻井 伸行<sup>1</sup>, 高橋 一生<sup>2</sup>, 江村 菜津子<sup>2</sup>, 橋爪 力<sup>1,2</sup>, 澤井 健<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>岩手連大農, <sup>2</sup>岩手大農)

OR1-17 低品質胚と高品質胚のメタボローム解析による代謝中間体の解析と体外培養技術への応用

○西園 啓文<sup>1</sup>, 四ッ島 賢二<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>富山大生命先端研, <sup>2</sup>富山県畜産研)

9月18日(金) 一般口頭発表 OR2-7~OR2-12 第2会場 9:00~10:30

### 内分泌

上野山賀久(名古屋大) 羽田真悟(帯畜大)

OR2-7 ラット下垂体ならびに生殖器におけるNeuronatinの局在解析

○菅野 尚子<sup>1</sup>, 樋口 雅司<sup>2,3</sup>, 吉田 彩舟<sup>4</sup>, 八子 英司<sup>4</sup>, 陳 黙<sup>2,3</sup>, 上春 浩貴<sup>1,5</sup>, 西村 直人<sup>1</sup>,  
西原 大翔<sup>1</sup>, 加藤 たか子<sup>2,3</sup>, 加藤 幸雄<sup>1,6</sup>  
(<sup>1</sup>明大院農, <sup>2</sup>明大研究知財, <sup>3</sup>明大生殖内分泌研, <sup>4</sup>学振研究員PD, <sup>5</sup>学振研究員DC1, <sup>6</sup>明大農)

OR2-8 Acute regulation of insulin-like peptide 3 secretion in peripheral blood by LH in pubertal Japanese Black beef bulls

○M A HANNAN<sup>1</sup>, Yuri FUKAMI<sup>1</sup>, Noritoshi KAWATE<sup>1</sup>, Mitsuhiro SAKASE<sup>2</sup>,  
Moriyuki FUKUSHIMA<sup>2</sup>, Indunil N PATHIRANA<sup>3</sup>, Erika E BÜLLESBACH<sup>4</sup>,  
Toshio INABA<sup>1</sup>, Hiromichi TAMADA<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, <sup>2</sup>Northern  
Center of Agricultural Technology, Technological Center of Hyogo Prefecture for Agriculture,  
Forest and Fishery, <sup>3</sup>Department of Animal Science, University of Ruhuna, Sri Lanka, <sup>4</sup>Department  
of Biochemistry and Molecular Biology, Medical University of South Carolina, USA)

### 卵巣

作本亮介(農業生物資源研) 杉浦幸二(東京大)

OR2-9 in vitro で分化したマウス胎仔卵巣における網羅的遺伝子発現解析

○谷本 連<sup>1</sup>, 諸白 家奈子<sup>1</sup>, 河野 友宏<sup>1</sup>, 平尾 雄二<sup>2</sup>, 尾畑 やよい<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東農大バイオ, <sup>2</sup>畜草研)

OR2-10 プロゲステロン代謝抑制が誘導するブタ卵胞選抜メカニズム

○岡本 麻子<sup>1</sup>, 金子 亜絵里<sup>2</sup>, 池田 真規<sup>1</sup>, 島田 昌之<sup>3</sup>, 山下 泰尚<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>県立広島大院総合学術, <sup>2</sup>県立広島大生命環境, <sup>3</sup>広島大院生物圏科学)

手塚雅文(帯畜大) 小林純子(北海道大)

OR2-11 酸化ストレス依存的な排卵障害に対するCoenzymeQ10の保護効果

○國府 大智<sup>1</sup>, 谷 真一<sup>3</sup>, 大原 高秋<sup>3</sup>, 細江 和典<sup>3</sup>, 清水 隆<sup>2</sup>, 宮崎 均<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>筑波大院生命環境, <sup>2</sup>帯畜大院畜産, <sup>3</sup>(株)カネカ)

**OR2-12 Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  plays a role in hypoxia-increased progesterone synthesis during luteinization of granulosa cells**

○ FADHILLAH<sup>1</sup>, Yuki YAMAMOTO<sup>1</sup>, Koji KIMURA<sup>1</sup>, Ryo NISHIMURA<sup>2</sup>,  
Kiyoshi OKUDA<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University, <sup>2</sup>Joint Department of Veterinary Medicine, Tottori University)

---

**9月18日(金) 一般口頭発表 OR2-13～OR2-16 第2会場 10:45～11:45**

---

**性周期・妊娠**

三浦亮太郎(農研機構動衛研) 高橋 透(岩手大)

**OR2-13 超音波検査を用いた牛子宮内膜厚の計測および標準化手法に関する検討**

○ 杉浦 智親<sup>1</sup>, 片桐 成二<sup>2</sup>, 秋吉 俊<sup>3</sup>, 井上 文博<sup>3</sup>, 奥山 みなみ<sup>2</sup>, 柳川 洋二郎<sup>2</sup>, 田島 誉士<sup>1</sup>,  
森好 政晴<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>酪農大院生産動物, <sup>2</sup>北大獣医繁殖, <sup>3</sup>酪農大動物生殖)

**OR2-14 Myofibroblast presence and their differentiation in the progression of equine endometrosis**

○ Anna Zuzanna SZOSTEK<sup>1,2</sup>, Dariusz Jan SKARZYNSKI<sup>1</sup>, Kiyoshi OKUDA<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Reproductive Immunology and Pathology, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Poland, <sup>2</sup>Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University)

片桐成二(北海道大) 山本ゆき(岡山大)

**OR2-15 Macrophage migration inhibitory factor expression is higher in postovulation than estrous and corpus luteum phases in bovine oviducts**

○ Asrafun NAHAR, Hiroya KADOKAWA

(Yamaguchi University)

**OR2-16 Evidence that oviduct-sperm-immune cells interaction ensures Th2 environment in bovine oviduct immunity for protecting sperm survival**

○ Mohamed Samy YOUSEF<sup>1,2</sup>, Mohamed Ali MAREY<sup>1,3</sup>, Kazuhiro MORITA<sup>1</sup>,  
Nina HAMBRUCH<sup>4</sup>, Hiroyuki HAYAKAWA<sup>5</sup>, Takashi SHIMIZU<sup>1</sup>, Christiane PFARRER<sup>4</sup>,  
Khalifa ABDEL-RAZEK<sup>2</sup>, Akio MIYAMOTO<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine, <sup>2</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Assiut University, Egypt, <sup>3</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Damanhur University, Egypt, <sup>4</sup>University of Veterinary Medicine Hannover, Germany, <sup>5</sup>Genetics Hokkaido Association)

---

**9月18日(金) 男女共同参画推進ランチョンセミナー 第1会場 12:00～**

---

卵子および胚の低温生物学的特性とガラス化凍結保存に関する研究

枝重 圭祐 (高知大学 農学部)

ウシ卵胞機能の調節機序に関する分子細胞学的研究

清水 隆 (帯広畜産大学 畜産衛生学研究部門)

水酸化アルミニウムゲルを利用したFSH単回投与によるウシ過剰排卵誘起法の開発

木村 康二 (岡山大学 農学部)

9月19日(土)

9月19日(土) 一般口頭発表

OR1-18～OR1-24

第1会場

9:00～10:45

生殖工学

柏崎直巳(麻布大) 岸上哲士(山梨大)

OR1-18 ドナー核注入後に時間を置いて除核する方法で作製したラットクローン胚盤胞

○原 弘真<sup>1</sup>, 滝澤 明子<sup>2</sup>, 後藤 哲平<sup>1</sup>, 三宝 誠<sup>1</sup>, 小林 俊寛<sup>3</sup>, 中内 啓光<sup>3</sup>, 保地 眞一<sup>4</sup>,  
平林 真澄<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>生理研, <sup>2</sup>ウイスコンシン医科大学, <sup>3</sup>東大医科研, <sup>4</sup>信大繊維)

OR1-19 遺伝子改変疾患モデルブタの開発における胚盤胞補完法の意義：新生仔致死性形質の救済と有性生殖への橋渡し

○松成 ひとみ<sup>1,2</sup>, 渡邊 将人<sup>1</sup>, 中野 和明<sup>2</sup>, 浅野 吉則<sup>2</sup>, 内倉 鮎子<sup>2</sup>, 畑江 将太<sup>2</sup>, 武石 透輝<sup>2</sup>,  
福田 暢<sup>2</sup>, 八島 紗耶香<sup>2</sup>, 梅山 一大<sup>1</sup>, 長屋 昌樹<sup>1</sup>, 絵野沢 伸<sup>3</sup>, 梅澤 あきひろ<sup>3</sup>,  
長嶋 比呂志<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>明大バイオリソース研究国際インスティテュート, <sup>2</sup>明大農, <sup>3</sup>国立成育医療研究センター)

OR1-20 胚盤胞補完法はIL2RG 遺伝子ノックアウト免疫不全ブタの免疫細胞を救済する

○中野 和明<sup>1</sup>, 渡邊 将人<sup>2</sup>, 松成 ひとみ<sup>1,2</sup>, 内倉 鮎子<sup>1</sup>, 浅野 吉則<sup>1</sup>, 武石 透輝<sup>1</sup>, 畑江 将太<sup>1</sup>,  
高草木 大地<sup>1</sup>, 梅木 育磨<sup>1</sup>, 福田 暢<sup>1</sup>, 八島 紗耶香<sup>1</sup>, 勝俣 佑紀<sup>1</sup>, 梅山 一大<sup>2</sup>, 長屋 昌樹<sup>2</sup>,  
花園 豊<sup>3</sup>, 長嶋 比呂志<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>明大農, <sup>2</sup>明大バイオリソース研究国際インスティテュート, <sup>3</sup>自治医大再生医学研究部)

小林正之(秋田県立大) 原 弘真(生理研)

