

出國報告

(出國類別：開會)

派員出席第九屆豬精液保存國際研討會 (ICBSP)

服務機關：行政院農業委員會畜產試驗所

姓名職稱：陳立人研究員兼組長、林秀蓮助理研究員、

陳裕信助理研究員

派赴國家：澳大利亞

出國期間：108年8月10日至108年8月19日

報告日期：108年10月22日

目 錄

| | 頁次 |
|--------------|----|
| 壹、摘要 ----- | 2 |
| 貳、目的 ----- | 4 |
| 參、過程 ----- | 5 |
| 肆、心得與建議----- | 48 |



壹、摘要

公豬精液保存國際會議 (International Conference on Boar Semen Preservation, ICBSP) 創立於西元 1983 年，於每四或五年在歐盟各國輪流舉辦一次。2019 年 8 月 11 日至 14 日由雪梨大學承辦，於澳大利亞新南威爾士州獵人谷的伊蘭城堡度假村舉辦第九屆公豬精液保存國際會議。這是首次在北半球以外舉辦的公豬精液保存國際會議。藉由此次會議期間，來自世界各地的研究學者和業者專家，進行密集的學術成果發表和討論有關公豬繁殖科學、精子學和相關生物技術的最新研究成果和儀器設備的研發進展。本所生理組陳立人組長在大會的邀請下，代表我國首度參與這個高度學術專業性的國際會議；並帶領組內二位研究同仁出席，以口頭發表與壁報展示的方式，呈現生理組的最新的研究成果。同時也經由研討會和討論交流，獲致來自不同國家對公豬精液及豬隻繁殖技術的新知，以做為未來研究方向規劃的參考。本次會議來自世界各地豬精液相關研究學者及業者專家約 60 多位，共發表 31 篇主題研究報告與 20 篇海報展示。首先由德國 Dagmar Waberski 博士開場主講「公豬精液保存在人工授精中的應用：過去及現在和未來的挑戰」，針對氣候變遷影響公豬精子的濃度和品質的影響下，如何因應以進行更有效率的人工授精，及如何降低人工授精時所需的精子濃度，並配合不同授精方式，來

有效解決甚至提升未來可能面對的母豬繁殖問題及相關因應策略。

本次會議依各國研究學者研究領域和專長，分為八大主題進行專題研討，包括：精子的保存、精漿功能、精子檢測能力發展下對精子性能提升的生物技術、精子質量控制、生物安全、精液品質評估、人工授精及體內與體外受精等重要的課題依序報告並進行詢答討論。

本所發表的有關公豬精液 3 項研究成果，其中 2 篇分別獲選為「精液評估」與「人工授精」的主題領域之海報展示；另一題則被大會推薦為「發展對精子性能提升的生物技術」主題領域進行口頭報告發表，獲得許多的迴響與討論。會後，隨即造訪雪梨大學獸醫學系，與 MaxWell Chis 教授及 Simon de Graaf 教授討論豬隻人工生殖技術的未來合作發展方向。另亦參與本次會議的衛星會議－「澳洲生殖內分泌研討會：生殖神經內分泌功能研討會」，會議研討的主題為針對內分泌如何影響生殖神經的功能，分享對於動物繁殖內分泌調控的新知。本次派員到澳大利亞出席國際專業會議的行程，除了獲致國際研究最新的進展狀況，有助於我國相關研發領域的發展之外，透過成果的發表和與國際學者專家的交流，亦有利於我國未來研究能量與深度廣度的提升。

貳、目的

人工輔助生殖技術 (artificial assisted reproduction technology, ART) 在畜產經濟動物產業方面的發展應用，係著眼在遺傳物質之保存及提升生殖效率。在豬方面，ART 的研發層面由精液衍伸至胚的生產以及生物分子醫學的應用潛力，在科學界受到極大的關注。本 (第九) 屆豬精液保存國際會議 (The 9th International Conference on Boar Semen Preservation, 2019 ICBSP) 今年在澳大利亞召開，生理組陳立人研究員兼組長獲邀出席並擔任本屆會議臺灣地區籌備委員，因此，帶領組內二位同仁前往與會，除發表研發成果藉以展現我國在畜牧生殖生理研究之發展進程，並藉此會議之參與和國際學者專家交流有關動物精液採集、冷藏與冷凍保存、冷凍乾燥保存及相關人工生殖生物等技術經驗與知識。

因此，本次赴會最主要目的便是藉由出席會議發表研發成果並與國際間公豬生殖領域的學者專家研究成果交流與學習。以及造訪雪梨大學研究人員討論未來五年合作之分工與研究方向，藉此加強臺澳間相關技術之合作交流，期能建立長期合作關係，提升臺灣於相關領域發展之能量。

參、過程

一、會議行程：本次會議行程如表 1。

表 1. 赴澳大利亞雪梨行程

| Date 日期 | City 城市 | Location 地點 | Program 行程 |
|------------|--|---|--|
| 8/10 | 去程：臺灣（桃園國際機場）→ 澳大利亞（雪梨國際機場） | | |
| 8/11 | Hunter Valley of NEW Wales 新南威爾 士州獵人 谷 | Chateau Elan Resort 伊蘭城堡度假 村 | IXth International Conference on Boar Semen Preservation 第九屆國際公豬精液保存會議 |
| 8/12 | | | |
| 8/13 | | | |
| 8/14 | | | |
| 8/15 | Sydney (雪梨) | 雪梨大學獸醫 學院 | 家畜生殖科技研習 |
| 8/16 | | | |
| 8/17 | | 雪梨市區 | 澳大利亞文化參訪行程 |
| 8/18 | | International Convention Centre | 澳大利亞生殖內分泌研討會 |
| 8/19 | 回程：澳大利亞（雪梨國際機場）→ 臺灣（桃園國際機場） | | |

二、會議內容

(一) 國際公豬精液保存會議肇始於 1983 年。迄今已在歐洲和北美洲舉行過八次會議。這是第一次移到南半球的澳大利亞舉辦。本年度出席會議的學者專家以美國籍人數最多，另外有來自西班牙、德國、法國、瑞典、荷蘭、俄羅斯、澳大利亞、墨西哥、葡萄牙、中國、泰國及臺灣等合計 13 個國家 60 多位的學者專家出席參與會議 (圖 4、圖 5)。

(二) 本屆會議最重要的議題係針對氣候變遷之於公豬精子的濃度和品質的影響下，如何因應以進行更有效率的人工授精，及如何降低人工授精時所需的精子濃度，並配合不同授精方式及相關因應策略，來有效解決甚至提升未來可能面對的母豬繁殖問題。會議依各國研究學者研究領域和專長，分為八大主題進行專題研討，包括：精子的保存、精漿功能、精子檢測能力發展下對精子性能提升的生物技術、精子質量控制、生物安全、精液品質評估、人工授精及體內與體外受精等重要的課題依序報告並進行詢答討論。共發表 31 篇主題研究報告與 20 篇海報展示 (表 3)。會議中也有豬精液生技公司參與，展示與豬人工授精操作、精液檢測分析儀器及其相關試劑與設備附件，提供與會者了解目前經專家及研發人員研發

的成果產業化的實際進展與現場應用的效能。本所在本屆會議中發表有關公豬精液之 3 項研究成果，經大會審核後有 2 項分別獲選為「精液評估」與「人工授精」的主題領域之海報展示；另 1 項則被大會推薦為「發展對精子性能提升的生物技術」主題領域進行口頭報告發表。

林秀蓮助理研究員海報展示發表之主題為「Application of Annexin V magnetic beads enriches boar sperm of high quality」(圖 6)，該研究係利用膜聯蛋白 AnnexinV 結合 NTA 磁珠用以純化公豬精液的研究成果。將豬精液稀釋成 300×10^6 /mL 的濃度後，在乾淨的 Eppendorf 管中與 400 μ g Annexin V NTA 磁珠在室溫下靜置 20、40 和 60 分鐘，進行磁珠-精子結合處理。然後，把試管置放在磁力架上放置 30 秒鐘，以將結合精子的磁珠固定在管壁上，隨即收集上清液，即以電腦輔助精子分析系統 (CASA) 評估精子活力參數。Annexin V NTA 磁珠處理 20 分鐘和 40 分鐘後活動精子的百分比分別增加了 19.9% 和 5.6% ($P < 0.01$)。Annexin V NTA 磁珠處理 20、40 和 60 分鐘後，直線行進精子的百分比也分別提高 7.5%、19.4% 和 12.4% ($P < 0.01$)。此外，各處理組精子之 DAP、DCL、LIN、STR、VAP、VCL、VSL 等精子活力參數也高於對照

組 ($P < 0.001$)。根據前述結果顯示，Annexin V 蛋白標記磁珠可有效分離死亡精子以提升公豬精液品質。陳裕信助理研究員發表的海報展示主題為「Successful IVF of IVM porcine oocytes with cryopreserved epididymal spermatozoa from Lanyu boars」(圖 7)。該研究的目的是對蘭嶼豬附睪精液進行冷凍保存並在解凍後用與體外成熟卵母細胞進行體外受精以測試生產體外胚的效能。收集蘭嶼豬附睪採集附睪精液，加入精液稀釋 BTS 於 15°C 下平衡 2 h，然後以 $800 \times g$ 離心 10 分鐘以除去上清液。加入含 6% 甘油 v/v 的乳糖-蛋黃的冷凍保護液，在 5°C 下平衡 4 小時後，裝入 0.5 mL 吸管，置於液氮上方 4 cm 處 10 min 後置入液氮中冷凍保存。冷凍精液解凍後，評估比較冷凍前後的精子運動能力和活力。冷凍解凍後的精子 (1×10^5 細胞/mL) 與體外成熟的卵母細胞共培養 3 小時進行體外受精，並將受精卵培養 6 天，以評估卵裂率和囊胚發生率。分析結果顯示，冷凍前平均精子活力和存活力分別為 90.4% 和 93.6%，冷凍後為 34.0% 和 45.0%。解凍後蘭嶼豬附睪精子的體外受精所致之卵裂率和囊胚發生率分別為 41.56% 和 11.13%。實驗結果顯示，採自蘭嶼公豬附睪的精子可被冷凍保存並成功用於體外胚的生產系統，此等技術可利用於蘭嶼豬遺傳種原保種。另一項被會議審核選定為口頭報告的研

究成果為陳立人研究員兼組長所主導的「Application of PrestoBlue™ to evaluate boar semen quality」(圖 8、圖 9)，經陳組長向大會推薦由林秀蓮助理研究員進行口頭發表。該研究目的旨在建立 PrestoBlue™ 檢測公豬精子性能的方法，並與利用流式細胞儀檢測(FC)和電腦輔助精子分析(CASA)的分析結果進行比較。公豬精液採集後，分為活的和殺死的部分，分別以 PBS 稀釋至 300 和 150×10^6 精子/mL，然後各自混合製成濃度不同、活和死精子比例為 0/10、2/8、4/6、6/4、8/2 和 10/0 (v/v) 的精液等分試樣，再以 PrestoBlue™ 檢測法進行分析。試驗以精液/ PrestoBlue™ 的體積比分別為 100/10、200/10 和 200/20，並在靜置培養達 0、10、20、30、40、50、60 分鐘時檢測 OD 值。相同的精子樣本同時亦以 FC 檢測精子活力，頭帽完整性和線粒體活性，並以 CASA 檢測精子活力和前進行性運動精子比率。結果顯示，PrestoBlue™ 檢測法最佳的公豬精液測試濃度為 300×10^6 精子/mL，最適之精液/ PrestoBlue™ 的體積比為 100/10。PrestoBlue™ 在處理後 30 分鐘時的衰減率與精子生存能力($r = 0.969$)，頂體完整性 ($r = 0.972$)，線粒體活性 ($r = 0.921$)，總運動性 ($r = 0.952$) 和進行性運動 ($r = 0.963$) 呈高度相關。相較於

FC 與 CASA 系統的分析結果，PrestoBlue TM 檢測法有潛力發展為一種評估公豬精液品質之有效而經濟的方法。

(三) 結束與來自世界各地的研究學者專家進行密集的學術成果發表和討論有關公豬繁殖科學、精子學和相關生物技術的最新研究成果和儀器設備的研發進展之四天豬精液保存國際會議之全部議程後，隨即造訪雪梨大學。除參訪獸醫學系，並拜會 MaxWell Chis 教授及 Simon de Graaf 教授。雖然 MaxWell Cris 教授已經退休，但先生學識淵博譽重杏壇，依然在雪梨大學獸醫學系擔任榮譽講座，且為澳大利亞生殖學會的理事主席。他曾經在 2009 年受遺傳育種組吳明哲組長之邀造訪本所並指導豬隻人工生殖技術。Simon de Graaf 教授為 MaxWell Chis 教授先前曾經指導過的博士生，曾於 2010 年受本所生理組長陳立人之邀，來所指導山羊腹腔鏡授精的人工生殖技術。翌年，本所生理組曲鳳翔助理研究員與康定傑助理研究員(現任本所恆春分所副研究員)亦曾赴澳大利亞雪梨大學，從 Simon de Graaf 教授進一步實地大量進行山羊腹腔鏡授精的操作，以精進該項山羊人工生殖的操作技術。同時，曲及康員也在 Simon de Graaf 教授的實驗室學習精子性別分選的儀器操作技術，並且把這兩項重要的人工生殖科技

引進本所。拜會 MaxWell Chis 教授與 Simon de Graaf 教授除了向他們師徒向來不吝對本所同仁傳授新技術致敬意，也感謝他們持續地與本組保持密切聯繫與交流。會談中針對全球氣候變遷對於家畜生殖性能可能造成的影響及因應對策做深入且廣泛的討論。另外，由於 Simon de Graaf 教授與法國農部 INRA 的 Pascal Mermillod 博士也有跨國計畫合作，因此，也對臺法澳家畜人工生殖及相關生物技術研究方向的未來發展與國際研究的分工進行深入的討論。藉此等拜會交流加強跨國間相關技術之合作，期能延續長久以來的合作關係，提升臺灣於相關領域發展之能量與國際參與度。另外，亦至雪梨國際會議中心參與本次會議的衛星會議——「澳洲生殖內分泌研討會：生殖神經內分泌功能研討會」（圖 10、圖 11、圖 12）。此衛星會議係由澳洲內分泌學會(the Endocrine Society of Australia)、澳大利亞生殖學會(the Society for Reproductive Biology of Australia)及亞太甲狀腺協會(Asia and Oceania Thyroid Association)所聯合舉辦。在 8 月 18 到 21 日舉辦的研討會議程中，最主要針對的主題為「甲狀腺和生殖內分泌系統對於動物生殖神經功能表現的影響」。然因行程時間及經費有限，只能在 MaxWell Chis 教授協助下以觀察員身分參與