OR1-21 マウスおよびカニクイザル多能性幹細胞におけるCRISPR/Cas9を用いた発現増幅型多能性幹細胞レポーターのノックイン

○築山 智之<sup>1</sup>, 丹羽 仁史<sup>2,3</sup>, 岩谷 千鶴<sup>1</sup>, 土屋 英明<sup>1</sup>, 清田 弥寿成<sup>1</sup>, 松下 淳<sup>1</sup>, 依馬 正次<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>滋賀医大, <sup>2</sup>熊大発生研, <sup>3</sup>理研CDB)

OR1-22 移植環境下における精子幹細胞の自己複製と分化のバランスの継時的変化

○中村 隼明<sup>1,2</sup>, 今 弥生<sup>1</sup>, 吉田 松生<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>基生研生殖細胞, <sup>2</sup>学振)

鈴木宏志(帯畜大) 松成ひとみ(明治大)

OR1-23 胚発生過程においてDNAメチル化酵素がアクセス可能な遺伝子座のスクリーニング

○佐々木 恵亮<sup>1</sup>, 原 聡史<sup>1,2</sup>, 山上 怜奈<sup>1</sup>, 竹内 秀斗<sup>1</sup>, 長谷川 沙紀<sup>1</sup>, 小肩 実央<sup>1</sup>, 河野 友宏<sup>1</sup>,  
尾畑 やよい<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東農大バイオ, <sup>2</sup>現所属: 成育医療センター)

OR1-24 胎盤形成過程におけるSfmbt2 マイクロ(mi) RNAクラスターの役割の解明

○井上 貴美子<sup>1,2</sup>, 廣瀬 美智子<sup>1</sup>, 畑中 勇輝<sup>1</sup>, 井上 弘貴<sup>1</sup>, 本多 新<sup>1,3</sup>, 長谷川 歩未<sup>1</sup>,  
持田 慶司<sup>1</sup>, 小倉 淳郎<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>理研BRC, <sup>2</sup>筑波大院生命環境, <sup>3</sup>宮崎大医)

## 卵・受精

小倉淳郎(理研BRC) 平舘裕希(東北大)

OR1-25 雌性発生胚を活用した Post-Bisulfite Adapter-Tagging 法によるマウスDNAメチローム解析  
濱崎 伸彦<sup>1,2</sup>, 上坂 将弘<sup>1,2</sup>, 阿形 清和<sup>2</sup>, 中島 欽一<sup>1</sup>, ○今村 拓也<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>九大医, <sup>2</sup>京大理)

OR1-26 小規模ショットガンバイサルファイトシーケンス解析による生殖細胞系列における反復配列特性の解明  
○小林 久人<sup>1</sup>, 小池 佐<sup>2</sup>, 坂下 陽彦<sup>2</sup>, 田中 啓介<sup>1</sup>, 河野 友宏<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>東農大ゲノム, <sup>2</sup>東農大バイオ)

尾畑やよい(東京農大) 塚本智史(放医研)

OR1-27 マウス卵成熟過程におけるTauの発現とリン酸化パターンの解析  
○平舘 裕希<sup>1</sup>, 井上 宏貴<sup>1,2</sup>, 小倉 淳郎<sup>2</sup>, 種村 健太郎<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東北大院農, <sup>2</sup>理研BRC)

OR1-28 着床前胚におけるレトロトランスポゾン抑制制御機構の解明  
畑中 勇輝<sup>1</sup>, 井上 貴美子<sup>1,2</sup>, 及川 真実<sup>1</sup>, 上村 悟<sup>1</sup>, 越後貫 成美<sup>1</sup>, 児玉 栄一<sup>3</sup>, 大川 恭行<sup>4</sup>,  
東田 裕一<sup>5</sup>, ○小倉 淳郎<sup>1,2,6</sup>  
(<sup>1</sup>理研BRC, <sup>2</sup>筑波大院生命環境, <sup>3</sup>東北大院医, <sup>4</sup>九州大院医, <sup>5</sup>九州大院システム生命, <sup>6</sup>東大院医)

## 性周期・妊娠

白砂孔明(東京農大) 木崎景一郎(岩手大)

OR2-17 PRL, EGF, 4-OH-E<sub>2</sub> 複合添加培地で培養したマウス体外受精由来胚盤胞の着床能力  
○竹内 美紀<sup>1</sup>, 高橋 明仁<sup>1</sup>, 古川 悦子<sup>1</sup>, 福井 えみ子<sup>2</sup>, 吉澤 緑<sup>2</sup>, 松本 浩道<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>宇都宮大院農, <sup>2</sup>宇都宮大農)

OR2-18 一連の現象としてのウシ胚の子宮内膜への接着に関わる因子群  
○白 汝嵐<sup>1</sup>, 草間 和哉<sup>1</sup>, 久世 真理子<sup>2</sup>, 奥田 潔<sup>2</sup>, 今川 和彦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東大院農生, <sup>2</sup>岡山大院環生)

奥山みなみ(北海道大) 松山秀一(農研機構畜草研)

OR2-19 軽度の低酸素環境はヒト栄養膜細胞株の炎症応答を抑制制御する  
○白砂 孔明<sup>1</sup>, 島村 成美<sup>1</sup>, 妹尾 琴実<sup>1</sup>, 大津 彩華<sup>1</sup>, 白築 章吾<sup>1</sup>, 大口 昭英<sup>2</sup>, 岩田 尚孝<sup>1</sup>,  
桑山 岳人<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東京農大, <sup>2</sup>自治医大)

OR2-20 黒毛和種における発情時の乗駕許容, 歩数および体温の様相  
○後田 夏希<sup>1</sup>, 山中 賢一<sup>1</sup>, 阪谷 美樹<sup>2</sup>, 和田 康彦<sup>1</sup>, 竹之内 直樹<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>佐賀大院農, <sup>2</sup>九沖農研)

阪谷美樹(農研機構九沖農研) 平山博樹(東京農大)

**OR2-21 経産豚における人工授精時の精漿成分投与の有無が受胎性に及ぼす効果の検討**

○奥山 みなみ<sup>1</sup>, 森好 政晴<sup>2</sup>, 片桐 成二<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>北大獣医繁殖, <sup>2</sup>酪農大獣医動物生殖)

**OR2-22 RNA採血管によるウシの妊娠情報の収集と早期妊娠判定への適用**

○吉野 仁美<sup>1</sup>, 木崎 景一郎<sup>1</sup>, 平田 統一<sup>2</sup>, 山岸 則夫<sup>1</sup>, 高橋 透<sup>1</sup>, 居在家 義昭<sup>1</sup>, 佐々木 恒弥<sup>3</sup>,  
橋爪 一善<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岩手大農, <sup>2</sup>岩手大農FSC, <sup>3</sup>いわて総合動物病院)

9月19日(土) 一般口頭発表 OR2-23~OR2-26 第2会場 10:45~11:45

**臨床・応用技術**

緒方和子(宇都宮大) 吉岡耕治(農研機構動衛研)

**OR2-23 ニワトリ凍結融解精子の生存性へ及ぼすコレステロール充填の効果**

○牛山 愛<sup>1</sup>, 田島 淳史<sup>2</sup>, 石川 尚人<sup>2</sup>, 浅野 敦之<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>筑波大院生命環境, <sup>2</sup>筑波大生命環境系)

**OR2-24 乳用牛における人工授精時の腔鏡利用は受胎に影響するのか**

○石山 大  
(東大院農学生命)

的場理子(農研機構畜草研) 伊賀浩輔(農研機構東北農研)

**OR2-25 種雌豚の子宮内膜における細菌検査および細胞診のためのサイトブラシの開発**

○下平 倫子<sup>1</sup>, 日高 良一<sup>2</sup>, 井上 浩一<sup>3</sup>, 北原 豪<sup>1</sup>, 大澤 健司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>宮崎大臨床繁殖, <sup>2</sup>日高養豚場, <sup>3</sup>(株)富士平工業)

**OR2-26 牛子宮内膜炎治療薬としてのポリビニルピロリドンヨード液の最適子宮内注入濃度および量について —in vitro における検討**

○伊賀崎 大, 三堂 祥吾, 北原 豪, 大澤 健司  
(宮崎大臨床繁殖)

9月19日(土) シンポジウム1 第1会場 13:00~15:00

**In vitro における生殖細胞形成研究の最新トピックス**

平尾雄二(農研機構畜草研) 吉崎悟朗(東京海洋大)

**S1-1 器官培養法によるマウス精子形成の誘導と維持**

小川 毅彦  
(横浜市立大学 医学部)

**S1-2 in vitro において産生されたマウス卵の発生能**

尾畑 やよい  
(東京農業大学 応用生物科学部)

S1-3 雌性生殖細胞系列サイクルの試験管内再構成

林 克彦

(九州大学 大学院医学研究院)

S1-4 ナイーブ型多能性幹細胞を生殖細胞に直接変換する試み

松居 靖久

(東北大学 加齢医学研究所)

9月19日(土) シンポジウム2

第2会場 13:00～15:00

肉用牛の繁殖を考える

大澤健司(宮崎大) 鍋西 久(宮崎県畜試)

S2-1 肉用牛の胚・子牛生産効率を上げるには

橋谷田 豊

(家畜改良センター 企画調整部)

S2-2 暑熱ストレスと肉用牛繁殖性—初期胚発生の観点から—

阪谷 美樹

(九州沖縄農業研究センター 畜産草地研究領域)

S2-3 生産現場における肉用牛(黒毛和種牛)の特性を理解した繁殖管理

上松 瑞穂

(みやざき農業共済組合 生産獣医療課)

9月19日(土) 一般口頭発表

OR1-29～OR1-36

第1会場 15:00～17:00

卵・受精

永野昌志(北海道大) 中田久美子(山下湘南夢クリニック)

OR1-29 受精前後のマウス卵細胞質における脂肪滴の動態観察

○塚本 智史<sup>1</sup>, 原 太一<sup>2</sup>, 南 直治郎<sup>3</sup>, 佐藤 健<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>放医研 研究基盤センター, <sup>2</sup>群大生調研, <sup>3</sup>京大院農)