開幕式以及有關甲狀腺超音波掃描檢測影像的解讀與結節移除等技術發展之第一天議程，另及參觀海報展示以汲取澳大利亞相關生殖內分泌與生殖神經體系等研究領域的學者分享之動物內分泌系統對於繁殖功能調控的新知。

本次派員到澳大利亞出席國際專業會議的行程，除了獲致國際豬精液相關領域研究最新的進展狀況，有助於我國研發領域的規劃與發展之外，透過成果的發表和與國際學者專家的交流，亦有利於我國未來研究能量與深度廣度的提升。

(四) 第九屆國際公豬精液保存會議議程與學術發表標題

IXth International Conference on Boar Semen Preservation
Conference Program Detail

IXth International Conference on Boar Semen Preservation
Sunday 11 – Wednesday 14 August 2019

Conference Program Detail

DAY 1 – SUNDAY 11TH AUGUST 2019

2:00PM - 5:00PM

Registration opens

Accommodation Check in 3:00pm

6:00PM - 8:00PM

Conference Reception BBQ on Fairway Lawn

DAY 2 - MONDAY 12TH AUGUST 2019

8:00AM - 8:15AM

Welcome Address

8:15AM - 9:00AM

Keynote Address

Chair: Roslyn Bathgate

8:15 AM **Dagmar Waberski**, *University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany*

Application of preserved boar semen for artificial insemination: past, present and future challenges

9:00AM - 10:30AM

Session 1: Sperm preservation 1

Chair: Simon de Graaf

9:00 AM **Juan Rodriguez-Gil**, *Autonomous University of Barcelona, Spain*

Photostimulation and thermotaxis of sperm

9:40 AM **Sean Fair**, *University of Limerick, Ireland*

Implications of boar sperm kinematics and rheotaxis for fertility after preservation

10:30AM - 11:00AM

Morning Tea and Industry Exhibition

11:00AM - 12:30PM

Session 2: Sperm preservation 2

Chair: Chis Maxwell

11:00 AM **Inmaculada Parrilla**, *University of Murcia, Spain*

Boar semen proteomics and sperm preservation

Short Presentations

11:40 AM **Anaïs S Østergaard**, *GenePro, Wisconsin, United States*

Effects of cold shock and warming rate on boar semen *abs# 1.1*

11:55 AM **Isabel Barranco**, *University of Girona, Girona, Spain*

Relative GSTM3-abundance in fresh boar sperm is related to their cryotolerance *abs# 1.2*

12:10 PM **Pachara Pearodwong**, *Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*

Replacing egg yolk with lecithin in the semen extender compromises the quality of frozen-thawed boar sperm *abs# 1.3*

12:30PM - 1:30PM

Lunch and Industry Exhibits

1:30PM - 3:00PM

Poster Session

3:00PM - 3:30PM

Afternoon Tea and Industry Exhibition

DAY 3 - TUESDAY 13TH AUGUST 2019

8:00AM - 10:00AM

Session 4: Capacitation

Chair: tba

8:00 AM **Peter Sutovsky**, *University of Missouri, United States*

Boar semen improvement through sperm capacitation management, with emphasis on Zinc ion homeostasis

8:40 AM **Naomi Bernecic**, *University of Sydney, Australia*

Novel methods to detect capacitation-related changes in spermatozoa

Short Presentations

9:20 AM **Alfredo Medrano**, *National Autonomous University of Mexico, Cuautitlan Izcalli, Mexico*

The effect of pre-freeze cooling and melatonin on pig sperm plasma membrane fluidity and cryosurvival *abs# 3.1*

9:35 AM **Anne-Marie Luther**, *University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany*

Multicolor flow cytometry visualization of storage-induced alterations of capacitation behavior in viable boar sperm. *abs# 3.2*

10:00AM - 10:30AM

Morning Tea and Industry Exhibition

10:30AM - 12:00PM

Session 5: Biotechnology

Chair: Naomi Bernecic

10:30 AM **Stefanie Kurtz**, *Friedrich-Loeffler-Institute, Mariensee, Germany*

Pre-determination of sex in pigs by application of CRISPR/Cas system for genome editing

11:10 AM **Jean Feugang**, *Mississippi State University, United States*

Treatment of boar sperm with nanoparticles for improved fertility

Short Presentation

11:50 AM **Kara Stewart**, *Purdue University, Indiana, United States*

Shotgun proteome analysis of seminal plasma proteins differentiate boars by reproductive performance *abs# 4.1*

12:00PM - 1:00PM

Lunch and Industry Exhibits

1:00PM - 3:00PM

Session 6: Quality control and Biosecurity

Chair: tba

1:00 PM **Darwin Reicks**, *Reicks Veterinary Research and Consulting, Minnesota, United States*

Effective biosecurity to protect studs and clients from emerging infectious disease

1:40 PM **Martin Schulze**, *Institute for the Reproduction of Farm Animals Schönow Inc, Germany*

New trends in production management in European boar studs

Short Presentations

2:20 PM **Julie Robinson**, *Kuster Research and Consulting Inc., Illinois, United States*
Prevalence and Economic Consequences of Chromosomal Abnormalities in the North American Boar Population *abs # 5.1*

2:35 PM **Rodrigo M Godinho**, *Topigs Norsvin Research Center, Beuningen, the Netherlands*
Dissection of variance for semen quality traits to assist boar AI stations *abs # 5.2*

3:00PM - 3:30PM

Afternoon Tea

3:30PM - 5:30PM

Session 7: Semen assessment

Chair: Robert Knox

3:30 PM **Gry Boe-Hansen**, *University of Queensland, Australia*
An update on boar semen assessments by flow cytometry and CASA

Short Presentations

4:10 PM **Jean Feugang**, *Mississippi State University, United States*
Exploring potential biomarkers for boar sperm cryopreservation using RNA-sequencing technology *abs# 6.1*

4:25 PM **Hsiu-Lien Lin**, *Taiwan Livestock Research Institute, Tainan, Taiwan*
Application of PrestoBlue™ to evaluate boar semen quality *abs# 6.2*

4:40 PM **Rudolf Grossfeld**, *Minitube GmbH, Tiefenbach, Germany*
Optimal sample volume for the eFlow system for boar semen concentration measurement with AndroVision® CASA *abs# 6.3*

7:00PM - 10:00PM

Conference Dinner at Chateau Elan

DAY 4 – WEDNESDAY 14TH AUGUST 2019

8:00AM - 10:00AM

Session 8: Artificial Insemination

Chair: Chis Maxwell

8:00 AM Jessica Rickard, *The University of Sydney, Sydney, Australia*

The fate of spermatozoa in the female reproductive tract: A comparative review

Short Presentations

8:40 AM Inmaculada Parrilla, *University of Murcia, Spain*

Pre-AI intrauterine seminal plasma infusions advance embryo development by up-regulating PI3K/AKT and MAPK/ERK signaling pathways? *abs# 7.1*

8:55 AM Robert Knox, *University of Illinois, Illinois, United States*

Effects of number of sperm and site of uterine semen deposition on conception rate and number of embryos in weaned sows receiving a single fixed time insemination *abs# 7.2*

Special Presentations and Roundtable

9:10 AM Graeme Pope, *Graeme Pope Consulting, Australia*

Status of pig AI in Australia

9:30 AM Speaker tba

Status of pig AI in South East Asia

10:00AM - 10:30AM

Morning Tea and Industry Exhibition

10:30AM - 12:00PM

Session 9: In vivo and in vitro fertilisation

Chair: Jessica Rickard

10:30 AM Raquel Romar, *University of Murcia, Spain*

Pig *in vitro* fertilization: where are we and where do we go?