OR1-30 Hanging Drop法を用いた体外成熟単培養系におけるマウス卵母細胞へのネオニコチノイド類暴露影響解析

○猪股 大貢, 原 健士朗, 種村 健太郎

(東北大院農)

内藤邦彦(東京大) 井上直子(名古屋大)

OR1-31 牛の卵子品質と卵巣内卵胞数の関係: 体内および体外発育卵子を用いた予備的検討

○永井 克尚, 杉山 ちさと, 楊 応華, 柳川 洋二郎, 片桐 成二, 永野 昌志

(北大 獣医繁殖)

OR1-32 IVM中のブタ小中卵胞由来COC, 裸化卵母細胞, 卵丘細胞内のcAMPおよびcGMP量

○奥平 裕一, 若井 拓哉, 舟橋 弘晃

(岡大院環境生命科学)

OR1-33 プロジェステロンによる成熟時ウシ卵丘卵母細胞複合体のC 21ステロイド産生調節

○安保 信周, 高木 諒, 手塚 雅文

(帯畜大院, 畜産生命科学)

舟橋弘晃(岡山大) 木村直子(山形大)

OR1-34 ウシ卵子・卵丘細胞の受精時におけるToll様受容体の発現と機能

○高木 諒, 安保 信周, 手塚 雅文

(帯畜大院)

OR1-35 Improved *in vitro* maturation of bovine oocytes increases blastocyst formation rate

○Sofia SOTO-RODRIGUEZ<sup>1</sup>, Cynthia GUTNISKY<sup>2</sup>, Gabriel ALVAREZ<sup>2</sup>, Gabriel DALVIT<sup>2</sup>, Masashige KUWAYAMA<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Repro-Support Medical Research Centre, <sup>2</sup>School of Veterinarians, University of Buenos Aires, Argentina)

OR1-36 肝障害により発生能が低下したウシ卵子の成熟培地におけるグルタチオンエチルエステル添加の影響

○ボラジギン サラントラガ<sup>1</sup>, 加藤 大樹<sup>1,2</sup>, 緒方 和子<sup>1,4</sup>, 山口 美緒<sup>1,3</sup>, 原 明日香<sup>1,3</sup>, 佐藤 あかね<sup>1,3</sup>, 福森 理加<sup>1,2,3</sup>, 長尾 慶和<sup>1,2,3</sup>

(<sup>1</sup>宇都宮大農附属農場, <sup>2</sup>宇都宮大学院農, <sup>3</sup>東京農工大連合農, <sup>4</sup>宇都宮大地域共生センター)

9月19日(土) 一般口頭発表

OR2-27~OR2-34

第2会場 15:00~17:00

#### 臨床・応用技術

居在家義昭(岩手大) 窪 友瑛(岐阜大院連獣)

OR2-27 正常発情周期を営むウシにおける尾根部腹側体表温の無線連続測定による排卵時期予測の可能性

○三浦 亮太郎<sup>1</sup>, 吉岡 耕治<sup>1</sup>, 宮本 亨<sup>1</sup>, 野上 大史<sup>2</sup>, 伊藤 寿浩<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>動衛研, <sup>2</sup>九大院, <sup>3</sup>産総研)

OR2-28 尾根部に装着した体表温センサによる発情誘起牛における排卵時間の予測の試み

○的場 理子<sup>1</sup>, 三浦 亮太郎<sup>2</sup>, 吉岡 耕治<sup>2</sup>, 平子 誠<sup>1</sup>, 宮本 亨<sup>2</sup>, 下司 雅也<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>農研機構畜草研, <sup>2</sup>農研機構動衛研)

遠藤なつ美(東京農工大) 平田統一(岩手大)

OR2-29 黒毛和種経産牛におけるショートシंक処置時の卵巣動態と受胎率との関係

○椿下 祐史<sup>1</sup>, 邊見 広一郎<sup>2</sup>, 小林 郁雄<sup>2</sup>, 上松 瑞穂<sup>3</sup>, 北原 豪<sup>1</sup>, 大澤 健司<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>宮崎大臨床繁殖, <sup>2</sup>宮崎大フィールド科学教育研究センター, <sup>3</sup>みやざき農業共済組合)

OR2-30 牛において授精後23日で不受胎を確定して翌日に定時授精を実施する繁殖プロトコルの開発

○会津 満理奈<sup>1</sup>, 和田 夏海<sup>1</sup>, 窪 友瑛<sup>2</sup>, 居在家 義昭<sup>1,2</sup>, 高橋 透<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>岩手大農, <sup>2</sup>岐阜大院連合獣医)



**OR2-31 時間分解蛍光免疫測定法によるウシ妊娠関連糖タンパク質2の測定系の構築**

○和田 夏海<sup>1</sup>, 会津 満理奈<sup>1</sup>, 窪 友瑛<sup>2</sup>, 居在家 義昭<sup>1,2</sup>, 高橋 透<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>岩手大農, <sup>2</sup>岐阜大院連合獣医)

美辺詩織(農研機構畜草研) 松井基純(帯畜大)

**OR2-32 アルギニンの単回大量静脈内投与がウシの受胎性に及ぼす影響**

○平田 統一<sup>1</sup>, 喜多 一美<sup>1</sup>, 牧野 良輔<sup>2</sup>, 伊藤 謙<sup>2</sup>, 高橋 愛衣<sup>1</sup>, 岡田 徹<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>岩手大農, <sup>2</sup>岩手大連合農, <sup>3</sup>あすかアニマルヘルス)

**OR2-33 分娩後の乳牛における血中βヒドロキシ酪酸およびアミノ酸濃度と周産期異常がその後の繁殖性に及ぼす効果の検討**

○南田 枝理子<sup>1</sup>, 杉浦 智親<sup>1</sup>, 今井 文<sup>1</sup>, 新免 明恵<sup>1</sup>, 森好 政晴<sup>1</sup>, 三上 貴史<sup>2</sup>, 藤條 武司<sup>2</sup>, 片桐 成二<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>酪農大獣医 動物生殖学, <sup>2</sup>味の素, <sup>3</sup>北大獣医 繁殖)

**OR2-34 繁殖和牛における放牧中と終了後との血液および卵胞液中カロテノイド量の比較**

○谷 千賀子<sup>1</sup>, 眞岡 孝至<sup>2</sup>, 谷 峰人<sup>3</sup>, 森友 靖生<sup>4</sup>, 岡田 徹<sup>5</sup>, 北原 豪<sup>6</sup>, 片本 宏<sup>7</sup>

(<sup>1</sup>宮崎大医学獣医学総合, <sup>2</sup>生産開発研究所, <sup>3</sup>東海大 大動物臨床繁殖, <sup>4</sup>東海大 動物生体機構, <sup>5</sup>あすかアニマルヘルス, <sup>6</sup>宮崎大 産業動物臨床繁殖, <sup>7</sup>宮崎大 産業動物内科)

9月20日(日)

9月20日(日) シンポジウム3 宮崎市民プラザ オルブライトホール 9:30～12:00

生命のリサイクル：初期発生から次世代へ

南直治郎(京都大) 松本和也(近畿大)

- S3-1 初期胚発生及びリプログラミングにともなうオープンクロマチン構造の変化と転写との関係  
宮本 圭  
(近畿大学 生物理工学部)
- S3-2 受精後のユビキチン-プロテアソーム分解系と胚発生  
Seung-Wook Shin  
(アメリカ国立衛生研究所)
- S3-3 受精後に起こるオートファジーを介したリサイクリングシステムの役割  
塚本 智史  
(放射線医学総合研究所)
- S3-4 マウス着床前胚の細胞分化制御における Hippo 経路と細胞極性の役割  
平手 良和  
(東京医科歯科大学 実験動物センター)
- S3-5 マウス始原生殖細胞によるエピゲノムリプログラミング  
関 由行  
(関西学院大学 理工学部)

9月20日(日) ワークショップ 宮崎市民プラザ 大会議室 9:30～12:00

Novel concepts of immune system for regulating early pregnancy: Attack or tolerance?

宮本明夫(帯畜大) 今川和彦(東京大)

- WS-1 The Innate Immune Functions of Male and Female Germ Cells  
—Does TLR family reduce the risk of infection during fertilization or induce successful fertilization?—  
Masayuki SHIMADA  
(Hiroshima University)
- WS-2 Local Immune System in the Oviduct—How do the immune cells react to sperm? :  
Support, ignore or attack?—  
Akio MIYAMOTO  
(Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine)

WS-3 Early Placentation and Local Immune Regulation  
—Why the function of so many immune systems is required for pregnancy establishment?  
Does each of them function similarly?—  
Kazuhiko IMAKAWA  
(The University of Tokyo)

---

9月20日(日) WCRB2017プレ企画ランチョンセミナー 宮崎市民プラザ大会議室 12:00～13:00

---

---

9月20日(日) 市民公開講座 宮崎市民プラザオルブライトホール 13:00～16:00

---

## ポスター発表

9月17日(木) 優秀発表賞ポスター発表 P-1\*~P-21\* ポスター会場 15:00~16:30

### 内分泌

- P-1\* プロトン刺激による性腺刺激ホルモン産生細胞株の応答解析  
○持丸 雄太<sup>1</sup>, 新堂 真実<sup>2</sup>, 西田 真実<sup>2</sup>, 金子 諒<sup>2</sup>, 加藤 幸雄<sup>2,3</sup>, 戸村 秀明<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>明大院農生命, <sup>2</sup>明大農生命, <sup>3</sup>明大生殖内分泌研)
- P-2\* ガウシアルシフェラーゼを利用した高感度ホルモン分泌アッセイ系の構築の試み  
○佐藤 一裕<sup>1</sup>, 根岸 潤<sup>2</sup>, 中倉 敬<sup>3</sup>, 草田 智之<sup>2</sup>, 加藤 幸雄<sup>2,4</sup>, 戸村 秀明<sup>2,4</sup>  
(<sup>1</sup>明大院農生命, <sup>2</sup>明大農生命, <sup>3</sup>帝京大医解剖, <sup>4</sup>明大生殖内分泌研)

### 卵巣

- P-3\* Kiss1 遺伝子ノックアウト雌ラットの幼若期における卵胞発育  
○鈴木 美帆<sup>1</sup>, 田中 啓陽<sup>1</sup>, 田中 恵<sup>1</sup>, 長谷川 雄太<sup>1</sup>, 末岡 花菜子<sup>1</sup>, 上野山 賀久<sup>2</sup>, 東村 博子<sup>2</sup>, 井上 直子<sup>2</sup>, 中村 翔<sup>3</sup>, 前多 敬一郎<sup>3</sup>, 代田 真理子<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>麻布大獣医, <sup>2</sup>名大院生命農, <sup>3</sup>東大院農生命)
- P-4\* 低酸素刺激はメタボリックリプログラミングを介してウシ顆粒層細胞の増殖を促すか?  
○白築 章吾<sup>1</sup>, 猪股 瑛生<sup>2</sup>, 原 友孝<sup>2</sup>, 白砂 孔明<sup>1</sup>, 桑山 岳人<sup>1</sup>, 岩田 尚孝<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東農大院畜産, <sup>2</sup>東農大畜産)
- P-5\* 乳牛における分娩後早期の卵胞ウェーブと排卵パターン  
○日下 裕美, 三浦 弘, 菊池 元宏, 坂口 実  
(北里大獣医)
- P-6\* カラー Doppler 超音波検査を用いた妊娠初期ウシ黄体の血流動態解析  
○窪 友瑛<sup>1</sup>, 金澤 朋美<sup>1</sup>, 居在家 義昭<sup>1,2</sup>, 高橋 透<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>岐阜大院連合獣医, <sup>2</sup>岩手大農)

### 精巣・精子

- P-7\* 精子幹細胞自己複製因子 FGF2 の精巣内発現挙動解析  
○八木 瑞貴, 川原 和, 小川 隼斗, 高島 誠司  
(信州大繊維 応生生物機能)

### 卵・受精

- P-8\* 卵子内ミトコンドリアのリニューアル能力は加齢によって低下する  
○竹尾 駿, 阿部 崇人, 白砂 孔明, 桑山 岳人, 岩田 尚孝  
(東農大院畜産)

- P-9\*** GV期ウシ卵丘卵母細胞複合体の裸化处理が胚盤胞の体外作出に及ぼす影響  
○田島 和弥<sup>1</sup>, 平林 真澄<sup>2</sup>, 保地 真一<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>信大院理工, <sup>2</sup>生理研, <sup>3</sup>信大繊維)
- P-10\*** コエンザイムQ10がマウス体外老化卵母細胞の受精とその後の発生に及ぼす影響  
○内堀 翔<sup>1</sup>, 樋口 智香<sup>1</sup>, 守田 昂太郎<sup>1</sup>, 塚口 智将<sup>1</sup>, 安齋 政幸<sup>1,2</sup>, 山縣 一夫<sup>1</sup>, 細井 美彦<sup>1</sup>,  
宮本 圭<sup>1</sup>, 松本 和也<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>近大院, <sup>2</sup>近大先技総研)
- P-11\*** ホメオタンパク質EGAM1Nの強制発現がマウスES細胞の心筋分化に与える影響  
○野中 愛純<sup>1</sup>, 吉田 美智子<sup>1</sup>, 菊地 貴裕<sup>1</sup>, 熊谷 友希<sup>1</sup>, 佐々木 玲<sup>1,2</sup>, 小林 正之<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>秋田県大院生物資源, <sup>2</sup>秋田県総食研セ)
- P-12\*** マウス胚におけるプロテアソーム系の一過性の阻害は胚性ゲノム活性化の開始を遅延し、産仔への発生を損なう  
○樋口 智香<sup>1</sup>, 清水 なつみ<sup>2</sup>, 守田 昂太郎<sup>1</sup>, 内堀 翔<sup>1</sup>, 塚口 智将<sup>1</sup>, 永井 宏平<sup>1</sup>, 安齋 政幸<sup>1,3</sup>,  
山縣 一夫<sup>1</sup>, 細井 美彦<sup>1</sup>, 宮本 圭<sup>1</sup>, 松本 和也<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>近大院生物理工, <sup>2</sup>広大原医研, <sup>3</sup>近大先技総研)
- P-13\*** マウス卵の初期発生過程におけるミトコンドリア呼吸鎖複合体タンパク質の発現および母体の加齢の影響  
○渡辺 連<sup>1</sup>, 藤井 順逸<sup>2</sup>, 木村 直子<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岩手大院連合農, <sup>2</sup>山形大院医)
- P-14\*** EGAM1 ホメオタンパク質群の共発現がマウスiPS細胞の樹立効率に及ぼす影響  
○菊地 貴裕<sup>1</sup>, 野中 愛純<sup>1</sup>, 熊谷 友希<sup>1</sup>, 佐々木 玲<sup>1,2</sup>, 福田 智一<sup>3</sup>, 小林 正之<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>秋田県大院生物資源, <sup>2</sup>秋田総合食品センター, <sup>3</sup>東北大院農)
- P-15\*** マウス前核期胚の核内においてPeroxisome (Prdx) が過酸化水素の消去に關与する  
○守田 昂太郎<sup>1</sup>, 野老 美紀子<sup>3</sup>, 樋口 智香<sup>1</sup>, 内堀 翔<sup>1</sup>, 塚口 智将<sup>1</sup>, 永井 宏平<sup>1</sup>, 安齋 政幸<sup>1,2</sup>,  
山縣 一夫<sup>1</sup>, 細井 美彦<sup>1</sup>, 宮本 圭<sup>1</sup>, 松本 和也<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>近大院生物理工, <sup>2</sup>近大先技総研, <sup>3</sup>浅田レディース)

## 生殖工学

- P-16\*** Fibrillin-1 遺伝子ノックアウトによる Marfan 症候群モデルブタの開発  
○笠井 悠里<sup>1</sup>, 梅山 一大<sup>2</sup>, 渡邊 将人<sup>2</sup>, 中野 和明<sup>1</sup>, 松成 ひとみ<sup>1,2</sup>, 内倉 鮎子<sup>1</sup>, 武石 透輝<sup>1</sup>,  
畑江 将太<sup>1</sup>, 浅野 吉則<sup>1</sup>, 長屋 昌樹<sup>2</sup>, 渡辺 航太<sup>3</sup>, 堀内 圭輔<sup>3</sup>, 松本 守雄<sup>3</sup>, 長嶋 比呂志<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>明大農, <sup>2</sup>明大バイオリソース研究国際インスティテュート, <sup>3</sup>慶大医整形外科)
- P-17\*** 胚盤胞補完によって救済された IL2RG 遺伝子ノックアウトキメラブタは正常な繁殖能力を有する  
○八島 紗耶香<sup>1</sup>, 中野 和明<sup>1</sup>, 浅野 吉則<sup>1</sup>, 笠井 悠里<sup>1</sup>, 勝俣 佑紀<sup>1</sup>, 福田 暢<sup>1</sup>, 高草木 大地<sup>1</sup>,  
梅木 育磨<sup>1</sup>, 武石 透輝<sup>1</sup>, 畑江 将太<sup>1</sup>, 松成 ひとみ<sup>1,2</sup>, 渡邊 将人<sup>2</sup>, 梅山 一大<sup>2</sup>, 長屋 昌樹<sup>2</sup>,  
花園 豊<sup>3</sup>, 長嶋 比呂志<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>明大農, <sup>2</sup>明大バイオリソース研究国際インスティテュート, <sup>3</sup>自治医大再生医学研究部)
- P-18\*** CRISPR/Cas9系を用いた新規ノックダウンマウス作製法の開発  
○三浦 浩美<sup>1</sup>, 佐藤 正宏<sup>2</sup>, Channabasavaiah GURUMURTHY<sup>3</sup>, 大塚 正人<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東海大医, <sup>2</sup>鹿大FSRC, <sup>3</sup>ネブラスカ大医)

**P-19\*** ブタ初期胚の栄養膜細胞形成における OCT-4 発現の必要性  
○江村 菜津子<sup>1</sup>, 櫻井 伸行<sup>2</sup>, 高橋 一生<sup>1</sup>, 橋爪 力<sup>1,2</sup>, 澤井 健<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>岩手大農, <sup>2</sup>岩手大院連合農学)

**P-20\*** 動物胚の受胎率向上を目指した遺伝子組換え FGF4 の開発 : 生物活性に重要な領域の同定のための N 末端短縮型 マウス FGF4 の生産  
○熊谷 友希<sup>1</sup>, 菊地 貴裕<sup>1</sup>, 野中 愛純<sup>1</sup>, 佐々木 玲<sup>1,2</sup>, 小林 正之<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>秋田県大院 生物資源, <sup>2</sup>秋田県総食研セ)

#### 臨床・応用技術

**P-21\*** Heat stress compromises the thermal environment of different portions of the genital tract in the cow  
○Hossam EL-SHEIKH ALI<sup>1,2</sup>, Go KITAHARA<sup>1</sup>, Youji TAMURA<sup>1</sup>, Ikuo KOBAYASHI<sup>3</sup>, Koichiro HEMMI<sup>3</sup>, Samy ZAABEL<sup>2</sup>, Takeshi OSAWA<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Laboratory of Theriogenology, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, <sup>2</sup>Theriogenology Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Mansoura, Egypt, <sup>3</sup>Sumiyoshi Science Field, University of Miyazaki)

一般ポスター発表

P-22 ~ P-119

ポスター会場

偶数番号 9月17日(木) 15:00 ~ 16:30  
奇数番号 9月18日(土) 13:00 ~ 14:30

#### 内分泌

**P-22** アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いたヤギ視床下部神経細胞への遺伝子導入法の検討  
○末富 祐太<sup>1</sup>, 奥田 雄大<sup>1</sup>, 小林 憲太<sup>2</sup>, 大蔵 聡<sup>1</sup>, 松田 二子<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>名大院生命農, <sup>2</sup>生理研)