11:10 AM Jane Morrell, *Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden*

Effect of colloid centrifugation on boar sperm quality during storage and function in *in vitro* fertilization

12:00PM - 12:15PM

Closing ceremony

12:15PM - 1:15PM

Sit Down Farewell Lunch

(五) 大會專題講座

此次會議，主辦單位針對豬人工繁殖研究領域八大主題，包括：精子的保存、精漿功能、精子檢測能力發展下對精子性能提升的生物技術、精子質量控制、生物安全、精液品質評估、人工授精及體內與體外受精等，共邀請 17 位各領域傑出的科學家擔任重要的課題講座，進行專題演講及研討，摘要其演講內容如下：

Section 1: Sperm Preservation

Sean Fair

University of Limerick, Ireland

Implications of boar sperm kinematics and rheotaxis for fertility after preservation.



人工授精是商業母豬繁殖的主要程序。最常

用的精液形式是新鮮採集經稀釋低溫保存的樣態，此等精液的操作涉及以溶液稀釋新鮮精液以增加其體積，並保留精子的存活率及活力以供其在 3 到 7 天內之人工授精使用。通常，在 15 至 17°C 下稀釋精液可存放 3 - 5 天，人工授精獲致之產仔率為 80 - 90%，產仔數

為 13 - 14 頭，然而各國的豬場間亦存在著很大的差異。由於氣候變遷導致全球性之豬隻生育力下降，優良公豬之冷凍精液更被廣泛用於特定用途，例如有價值的遺傳物質的保存以及精子的長距離運輸等等。傳統上，人工授精是將精液注入母豬子宮頸前端，而授精量約為 80 - 100 mL，其中約含 2 - 30 億精子，並在發情開始後的 24 小時內進行兩次人工授精。然而，這種人工授精方法逐漸被新的授精方式所取代，這些方法旨在使注入精液能夠更靠近受精部位，同時也可使用較少的精子數量。子宮頸後授精法 (PCAI)，也稱為子宮內授精法，係在子宮頸之後和子宮體分叉部位之前將精子置於在子宮體內，並將精子的數量減少到十億。由於其技術發展提供的便利及其在生產水準上的眾多優勢，使 PCAI 在集約化養豬業密集的国家逐漸取代傳統的 CAI，成為主要的人工授精方法。公豬精液在授精前應進行精液品質檢測，妥適的公豬精液的生產流程控制，可增長豬精液的生產和質量，例如公豬管理，細菌污染控制、精液採集、處理和儲存。使用體外測定法預測公豬精液受精之生育力一直是人工生殖技術研究人員的長期研發目標。公豬精液受精率評估傳統的方法是鏡檢進行評估精子質量的檢測，例如精子濃度和射精量，精子形態和精子活力。最近開發的評估精子功能參數的測試方式，則以螢光染色精子，並以電腦輔助精液分析來鑑定精子 (CASA)

以評估多個精子動力學參數與公豬的繁殖力的相關性。精子活力和授精精子數、人工授精時母豬體內的授精置放的位置，關係到人工授精時母豬生育力表現未來，微流體系統的研發將提供更多生理學方法來研究在不同條件下的精子游動方式。相較於玻片內靜態液滴中的精子運動性和流體動力學，精子在粘性溶液中逆流活動的表現被認為更合乎其在母豬生殖道內的生理特性，使它們更能夠表現出更自然的游動方式。

Inmaculada Parrilla
University of Murcia, Spain



Proteomics and boar sperm preservation

利用蛋白質體學方法已可鑑別諸多影響精子
功能(包括受精能力)表現的的精子 and 精漿(SP)

蛋白質 (圖 1)。有關公豬 SP 和精子蛋白質體的當前知識，主要側
重於探討其與精子保存程序 (液體儲存或冷凍保存) 的相關性，以
及它們在精子功能和生育力方面的影響，以廓清正常精子功能和受
精能力。因此，從長遠來看精子和 SP 蛋白質體學的研究，對於更深
入了解生殖功能的分子機制和控制和優化豬的生殖效率都具有極為
重要的意義。