**P-23** TALEN を用いたシバヤギ体細胞の *KISS1* 遺伝子改変  
○館林 亮輝<sup>1</sup>, 佐久間 哲史<sup>2</sup>, 山本 卓<sup>2</sup>, 大蔵 聡<sup>1</sup>, 松田 二子<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>名大院生命農, <sup>2</sup>広島大院理)

**P-24** 弓状核への Neurokinin B 局所投与により誘起された神経活動上昇は反対側の弓状核キスペプチンニューロン群へ伝達される  
○若林 嘉浩<sup>1</sup>, 山村 崇<sup>1</sup>, 大蔵 聡<sup>2</sup>, 岡村 裕昭<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>農業生物資源研, <sup>2</sup>名大院生命農)

**P-25** Salsolinol と視床下部ドーパミンによるヤギのプロラクチン分泌機構に関する研究  
○橋爪 力, 稲葉 有紀, 渡辺 龍之介, 伊藤 杏美, 澤井 健  
(岩手大農)

**P-26** ゴナドトロフにおけるリゾホスファチジン酸の役割検討  
○森山 隆太郎, 田近 弘樹  
(近大生命科学)

**P-27** ヒト子宮内膜間質細胞 (ESC) の脱落膜化におけるグルコース取り込み能の検討  
○城崎 幸介, 田村 功, 品川 征大, 岡田 真紀, 李 理華, 前川 亮, 竹谷 俊明, 浅田 裕美,  
佐藤 俊, 山縣 芳明, 田村 博史, 杉野 法広  
(山口大産科婦人科)

**P-28** 鶏胚および幼雛におけるビタミンD依存性カルシウム輸送タンパク質の発現  
○下井 岳, 佐久間 優, 遊長 尚貴, 亀山 祐一  
(東農大生物産業)

## 卵巣

**P-29** マウス卵巣の原始卵胞形成期におけるTGF $\beta$ スーパーファミリーおよびアセチルコリンシグナルの卵胞発達への関与の可能性  
○上野 瑞葵, 藤井 渉, 内藤 邦彦, 杉浦 幸二  
(東大院農学生命)

**P-30** ウシ体外発育卵子における顆粒層細胞数とATP含量の関係  
○杉山 都<sup>1</sup>, 隅谷 明依<sup>2</sup>, 城詰 完奈<sup>3</sup>, 伊藤 一樹<sup>2</sup>, 西山 知里<sup>2</sup>, 白砂 孔明<sup>2</sup>, 桑山 岳人<sup>2</sup>,  
岩田 尚孝<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>東農大院畜産, <sup>2</sup>東農大畜産)

**P-31** カルニチンおよび水素分子投与が加齢マウスの原始卵胞数に及ぼす影響  
○菅野 祥<sup>1</sup>, 結城 笑香<sup>2</sup>, 吉田 仁秋<sup>2</sup>, 井上 正康<sup>3</sup>, 小林 仁<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>宮城大食産, <sup>2</sup>吉田レディースクリニック, <sup>3</sup>IVFなんばクリニック)

**P-32** Gossypol inhibits LH-induced steroidogenesis in bovine theca cells  
○Thet Su MYAT<sup>2</sup>, Masafumi TETSUKA<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, <sup>2</sup>Iwate University)

**P-33** progesteroneの卵胞発育に対する効果  
○小松 紘司, 増瀬 悟  
(愛知医大生理学)

**P-34** ストレス依存的な不妊症に対する芍薬の改善効果  
○安井 貴之<sup>1</sup>, 石崎 華<sup>1</sup>, 國府 大智<sup>1</sup>, 清水 隆<sup>2</sup>, 宮崎 均<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>筑波大生命環境 食機能探査研, <sup>2</sup>帯畜大院畜産)

**P-35** Effects of gonadotropin releasing hormone (GnRH) on luteinization of granulosa cells in rats  
○Doungrut TUNGMAHASUK, Ryota TERASHIMA, Shiro KURUSU,  
Mitsumori KAWAMINAMI  
(Veterinary Physiology, Kitasato University)

**P-36** ウシ黄体における testosterone 合成酵素の遺伝子発現  
○入江 結唯, 羽柴 一久, 吉岡 伸, 木村 康二, 山本 ゆき, 奥田 潔  
(岡山大院環境生命科研)

**P-37** ウシ退行期黄体における動静脈吻合類似構造物の形態学的解析  
○小林 純子, 宮崎 かや, 岩永 敏彦  
(北大院医 組織細胞)

## 精巣・精子

- P-38** Germline Stem (GS) 細胞の精子形成能獲得に必要な遺伝子の探索  
○鈴木 伸之介<sup>1</sup>, 池田 理恵子<sup>1</sup>, 浦 大樹<sup>1</sup>, 佐藤 卓也<sup>2</sup>, 小川 毅彦<sup>2</sup>, 阿部 訓也<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>理研BRC 疾患ゲノム動態解析技術開発チーム, <sup>2</sup>横浜市立大生命医科学 プロテオーム科学研)
- P-39** 幼若ブタ精巣からのナイコデント濃度勾配遠心分離法による前精原細胞の濃縮  
○高木 優二<sup>1</sup>, 宮沢 広視<sup>1</sup>, 佐藤 優太<sup>1</sup>, 千北 喬之<sup>1</sup>, 濱野 光市<sup>1</sup>, 保科 和夫<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>信州大農, <sup>2</sup>長野県畜産試験場)
- P-40** フローサイトメトリーによる琵琶湖固有種ホンモロコ (Gnathopogon caerulescens) 精巣細胞の解析  
○高田 達之<sup>1</sup>, 手島 黎子<sup>1</sup>, 檜垣 彰吾<sup>1</sup>, 島田 愛美<sup>2</sup>, 酒井 則良<sup>3</sup>, 藤東 貴昭<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>立命館大薬, <sup>2</sup>立命館大院生命, <sup>3</sup>国立遺伝研)
- P-41** 精細管基底区画における分化軸に沿った精原細胞の局在変化  
○原 健士朗<sup>1</sup>, 種村 健太郎<sup>1</sup>, 吉田 松生<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>東北大院農, <sup>2</sup>基生研)
- P-42** セルトリ細胞除去マウスにおけるセルトリバルブの再構築  
○貴志 かさね<sup>1</sup>, 長澤 佳也<sup>1</sup>, 相山 好美<sup>1</sup>, 内田 あや<sup>1</sup>, 金井 正美<sup>2</sup>, 恒川 直樹<sup>3</sup>, 九郎丸 正道<sup>1</sup>, 金井 克晃<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東大獣医解剖, <sup>2</sup>東京医科歯科大 実験動物, <sup>3</sup>日本大)
- P-43** ウシ新鮮射出精子の分子性状における個体差 —先体チロシンリン酸化タンパク質の分布と人工授精成績との関係—  
○荒井 美由紀<sup>1</sup>, 坂瀬 充洋<sup>2</sup>, 福島 護之<sup>2</sup>, 原山 洋<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院農, <sup>2</sup>兵庫県総七北部)

## 卵・受精

- P-44** ブタGV期卵母細胞ミトコンドリアの分布変化  
○矢持 隆之<sup>1</sup>, 橋本 周<sup>1</sup>, 天羽 杏実<sup>1</sup>, 後藤 大也<sup>1</sup>, 山中 昌哉<sup>1</sup>, 井上 正康<sup>1</sup>, 中岡 義晴<sup>1</sup>, 森本 義晴<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>IVFなんばクリニック, <sup>2</sup>HORAC グランフロント大阪クリニック)
- P-45** ブタ卵母細胞の体外発育および卵丘細胞の増殖性に及ぼすFSHの影響  
○牧田 美穂, 竹本 隆太郎, 宮野 隆  
(神戸大院農)
- P-46** 未成熟マウス卵巣におけるPTEN蛋白質の局在と系統差  
○鈴木 治  
(医薬基盤健康栄養研)
- P-47** 成熟培地へのFSH, EGF様ペプチドおよびdbcAMPの添加がウシ体外受精胚作出に及ぼす影響について  
○山之内 忠幸, 相川 芳雄, 松田 秀雄, 後藤 由希, 大竹 正樹, 小林 修司, 橋谷田 豊  
(家畜改良セ)



- P-48** Effect of cumulus cell removal at different timings during IVM on nuclear maturation of porcine oocytes  
 ○Pilar FERRE, Thi Tra Mi BUI, Takuya WAKAI, Hiroaki FUNAHASHI  
 (Department of Animal Science, Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University)
- P-49** マウス精子の卵管移行機構  
 ○臼井 智之<sup>1</sup>, 石川 祐<sup>2</sup>, 山下 美鈴<sup>1</sup>, 兼森 芳紀<sup>1</sup>, 馬場 忠<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>筑波大院, 生命環境, <sup>2</sup>筑波大リーディング院, ヒューマンバイオロジー)
- P-50** ブタ精子の前処理がICSI卵の体外発生能に及ぼす影響  
 ○秦 仁樹, 谷 哲弥, 加藤 容子  
 (近大農)
- P-51** マウス着床前胚におけるメチオニン依存的なヒストンのメチル化  
 ○工藤 麻里, 池田 俊太郎, 杉本 実紀, 久米 新一  
 (京大院農)
- P-52** ウシ着床前胚におけるメチオニンアデノシルトランスフェラーゼの阻害による遺伝子発現の変化  
 ○池田 俊太郎, 工藤 麻里, 杉本 実紀, 久米 新一  
 (京大院農)
- P-53** PRMT5及びヒストンH3R8対称性ジメチル化は受精後の胚においてその局在が変化する  
 ○塚口 智将<sup>1</sup>, 守田 昂太郎<sup>1</sup>, 樋口 智香<sup>1</sup>, 内堀 翔<sup>1</sup>, 三谷 匡<sup>1,2</sup>, 細井 美彦<sup>1</sup>, 宮本 圭<sup>1</sup>, 松本 和也<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>近大院生物理工, <sup>2</sup>近大先技総研)
- P-54** マウス初期胚の分化制御に対するコンパクションの影響  
 ○上田 美由, 藤井 涉, 杉浦 幸二, 内藤 邦彦  
 (東大院農学生命)
- P-55** ウシ体外受精卵の初期発生能におよぼす近赤外光刺激の影響  
 ○横尾 正樹, 中村 彰太, 佐藤 寿春, 花倉 聡一  
 (秋田県大, 生物資源)
- P-56** 加齢に伴う卵子の染色体数異常の原因は二価染色体の早期分離である  
 榊原 揚悟, ○北島 智也  
 (理研CDB)
- P-57** Effect of medium additives during liquid storage on developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes  
 Tayita SUTTIROJPATTANA<sup>1</sup>, Tamas SOMFAI<sup>2</sup>, Satoko MATOBA<sup>2</sup>, Takashi NAGAI<sup>3</sup>,  
 ○Rangsun PARNPAI<sup>1</sup>, Masaya GESHI<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>Suranaree University of Technology, <sup>2</sup>NARO Institute of Livestock and Grassland Science, <sup>3</sup>Food and Fertilizer Technology Center)

## 性周期・妊娠

- P-58** 妊娠初期のウシ子宮におけるケモカインとその受容体発現に関する研究  
 ○作本 亮介<sup>1</sup>, 林 憲悟<sup>1</sup>, 藤井 史織<sup>1</sup>, 金原 浩子<sup>1</sup>, 細江 実佐<sup>1</sup>, 古澤 軌<sup>1</sup>, 木崎 景一郎<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>農業生物資源研, <sup>2</sup>岩手大農)

- P-59** ラット子宮における Sulf1 の発現および局在の解析  
○吉井 裕香, 山上一樹, Md Rashedul ISLAM, 山内 伸彦  
(九大院農)
- P-60** ウシ子宮内膜上皮細胞における Side population 細胞の解析  
○松山 秀一<sup>1</sup>, 古澤 軌<sup>2</sup>, 池田 光美<sup>2</sup>, 美辺 詩織<sup>1</sup>, 木村 康二<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>農研機構畜草研, <sup>2</sup>農業生物資源研, <sup>3</sup>岡山大院環境生命科研)
- P-61** 妊娠早期のウシ子宮における血管内皮細胞増殖因子ファミリーの遺伝子発現動態と血管数およびリンパ管数の変化  
○林 憲悟, 細江 実佐, 金原 浩子, 藤井 史織, 作本 亮介  
(農業生物資源研)
- P-62** ウマ子宮内膜における glucocorticoid receptor, 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type1 および type 2 発現の周期的変化  
○塩谷 陽紀<sup>1</sup>, Anna Z SZOSTEK<sup>1,2</sup>, 山本 ゆき<sup>1</sup>, 木村 康二<sup>1</sup>, 奥田 潔<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岡大院環境生命科研, <sup>2</sup>ポーランド科学アカデミー)
- P-63** ウシ卵管内における局所調節因子アクチビンの標的細胞  
○山本 ゆき<sup>1</sup>, 小林 芳彦<sup>1</sup>, 小林 宙<sup>2</sup>, 木村 康二<sup>1</sup>, 奥田 潔<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岡山大院環境生命科研, <sup>2</sup>岡山農林水産総合センター畜産研)
- P-64** ラット子宮内膜間質細胞における時計遺伝子群の発現に及ぼす IL-11 の影響  
○諫山 慧士朗, 趙 立佳, 山内 伸彦  
(九大院農)
- P-65** 染色体制御因子 Kid および Cdc42 抑制による多核化とアポトーシス誘導の関係  
○陶山 晃<sup>1</sup>, 田中 愛咲実<sup>1</sup>, 山上一樹<sup>1</sup>, 江頭 昭義<sup>2</sup>, 蔵本 武志<sup>2</sup>, 山内 伸彦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>九大院農 動物・海洋資源生物学, <sup>2</sup>蔵本ウイメンズクリニック)
- P-66** ウシ体外培養胚における胚盤形成マーカーの探索  
○細江 実佐, 林 憲悟, 作本 亮介, 古澤 軌, 大越 勝広, 池田 光美, 徳永 智之  
(農業生物資源研)
- P-67** ヒツジ妊娠着床時における子宮灌流液のプロテオミクスと着床関与因子探索  
○中村 圭吾, 草間 和哉, 白 汝嵐, 今川 和彦  
(東大院農学生命, 獣医繁殖育種学研究室)
- P-68** *In vitro* culture of rat uterine explants: characterization, hormonal regulation and *in vitro* decidualization  
○Md. Rashedul ISLAM<sup>1,2</sup>, Kazuki YAMAGAMI<sup>2</sup>, Yuka YOSHII<sup>2</sup>, Nobuhiko YAMAUCHI<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Department of Genetics and Animal Breeding, Faculty of Veterinary and Animal Science, Hajee Mohammad Danesh Science and Technology University, Bangladesh, <sup>2</sup>Department of Animal and Marine Bioresource Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University)
- P-69** 安定的遺伝子導入によるインターフェロン tau 応答培養細胞系作出の試み  
○田路 矩之<sup>1,2</sup>, 古澤 軌<sup>3</sup>, 高橋 透<sup>1,2</sup>, 木崎 景一郎<sup>1,2</sup>, 橋爪 一善<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岩手大農, <sup>2</sup>岐阜大院連合獣医, <sup>3</sup>農業生物資源研)
- P-70** 牛黒毛和種分娩時の産子, 様態と体温変化の関係  
○阪谷 美樹<sup>1</sup>, 菅野 崇亮<sup>2</sup>, 肥後 愛貴<sup>3</sup>, 直塚 浩二<sup>2</sup>, 月精 悟<sup>4</sup>, 上原 宏<sup>2</sup>, 竹之内 直樹<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>九州農研, <sup>2</sup>NTT ドコモ, <sup>3</sup>きもつき大地ファーム, <sup>4</sup>JA きもつき)

- P-71 ウシの超早期妊娠因子測定用ELISAの検討  
○金森 香樹<sup>1</sup>, 伊賀 浩輔<sup>2</sup>, 平田 統一<sup>3</sup>, 松原 和衛<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岩大院農学, <sup>2</sup>東北農研, <sup>3</sup>岩大農御明神牧場)

## 生殖工学

- P-72 ポリエチレングリコール添加によるウシ卵子ガラス化保存の検討  
○松田 秀雄, 山之内 忠幸, 後藤 由希, 相川 芳雄, 大竹 正樹, 小林 修司, 橋谷田 豊  
(家畜改良セ)
- P-73 ウシCOCのガラス化保存のためのパーコールによる選別の有効性  
○後藤 由希, 松田 秀雄, 山之内 忠幸, 相川 芳雄, 大竹 正樹, 小林 修司, 橋谷田 豊  
(家畜改良セ)
- P-74 凍結融解後の高温ストレスがウシ体外受精胚の生存性に及ぼす影響  
○森 美幸<sup>1</sup>, 林 武司<sup>1</sup>, 磯崎 良寛<sup>1</sup>, 上田 修二<sup>1</sup>, 竹之内 直樹<sup>2</sup>, 阪谷 美樹<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>福岡農林試, <sup>2</sup>九沖農研)
- P-75 マウス胚における低温保存法の保存期間延長への試み  
○森田 真裕, 掛札 真未, 内田 さとみ, 川瀬 洋介  
(中外医科学研)
- P-76 超小型恒温器を用いて宅配便で常温輸送した近交系マウス胚の発生  
○野老 美紀子<sup>1</sup>, 若山 清香<sup>2</sup>, 鎌田 裕子<sup>3</sup>, 福永 憲隆<sup>1</sup>, 浅田 義正<sup>1</sup>, 若山 照彦<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>浅田レディース浅田生殖研, <sup>2</sup>山梨大発生工学研究センター, <sup>3</sup>山梨大生命環境)
- P-77 実験小動物における顕微授精操作法の電動化と自動化の検討  
○江藤 智生<sup>1</sup>, 上迫 努<sup>1</sup>, 滝澤 明子<sup>2</sup>, 田中 伸明<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>実中研, <sup>2</sup>MCW, <sup>3</sup>日本精工)
- P-78 精子の鞭毛除去によるICSI技術の簡便化の試み  
○鳥飼 昂平<sup>1</sup>, 清水 和真<sup>1</sup>, 鎌田 裕子<sup>1</sup>, 柴崎 都江<sup>1</sup>, 長友 啓明<sup>2</sup>, 若山 清香<sup>3</sup>, 水谷 英二<sup>1</sup>,  
若山 照彦<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>山梨大生命環境, <sup>2</sup>山梨大COC, <sup>3</sup>山梨大発生工学研究センター)
- P-79 連続核移植により未受精卵の細胞質に長時間浸したドナー核の発生能について  
○若山 清香<sup>1</sup>, 長友 啓明<sup>2</sup>, 大日向 康秀<sup>3</sup>, 水谷 英二<sup>3</sup>, 若山 照彦<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>山梨大発生工学研究センター, <sup>2</sup>山梨大COC, <sup>3</sup>山梨大生命環境)
- P-80 Oct3/4, Nanog 遺伝子の発現を指標としたマウス体細胞核移植胚の移植前選別の試み  
○大畠 一輝, 谷 哲弥, 加藤 容子  
(近大院農学)
- P-81 リン酸化H2A.Xの発現を伴う筋肉組織由来体細胞核を用いた遺伝資源としての有用性  
○東 里香<sup>1</sup>, 宮下 実<sup>2</sup>, 永井 宏平<sup>3</sup>, 中川 隆生<sup>4</sup>, 梶本 みずき<sup>3</sup>, 井上 達也<sup>3</sup>, 細井 美彦<sup>1,2,3</sup>,  
安齋 政幸<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>近畿大院生物理工, <sup>2</sup>近畿大先技総研, <sup>3</sup>近畿大生物理工遺伝子工, <sup>4</sup>(株)紀和実験動物研究所)