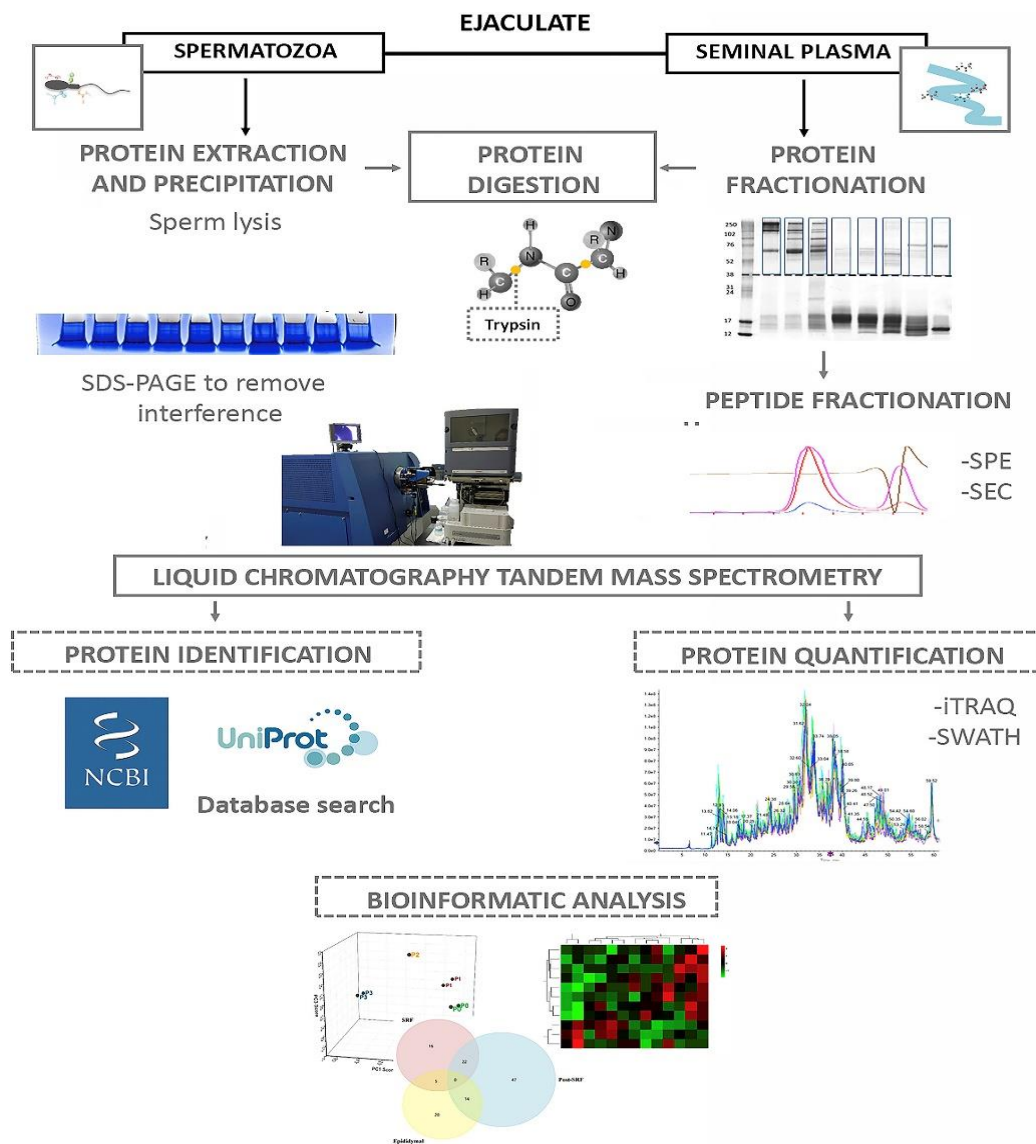


圖 1. 精子或精漿的高通量蛋白質組學典型工作流程。主要步驟包括蛋白質萃取，樣品分級分離，質譜分析和生物資訊學分析。

Section 2: Seminal plasma

Marc Yeste

University of Oxford, UK

Potential of seminal plasma to improve the fertility of frozen-thawed boar spermatozoa



人工授精 (AI) 被廣泛用於家畜育種。儘管精子冷凍保存是長期保存的最有效方法，但由於冷凍保存操作對公豬精子質量的負面影響，致使其於豬 AI 中的應用還很有限。精液去除精漿是精子冷凍前的常規操作，但尚未對豬精子功能表現的影響進行過詳盡的研究。在這種情況下，儘管精漿被視為僅僅是精子的載體，亦不排除精漿影響豬的精子繁殖力的相關可能。實際上，精漿不僅可以在授精前/授精後與雌性生殖道發生相互作用，而且已經證明它可以調節精子的功能。為探索精漿成分是否與精子功能、生育力和耐低溫性有所關聯，很多專家已經開始研究精漿的組成及其蛋白質體學。先前的研究顯示，在冷凍保存之前或之後添加精漿，對於維持解凍公豬的精子質量和受精能力有所影響，然而，添加精漿的試驗結果好壞迄今莫衷一是。檢查豬精漿的組成，並了解各種組成成分對於解凍前後精子的影響，應該是未來主要的研究課題之一 (表 2)。

表 2. 精漿蛋白與公豬精子的受精能力和耐凍性

| Protein | Type | Function | References |
|--------------------------|------------------------------------|---|-----------------------|
| PON-1 | Phosphotriesterase activity enzyme | Enzyme activity positively correlated with rapid and progressive movement and negatively correlated with intracellular ROS generation | [27] |
| AQN-1 | Heparin-binding spermadhesin | Contribution in the formation of the oviductal sperm reservoir; affinity for ZP; inhibition of in vitro capacitation and capacitation-like changes induced by cooling | [28–30] |
| AQN-3 | Heparin-binding spermadhesin | Acrosome-stabilizing factor; affinity for ZP; inhibition of in vitro capacitation and capacitation-like changes induced by cooling | [28,30,31] |
| AWN-1 | Heparin-binding spermadhesin | Acrosome-stabilizing factor; affinity for ZP; decapacitating factor | [26,32] |
| PSP-II | Non-Heparin-binding spermadhesin | Protection from premature capacitation | Reviewed by Ref. [33] |
| PSP-I/PSP-II heterodimer | Non-Heparin-binding spermadhesin | Maintenance of viability and motility, preservation membrane integrity and mitochondrial activity | [23,34,35] |
| FN-1 | Extracellular matrix glycoprotein | Marker for boar sperm freezability | [36] |
| DQH | Heparin-binding protein | Forming a complex with spermadhesins AWN and AQN contributes in the formation of the oviductal sperm reservoir and the sperm-oocyte junction; inhibition of in vitro capacitation and cooling induced capacitation-like changes | [20,28,37] |
| L-PGDS | Lipocalin enzyme | Marker of boar sperm freezability | [38] |

Abbreviations: Zona Pellucida (ZP), Paraoxonase-1 (PON-1), Porcine Seminal Plasma (PSP), Fibronectin-1 (FN-1), Aspartic acid-glutamine-histidine protein (DQH), Prostaglandin D synthase type lipocalin (L-PGDS).

Section 3: Capacitation

Peter Sutovsky

University of Missouri, USA

Boar semen improvement through sperm capacitation management, with emphasis on zinc ion homeostasis

精子獲能使動物的精子具有運動能力和授精能

力，精子在雌性輸卵管的獲能對哺乳動物的受精

成功至為重要。精漿蛋白將精子的頭部粘附在輸卵管上皮上，並最

終使超活化之精子從輸卵管壁中釋放出來。作者發現獲能誘導的精

子鋅離子外流作用激發，反映精子獲能狀態和授精能力。日糧中營

養補充鋅離子和直接添加到稀釋液中可能有助於提升人工授精(AI)

的效能。蛋白質體學的研究有助於研發 AI 時稀釋液中鋅添加劑量的

決定或可以用於精子稀釋液開發以及提升公豬精子的冷凍保存效率，

還可以改善 IVF 的研究和商業胚胎生產。

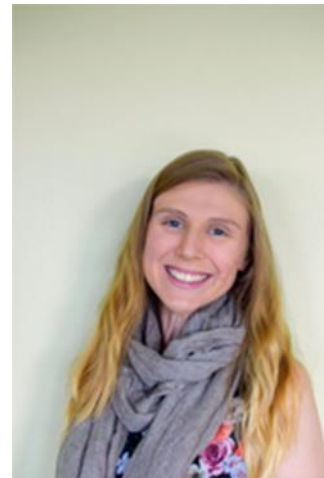


Naomi Bernecic

The University of Sydney, Australia

Novel methods to detect capacitation-related changes in spermatozoa

在與卵母細胞相互作用之前，精子必須先進行獲能，這涉及在雌性生殖道中發生的一系列理化性轉化。由於獲能是成功受精的先決條件，



這是精子生物學家非常感興趣的話題，但是涉及的許多生化和生物物理過程的複雜性使其難以測量。獲能是一個極其複雜的事件，包含許多集成過程，這些過程可以在此時間段內同時發生。因此，準確地評估和量化獲能的鑑定技術對於深入了解這一迷人的精子成熟事件至關重要。儘管文獻中有大量綜評集中在討論獲能過程中精子的功能變化，但很少有人研究過衡量這些變化所需的方法。本文的目的是強調常用的方法來量化獲能的不同階段並確定有可能發展的新技術，並討論能夠調節各種獲能過程的因素，以提供作為研究人員一種方法工具箱，可用於更深入地了解精子獲能的複雜性。獲能期間事件的發生。隨著精子接近輸卵管，碳酸氫鹽濃度增加，sAC被激活，隨後激活 cAMP-PKA 途徑。(1) 由於 PKA 活性介導的磷脂加入，精子細胞膜變得越來越不穩定，(2) 膜流動性增加使得膽固醇可以重新分佈到精子頂端，並且在膜膽固醇外流的過程中，膽