- P-82** 体細胞クローンマウス精子のDNAメチル化異常の検出  
 ○小池 佐<sup>1</sup>, 神長 祐子<sup>1</sup>, 若井 拓也<sup>1,5</sup>, 水谷 英二<sup>2</sup>, 小林 久人<sup>3</sup>, 若山 清香<sup>2</sup>, 坂下 陽彦<sup>1</sup>,  
 三浦 史仁<sup>4</sup>, 伊藤 隆司<sup>4</sup>, 河野 友宏<sup>1,3</sup>  
 ( <sup>1</sup>東農大バイオ, <sup>2</sup>山梨大生命工, <sup>3</sup>東農大ゲノム, <sup>4</sup>九大医学研究院, <sup>5</sup>岡大環境生命)
- P-83** GONAD: 採卵, 顕微注入, 移植を要しない新規ゲノム編集マウス作製法  
 ○大塚 正人<sup>1</sup>, Channabasavaiah GURUMURTHY<sup>2</sup>, 三浦 浩美<sup>1</sup>, 佐藤 正宏<sup>3</sup>, 和田 健太<sup>4</sup>,  
 高橋 剛<sup>4</sup>  
 ( <sup>1</sup>東海大医, <sup>2</sup>ネブラスカ大医, <sup>3</sup>鹿大FSRC, <sup>4</sup>東農大生物産業学)
- P-84** 臓器再生に向けたCRISPR/Cas9法による腎臓欠損ラットの作出  
 ○後藤 哲平<sup>1</sup>, 原 弘真<sup>1</sup>, 保地 眞一<sup>2</sup>, 平林 真澄<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>生理研, <sup>2</sup>信大繊維)
- P-85** 前核注入法とICSIを用いたCRISPR/Cas9によるゲノム編集効率について  
 ○長友 啓明<sup>1</sup>, 柴崎 郁江<sup>2</sup>, 水谷 英二<sup>2</sup>, 若山 照彦<sup>2,3</sup>  
 ( <sup>1</sup>山梨大COC, <sup>2</sup>山梨大生命環境, <sup>3</sup>山梨大発生工学研究センター)
- P-86** CRISPR/Cas9システムによるマウスゲノム編集  
 ○中村 衣里<sup>1</sup>, 多田 昇弘<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>順天堂大院 老人性疾患病態・治療研究センター, <sup>2</sup>順天堂大院 アトピー疾患研究センター)
- P-87** 日本産野生由来MSM a (nonagouti) ノックアウトマウスの作出とその表現型解析  
 ○廣瀬 美智子<sup>1</sup>, 長谷川 歩未<sup>1</sup>, 持田 慶司<sup>1</sup>, 畑中 勇輝<sup>1</sup>, 本多 新<sup>1,2</sup>, 金田 秀貴<sup>1</sup>, 山田 郁子<sup>1</sup>,  
 古瀬 民生<sup>1</sup>, 阿部 訓也<sup>1,3</sup>, 若菜 茂晴<sup>1</sup>, 小倉 淳郎<sup>1,3</sup>  
 ( <sup>1</sup>理研BRC, <sup>2</sup>宮崎大TT推進機構, <sup>3</sup>筑波大院生命環境)
- P-88** Dlk1-Dio3 ドメインBAC-TGマウスのDNAメチル化インプリンティング  
 ○隈本 宗一郎  
 (東農大バイオ)
- P-89** H2B-eGFP+H2B-mCherryダブルTGマウスを用いたFRET法の開発およびその初期胚クロマチン動態解析への試み  
 ○井上 弘貴<sup>1,2</sup>, 種村 健太郎<sup>2</sup>, 小倉 淳郎<sup>1,3,4</sup>  
 ( <sup>1</sup>理研BRC, <sup>2</sup>東北大院農, <sup>3</sup>筑波大院生命環境, <sup>4</sup>東大院医)
- P-90** マウス始原生殖細胞の性特異的遺伝子発現を制御するエピゲノム修飾  
 ○神長 祐子<sup>1</sup>, 川畑 順子<sup>1</sup>, 坂下 陽彦<sup>1</sup>, 小林 久人<sup>2</sup>, 河野 友宏<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>東農大バイオ, <sup>2</sup>東農大ゲノム)
- P-91** 胚盤胞注入によって胎盤を置換し得る寄与率を有する新規栄養膜幹細胞の樹立  
 ○大日向 康秀, 長友 啓明, 水谷 英二, 若山 照彦  
 (山梨大発生工学研究センター)
- P-92** マウス個体の老化が生殖能力に及ぼす影響ならびに個体老化の緩和に関する予備的検討  
 ○山口 正義, 谷 哲弥, 加藤 容子  
 (近大院農学)
- P-93** 低線量・低線量率放射線がマウス着床前期胚発生過程に与える影響  
 ○清水 なつみ<sup>1,4</sup>, 河合 秀彦<sup>2</sup>, 笹谷 めぐみ<sup>3</sup>, 遠藤 充浩<sup>1,4</sup>, 稲葉 俊哉<sup>1</sup>, 神谷 研二<sup>3,4</sup>  
 ( <sup>1</sup>広大原医研 がん分子病態研, <sup>2</sup>広大原医研 放射線細胞応答研, <sup>3</sup>広大原医研 分子発がん制御研,  
<sup>4</sup>広大原医研 低線量放射線影響先端研究プログラム)

- P-94** イヌ内在性レトロウイルスのエピジェネティックな発現制御機構の解析  
○金田 正弘, 建石 幸子, 藤田 舞香  
(農工大獣医)
- P-95** 次世代シーケンサーによるブタ精巢でのウルトラディープDNAメチル化解析  
○齊藤 経<sup>1</sup>, 新井 良和<sup>1</sup>, 阿閉 貴紀<sup>1</sup>, 竹内 健太<sup>1</sup>, 長嶋 比呂志<sup>2</sup>, 大鐘 潤<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>明大農 ゲノム機能工学, <sup>2</sup>明大バイオリソース研究国際インスティテュート)
- P-96** 体細胞連続核移植で作出されたクローンブタでのエピジェネティック解析: Human BeadChipを用いたゲノムワイドDNAメチル化解析の試み  
○新井 良和<sup>1</sup>, 阿閉 貴紀<sup>1</sup>, 福川 斐昭<sup>1</sup>, 齊藤 経<sup>1</sup>, 竹内 健太<sup>1</sup>, 松成 ひとみ<sup>2</sup>, 長嶋 比呂志<sup>2</sup>, 大鐘 潤<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>明大農 ゲノム機能工学, <sup>2</sup>明大バイオリソース研究国際インスティテュート)
- P-97** Proteomic analysis of the extraembryonic tissues from cloned porcine fetus at day 35 of pregnancy  
○Yeoung-Gyu KO<sup>1</sup>, Seongsoo HWANG<sup>1</sup>, Gi-Sun IM<sup>1</sup>, Seung-Hoon LEE<sup>1</sup>, Hyun KIM<sup>2</sup>, Hwan-Hoo SEONG<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA, Korea, <sup>2</sup>Animal Genetic Resources Research Center, National Institute of Animal Science, RDA, Korea)
- P-98** Myostatin 遺伝子をノックアウトしたブタクローン胚の発生能  
○浅野 吉則<sup>1</sup>, 饒 聖分<sup>2</sup>, 松成 ひとみ<sup>1,3</sup>, 中野 和明<sup>1</sup>, 内倉 鮎子<sup>1</sup>, 武石 透輝<sup>1</sup>, 畑江 将太<sup>1</sup>, 高柳 就子<sup>1</sup>, 渡邊 将人<sup>3</sup>, 梅山 一大<sup>3</sup>, 藤村 達也<sup>2</sup>, 長嶋 比呂志<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>明大農, <sup>2</sup>日本ハム(株)中央研究所, <sup>3</sup>明大バイオリソース研究国際インスティテュート)
- P-99** サイエンスカフェの改善に向けた参加者の意見集約  
—体細胞クローン技術の理解醸成を促進するためのアプローチは?—  
○渡辺 伸也<sup>1</sup>, 武田 久美子<sup>1</sup>, 赤木 悟史<sup>1</sup>, 原口 清輝<sup>1</sup>, 平尾 雄二<sup>1</sup>, 岡部 蘭子<sup>2</sup>, 関沼 幹夫<sup>2</sup>, 畠中 脩<sup>2</sup>, 濱野 光市<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>農研機構畜草研, <sup>2</sup>信州大農)
- P-100** Gamete Intra Fallopian Transfer (GIFT) 法による糖尿病発症ミニブタの作出  
○福田 暢<sup>1</sup>, 中野 和明<sup>1</sup>, 浅野 吉則<sup>1</sup>, 武石 透輝<sup>1</sup>, 畑江 将太<sup>1</sup>, 内倉 鮎子<sup>1</sup>, 梅本 育磨<sup>1</sup>, 笠井 悠里<sup>1</sup>, 勝俣 佑紀<sup>1</sup>, 八島 紗耶香<sup>1</sup>, 松成 ひとみ<sup>1,2</sup>, 渡邊 将人<sup>2</sup>, 梅山 一大<sup>2</sup>, 長屋 昌樹<sup>2</sup>, 花園 豊<sup>3</sup>, 長嶋 比呂志<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>明大農, <sup>2</sup>明大バイオリソース研究国際インスティテュート, <sup>3</sup>自治医大再生医学研究部)
- P-101** クサビラオレンジを全身性に発現するミニブタ系統の開発  
○武石 透輝<sup>1</sup>, 中野 和明<sup>1</sup>, 浅野 吉則<sup>1</sup>, 内倉 鮎子<sup>1</sup>, 畑江 将太<sup>1</sup>, 福田 暢<sup>1</sup>, 八島 紗耶香<sup>1</sup>, 松成 ひとみ<sup>1,2</sup>, 渡邊 将人<sup>2</sup>, 梅山 一大<sup>2</sup>, 長屋 昌樹<sup>2</sup>, 花園 豊<sup>3</sup>, 長嶋 比呂志<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>明大農, <sup>2</sup>明大バイオリソース研究国際インスティテュート, <sup>3</sup>自治医大再生医学研究部)
- P-102** ブタ単為発生卵細胞質へのCRISPR/Cas9系mRNAの直接顕微注入によるゲノム編集は多様な標的遺伝子変異を持つ細胞を生む  
○佐藤 正宏<sup>1</sup>, 郡山 実優<sup>2</sup>, 渡部 聡<sup>3</sup>, 大塚 正人<sup>4</sup>, 桜井 敬之<sup>5</sup>, 稲田 絵美<sup>6</sup>, 齋藤 一誠<sup>7</sup>, 中村 伸吾<sup>3</sup>, 三好 和陸<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>鹿大FSRC遺伝子発現制御, <sup>2</sup>鹿大農家畜繁殖, <sup>3</sup>生物資源研家畜ゲノム, <sup>4</sup>東海大医分子生命, <sup>5</sup>信州大院医系研循環病態, <sup>6</sup>鹿大院医歯学小児歯科, <sup>7</sup>新潟大院医歯学小児歯科, <sup>8</sup>防衛医大防医研センター医療工学)