固醇受體可以調節這種固醇的損失，(3) 在獲能的後期階段，PKA 作用的下游事件是酪氨酸殘基蛋白的磷酸化增加，從而導致與受精相關的蛋白修飾，(4) 過度激活是一種鈣依賴性，導致精子向卵子運動以致與透明帶的結合，(5) 一旦與透明帶接觸，精子就會進行頂體反應，(6) 這是另一個鈣依賴性過程，能夠釋放可降解透明帶糖蛋白層的裂解酶。該最後階段導致成功的精子與卵子之間的接觸，從而實現受精(圖 2)。

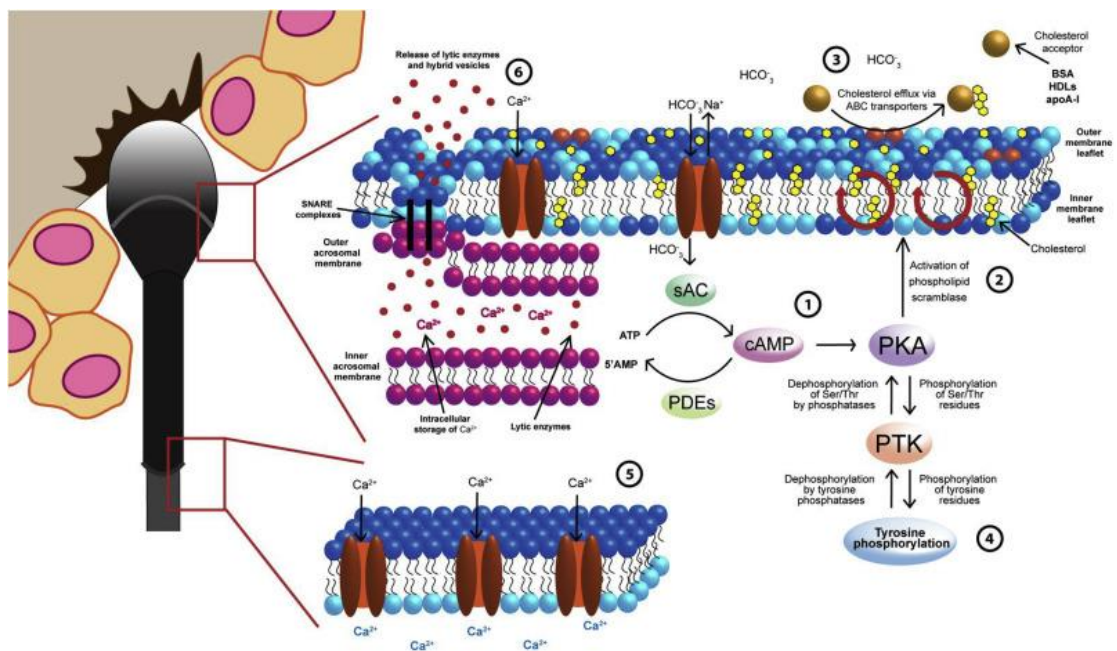


圖 2. 獲能期間事件的發生。

Section 4: Biotechnology

Jean Feugang

Mississippi State University, USA

Treatment of boar sperm with nanoparticles for improved fertility



在奈米科學方面不斷進步下，透過各種具獨特的物理化學性質之奈米級顆粒的合成，對於多種生物的研究與應用至關重要。儘管在各種體外和體內研究中均顯示出納米顆粒具有毒性（奈米毒性），但經精心設計的生物相容性，以及與單細胞和多細胞生物的有效相互作用已可使用於生物醫學領域研究。在獸醫科學中合成和應用的各種奈米顆粒，已顯示出有可能影響動物生產系統中的常規操作。包括精液採集後的操作和對優質精子的保護，以延長其保存時間，並改善與精子有關的生物技術，例如以精子為媒介的基因轉移、精子分選、性別分選和冷凍保存。因此，將基於納米技術的工具應用於精液可提升人工生殖技術與生物醫學應用，並提高農民的經濟生產力。我們用奈米技術新興工具，進一步選擇優質公豬精子和構成採集後精液操縱的新範式，以改善與精子有關的生物技術和公豬的生育能力。本文概述的進展已經證實可合成用於精液純化的新型奈米顆粒，並且可以預見用於高通量地選擇最佳精子。預期將以新合成

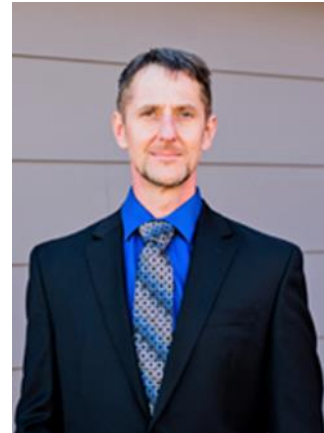
的奈米顆粒進行更多的體內和體外研究，以提供有效的精液操縱方法，而且不會影響其生育能力。

Section 5: Quality control and biosecurity

Darwin Reicks

Reicks Veterinary Research & Consulting, USA

Effective biosecurity to protect North American studs and clients from emerging infectious



保護公豬免受新生傳染病的侵害，首先要採取有效的生物安全措施，將疾病排除在外。其次，要在傳染病散播之前及早發現，並停止精液配發。在 1999 - 2004 年期間，北美發生許多 PRRS 病毒（豬繁殖與呼吸綜合症）陰性公豬被感染後，並藉由精液而向商業肉豬場大量傳播病毒。因此，需要能更早檢出的檢測方法，並且在確定檢測結果為陰性之前保留精液不配發成為標準的作程序。與此同時，也要進行研究以助釐清將 PRRS 病毒引入農場的主要途徑。僅專注解決人員和物品進入的管制，並不能完全消除新的病毒進入的問題。2005 - 2008 年間實施的空氣過濾，對公豬新病毒的引入率產生了重大影響。北美引入 PED 病毒（豬流行性腹瀉）的案例，進一步凸顯了其他風險因素的影響，例如飼料成分、車輛衛生以及結合包括空氣過濾在內的生物安全程序，在過去的十年中，使得北美公豬的傳染病傳入率明顯改善。明確定義的人和動物出入管制，進料的消毒

和/或停機時間，飼料成分測試以及空氣過濾的要求，已成為防止新興傳染病引入公豬場的關鍵。由於 PED 在全球傳播，通過飼料引入新病毒也引起了人們的關注。在這個領域需要更多的研究工作，但是明智的預防措施是避免在飼料中使用豬源的飼料成分。