- P-103** Generation of double knockout mice using single CRISPR guide RNA targeting two locus  
 Hee Sook BAE<sup>1</sup>, Hee Jung PARK<sup>1</sup>, Soo Jin LEE<sup>1</sup>, Goo JANG<sup>2</sup>, Ghangyong KIM<sup>3</sup>, Jongki CHO<sup>3</sup>, Seokjoong KIM<sup>4</sup>, Ok Jae KOO<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Laboratory Animal Research Center, Samsung Biomedical Research Institute, <sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Seoul National University, <sup>3</sup>College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, <sup>4</sup>ToolGen Inc.)
- P-104** ブタ体外生産胚の発生能評価：EmbryoScopeによる解析  
 ○勝俣 佑紀<sup>1</sup>, 中野 和明<sup>1</sup>, 浅野 吉則<sup>1</sup>, 内倉 鮎子<sup>1</sup>, 畑江 将太<sup>1</sup>, 武石 透輝<sup>1</sup>, 八島 紗耶香<sup>1</sup>, 福田 暢<sup>1</sup>, 梅木 育磨<sup>1</sup>, 笠井 悠里<sup>1</sup>, 松成 ひとみ<sup>1,2</sup>, 長嶋 比呂志<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>明大農, <sup>2</sup>明大バイオリソース研究国際インスティテュート)
- P-105** ブタにおけるキメラ胚の発達動態  
 ○畑江 将太<sup>1</sup>, 中野 和明<sup>1</sup>, 松成 ひとみ<sup>1,2</sup>, 内倉 鮎子<sup>1</sup>, 浅野 吉則<sup>1</sup>, 武石 透輝<sup>1</sup>, 渡邊 将人<sup>2</sup>, 梅山 一大<sup>2</sup>, 長屋 昌樹<sup>2</sup>, 長嶋 比呂志<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>明大農, <sup>2</sup>明大バイオリソース研究国際インスティテュート)
- P-106** ブタ初期胚の遺伝子型判定に関する研究  
 ○梅木 育磨<sup>1</sup>, 中野 和明<sup>1</sup>, 渡邊 将人<sup>2</sup>, 梅山 一大<sup>2</sup>, 畑江 将太<sup>1</sup>, 浅野 吉則<sup>1</sup>, 笠井 悠里<sup>1</sup>, 八島 紗耶香<sup>1</sup>, 高柳 就子<sup>1</sup>, 松成 ひとみ<sup>1,2</sup>, 長屋 昌樹<sup>2</sup>, 長嶋 比呂志<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>明大農, <sup>2</sup>明大バイオリソース研究国際インスティテュート)
- P-107** 異種間移植によるブタ胎子卵巣の発育と卵の受精能  
 ○金子 浩之, 菊地 和弘, 野口 純子  
 (農業生物資源研)

#### 臨床・応用技術

- P-108** 卵黄の代替物質として大豆レシチンを用いたウシ凍結精液の品質  
 ○絹川 将史, 船内 克俊, 内山 京子  
 (家畜改良事業団家技研)
- P-109** 平衡ガラス化法によるマウス卵子の凍結保存の試み  
 ○福嶋 和貴<sup>1</sup>, 近藤 詩織<sup>1</sup>, 平川 猛<sup>1</sup>, 岩原 悠樹<sup>1</sup>, 横堀 誠也<sup>1</sup>, 越本 知大<sup>2</sup>, 松川 和嗣<sup>1</sup>, 葛西 孫三郎<sup>1</sup>, 枝重 圭祐<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>高知大農, <sup>2</sup>宮崎大フロンティア科学実験総合センター)
- P-110** 中空糸ガラス化法の実用化に関する研究-3：従来法との比較並びに長期保管法の検討  
 ○内倉 鮎子<sup>1</sup>, 中野 和明<sup>1</sup>, 松成 ひとみ<sup>1,2</sup>, 畑江 将太<sup>1</sup>, 浅野 吉則<sup>1</sup>, 八島 紗耶香<sup>1</sup>, 長嶋 比呂志<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>明大農, <sup>2</sup>明大バイオリソース研究国際インスティテュート)
- P-111** 平衡ガラス化法を用いたゼブラフィッシュ胚のガラス化凍結保存の試み  
 ○横堀 誠也<sup>1</sup>, 竹下 純隆<sup>1</sup>, 福嶋 和貴<sup>1</sup>, 岩原 悠樹<sup>1</sup>, 越本 知大<sup>2</sup>, 松川 和嗣<sup>1</sup>, 葛西 孫三郎<sup>1</sup>, 枝重 圭祐<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>高知大農, <sup>2</sup>宮崎大フロンティア科学実験総合センター)
- P-112** 温度感受性 TRP チャンネルの哺乳動物卵子における低温傷害への関与  
 ○岩原 悠樹<sup>1</sup>, 北山 みずほ<sup>1</sup>, 新見 沙織<sup>1</sup>, 福嶋 和貴<sup>1</sup>, 横堀 誠也<sup>1</sup>, 越本 知大<sup>2</sup>, 松川 和嗣<sup>1</sup>, 葛西 孫三郎<sup>1</sup>, 枝重 圭祐<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>高知大農, <sup>2</sup>宮崎大フロンティア科学実験総合センター)

- P-113** 耐凍剤濃度と凍結速度に着目したイヌ精子の至適凍結条件の検討  
○緒方 和子<sup>1,2</sup>, ボラジギン サラントラガ<sup>2</sup>, 山口 美緒<sup>2,3</sup>, 原 明日香<sup>2,3</sup>, 佐藤 あかね<sup>2,3</sup>,  
若林 幹夫<sup>4</sup>, 鈴木 誠吾<sup>4</sup>, 西原 由貴<sup>4</sup>, 菅根 尚子<sup>4</sup>, 福森 理加<sup>2,3</sup>, 長尾 慶和<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>宇都宮大地共センター, <sup>2</sup>宇都宮大農附属農場, <sup>3</sup>東京農工大院連合農, <sup>4</sup>東日本盲導犬協会)
- P-114** 琵琶湖固有種ホンモロコ(Gnathopogon caerulescens)における全精巢ガラス化低温保存の試み  
○檜垣 彰吾<sup>1</sup>, 藤東 貴昭<sup>1</sup>, 手島 黎子<sup>1</sup>, 島田 愛美<sup>2</sup>, 酒井 則良<sup>3</sup>, 高田 達之<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>立命大薬, <sup>2</sup>立命大院生命, <sup>3</sup>国立遺伝研)
- P-115** 黒毛和種育成雌牛における血漿抗ミュラー管ホルモン濃度推移  
○平山 博樹<sup>1,2</sup>, 浅田 正嗣<sup>3</sup>, 稲葉 泰志<sup>3</sup>, 川俣 昌和<sup>4</sup>, 内藤 学<sup>1</sup>, 福田 茂夫<sup>1</sup>, 藤井 貴志<sup>1</sup>,  
陰山 聡一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>道総研畜試, <sup>2</sup>東農大, <sup>3</sup>家畜改良センター十勝, <sup>4</sup>かわまた家畜診療所)
- P-116** 自然哺乳下の黒毛和種における分娩後の子宮修復および機能回復に及ぼす要因  
○伊賀 浩輔, 福重 直輝  
(東北農研センター)
- P-117** 放射線被曝原種豚の繁殖性と仔豚への影響(二)  
○李 俊佑<sup>1</sup>, 朴 春香<sup>2</sup>, 飯塚 祐彦<sup>1</sup>, 長谷川 茂樹<sup>1</sup>, 遠藤 麻衣子<sup>1</sup>, 小林 奈通子<sup>1</sup>,  
田野井 慶太郎<sup>1</sup>, 中西 友子<sup>1</sup>, 眞鍋 昇<sup>1</sup>, 前多 敬一郎<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東京大, <sup>2</sup>延辺大)
- P-118** 牛の発情周期における高栄養給餌処置が代謝系および繁殖機能に及ぼす影響  
○水澤 毅士<sup>1</sup>, ラハユ ララサティ<sup>1,2</sup>, 遠藤 なつ美<sup>1,2</sup>, 田中 知己<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>農工大獣医, <sup>2</sup>岐阜大連獣)
- P-119** ウシにおける最終糖化産物の蓄積状況の検討  
○美辺 詩織<sup>1</sup>, 松山 秀一<sup>1</sup>, 木村 康二<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>農研機構畜草研, <sup>2</sup>岡山大院環境生命科研)