Martin Schulze

Institute for the Reproduction of Farm Animals
Schönow Inc, Germany

New trends in production management in
European pig AI centers



減少每次人工授精 (AI) 劑量的精子數量並以
確保更高質量的方式管理精液，乃是豬 AI 中

心精子操作程序上當前所面臨的挑戰。基於對不同豬 AI 中心的操作
程序步驟進行的多年比較分析，以及在標準化實驗室條件下進行的
補充實驗研究，目前有關公豬精液保存的操作標準程序已經更新。

目前，這些更新的標準程序係為德國、瑞士和奧地利的十個不同組
織中的 29 家歐洲豬 AI 中心的質量保證。改善衛生管理和謹慎使用
抗生素的準則已成為關鍵問題。新的質量控制工具已在公豬精液的
加工和運輸中實施，例如，使用折光法以估算稀釋劑的滲透壓，並
使用移動感應程序連續監測各種環境參數。此外，基於在實驗室和
野外條件比較下進行的一系列實驗結果，制定優化精液稀釋操作以
及在公豬精液製作過程中進行時間和溫度管理的指南並據以實施。

同樣，關於儲存過程中精液劑量處理的建議也已更新。多年來，精
液質量保存體系的效能已由細菌污染的減少和精液劑量質量的提高
而有所呈現。綜而言之，以科學為基礎的質量保證是提高豬 AI 中心

生產性能的有效方法，從而為肉豬商業生產提供了高質量和經濟價值的精液。越來越多的精子生理知識以及技術創新將在未來繼續發展和修正質量保證概念，進一步對精子質量和衛生狀況的影響進行系統分析，以確定風險因素和進一步改善豬 AI 中心精液的製作。

Section 6: Semen assessment

Gry Boe-Hansen

University of Queensland, Australia

An update on boar semen assessments by flow cytometry and CASA



利用螢光染色和流式細胞分析技術（FC）進行精子功能分析，是一種高通量、客觀和準確的分析技術。而電腦輔助精液分析（CASA）則可以提供精子細胞運動參數的客觀評估。這些技術的客觀性和可重複性有助於精子功能的研究，從這些極有助力的方法獲得的豐富知識，改變了我們對精子的看法。雖然這些先進的分析檢測方法有助益於生產人工授精（AI）所使用的公豬精液和消除質量不合格精液，但採用的進展仍然很慢。現金，相關儀器越來越便宜，而操作技術上也更加簡便。然而，檢測方法的標準化和儀器設置的同整合，對於這些檢測系統（包括實驗室之間的比較）的全面施用非常重要。本文提供了流式細胞分析和 CASA 系統用於分析公豬精液質量的兩種技術的更新。透過修改的電腦系統，CASA 系統在精子分析的準確性提高許多。包括對於公豬精子運動力的評估的改進，使利用傳統的光學顯微鏡無法進行的螺旋運動以及靠近玻璃表面的受限運動

的影響評估得以進行。另一改進是藉由改善電子設備的成像功能和精子分析的 CASA 應用程序，配合使用手機顯微鏡進行現場診斷。iSperm 是一種智能手機系統，由鏡頭，加熱台和一次性微流控芯片組成，該芯片直接連接至手機或平板電腦，iSperm 可以評估精子濃度和活動精子的百分比，但不能評估活動精子的軌跡。雖然這些簡化的系統在研究中可能沒有價值，但由於其便於攜帶、價格低和操作便利性，適合作為農場現場使用的精子品質分析系統。另外一種系統使用螢光探針測量精子濃度和質膜完整性。精液分析是自動進行的，具有一定程度的客觀性和速度，可以在商業分析中進行更佳的精液質量分析。隨著光學和儀器功能的提高，用於測量精子屬性的技術正在發生很大變化。FC 和 CASA 儀器的發展很快而且還在不斷持續進行，使得精液評估不僅用於確定精液樣本的品質，還可以預測其生育力或授精能力。在公豬精液冷凍保存操作中，通常規定對正常新鮮精液的標準為：形態上正常精子的比率至少為 75%，總運動力 > 70%，且總數 $\geq 20 \times 10^9$ 精子，即每劑精子總數約 20 億。當前的知識和新的評估方法有助於在將公豬納入商業 AI 計畫之前，篩選適合用作為提供製作精液的公豬，剔除可能對畜群繁殖力產生不利影響的個體，從而提高生產效率

Section 7: Artificial insemination

Jessica Rickard

The University of Sydney, Australia

The fate of spermatozoa in the female reproductive tract: A comparative review



精子在雌性之生殖道中旅程是漫長而危險的。公豬的精子藉由其精子表面特性差異，克服在雌性生殖道中所面臨的障礙，通過雌性生殖道而前進並使卵母細胞受精。雌性環境提供精子往前的動力，協助去除死精子和其他病原體，並施加嚴格的選擇壓力以確保只有那些質量最高的精子才能到達受精位置。了解這些自然障礙背後的標準有助於了解精子保存，以及體外操作如何改變精子與雌性環境之間的複雜相互作用。作者簡要描述新鮮和冷凍解凍的公豬精子表面特徵，並比較這些特性如何使它們在雌性生殖道中得以倖存於物理、生化和免疫的相互作用。在母豬子宮收縮的幫助下，精子泳動順利通過子宮。凝集素和 BSP 蛋白將精子與子宮內的上皮細胞結合，以建立精子儲存庫並逃避免疫細胞。精子通過子宮頸和子宮這些第一道防線後，又藉著精子表面特性與輸卵管上皮細胞的相互作用，在宮管接合處和輸卵管處建立了第二個貯庫。一旦從輸卵管上皮細胞釋放，精子獲能和超活化精子就會到達卵母細胞並穿透卵母細胞複

合體。雌性生殖道中精子的轉運和存活一直是生殖生物學家關注的領域。公豬精子表面的 N-乙酰氨基葡萄糖與唾液酸在雌性管道中的結合分別涉及正結合和負結合。了解促進或抑制這種相互作用的機轉可能有助於確定雌性生殖道對精子篩選的特性，以及精子在雌性生殖道轉運與發揮生物功能的關鍵。

Section 8: *In vivo* and *in vitro* fertilisation

Raquel Romar

Universidad de Murcia, Spain

Pig in vitro fertilization: Where are we and where do we go?



豬是重要的家畜。由於豬比其他大型家畜與人類具有更大的生理相似性，因此，其在生物醫學中的用途引起人們的興趣，這尤其是應用在人工生殖技術與基因轉殖等生物技術的發展。然而，豬在胚體外產生的技術發展仍有很大的改進餘地。作者回顧豬體外受精（IVF）過程中使用的程序，添加劑和設備研發，關注重點為改善操作系統每個步驟的效率之提升。我們預計，新的生理學知識發展，將推動豬體外受精領域的進展，包括通過輸卵管液誘導卵子成熟，藉由泳動法製備精子，添加惰性分子或生殖道泌液來增加粘度以及整合培養系統設備等等，提供應該考慮與調整豬 IVF 系統新培養條件（圖 3），應包括在添加輸卵管液的培養基中培養卵母細胞，並且以不涉及離心但包含粘性介質篩檢的方法，選擇具有活動力的精子進行受精，以正確誘發卵子透明帶硬化。配子應在低氧張力（約 7% O₂）和約 37.0°C 至 38.0°C 的

溫度下的培養箱中共培養。培養基應該是粘性的，微鹼性的（pH 值約為 7.8 至 8），並應補充輸卵管分泌物。

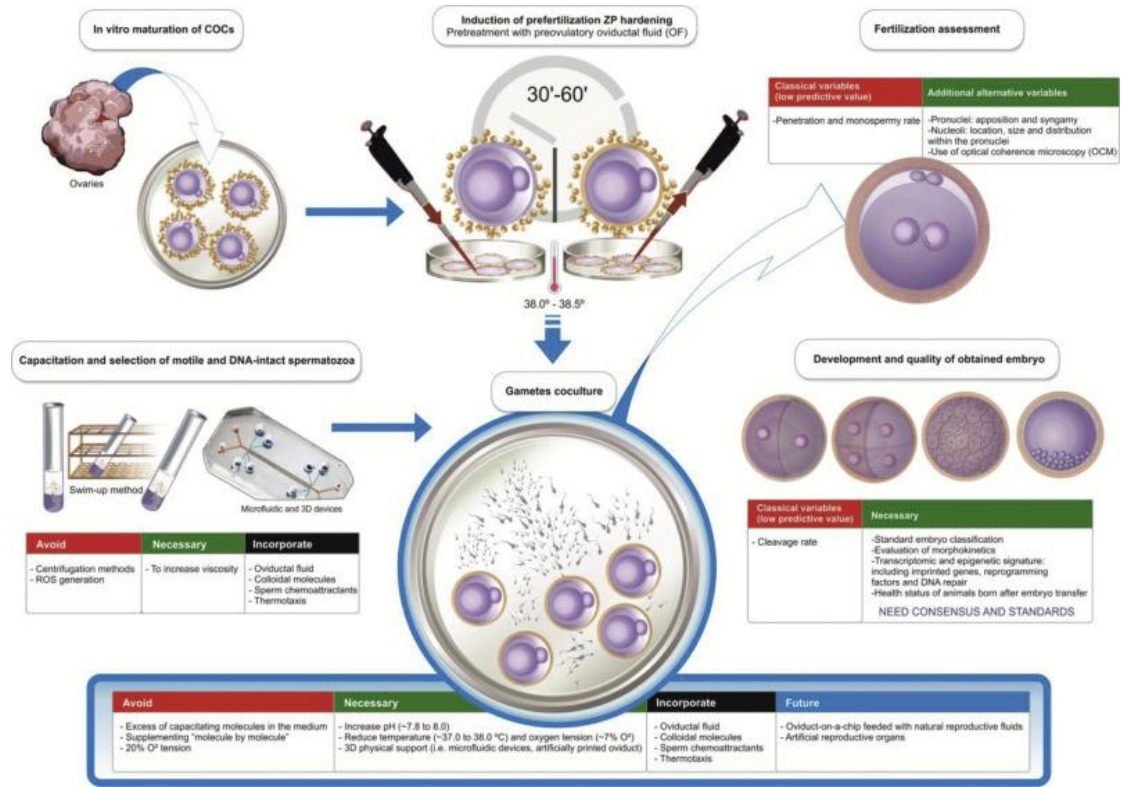
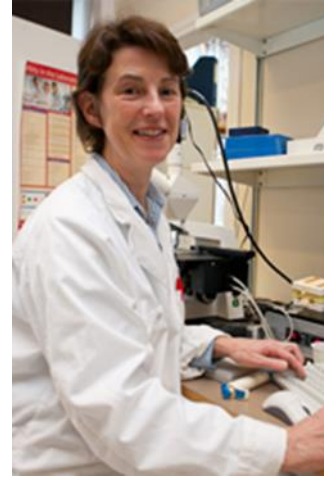


圖 3. 建議豬體外受精系統的參數評估以提高效率。

Jane Morrell

Swedish University of Agricultural Sciences,
Sweden

Effect of colloid centrifugation on boar sperm
quality during storage and function in *in vitro*
fertilization



新鮮精液中含有授精能力不同的精子。篩揀選擇具有特定特徵的精子，可以減少人工授精或體外受精所需的精子數量。作者在本文說明精子質量的含義，提及種種不同的精子篩選方法，特別是梯度密度離心法對公豬精子品質的影響，包括儲存期間的精子品質和體外受精的性能。精液密度梯度離心的操作，有助於篩檢具有生殖力的精子進行冷凍保存，將可助益稀有品種的保護育種。藉由低密度層次並通過單層離心的操作，可降低精液中的細菌載量，也可發展作為替代在精液稀釋液中使用抗生素的方法。

(六) Poster Session

表 3.海報展示的論文題目

| | |
|----|---|
| 1 | Bactibag® : an opportunity to reduce antibiotics use in boar semen processing---Lucie Gavin-Plagne |
| 2 | The integrity of the acrosome affects the fertility of frozen boar semen---Weidong Wu |
| 3 | Enrichment of membrane-intact frozen-thawed boar spermatozoa by magnetic cell sorting (MACS)---Jane M Morrell |
| 4 | Extended shelf life of high genetic merit low sperm count doses in porcine artificial insemination---Peter CH Berkvens |
| 5 | GameteGuard® improves boar post-thaw sperm health---Myles Shepherd |
| 6 | Effect of extender, cryoprotectants and GameteGuard® in post-thaw motility in boar sperm---Raul A. Gonzalez |
| 7 | Potent semen extenders counteract vibration-induced injury in long-term stored boar spermatozoa---Anne-Marie Luther |
| 8 | Favorable seminal plasma environment to sperm fertility after L-arginine addition to boar diet---Jean M Feugang |
| 9 | Seminal plasma superoxide dismutase is related with quality and sperm functionality of liquid stored pig semen doses---Inmaculada Parrilla |
| 10 | Porcine bacteriospermia examined by high-throughput sequencing---Anais Ostergaard |
| 11 | Application of Annexin V magnetic beads enriches boar sperm of high quality---Hsiu-Lien Lin |
| 12 | Update on the development of fresh and frozen sexed sorted boar sperm---Kilby L Willenburg |
| 13 | Cumulus-oocyte complexes-like 3D models to study gamete interaction in porcine species---Raquel Romar |
| 14 | The occurrence of de novo karyotype abnormalities in Boar Artificial Insemination Centers in Spain: Economic implications---Alfonso Bolarin |
| 15 | The role of triterpene acids in boar reproduction---Kirill Plemyashov |
| 16 | The influence of heterozygosity on the productive characteristics of boars and their longevity---Kirill Plemyashov |

| | |
|----|--|
| 17 | Comparative assessment of respiratory activity in boar and reindeer (<i>Rangifer tarandus</i>) semen---Kirill Plemyashov |
| 18 | Comparison of Hoechst 33342 and SYBR14 for the identification of boar spermatozoa during flow cytometric assessment of membrane and acrosome integrity---Lisa A Herickhoff |
| 19 | Vascularization and innervation of the adnexal genital glands (AGG) of boars---Polina Anipchenko |
| 20 | Successful IVF of IVM porcine oocytes with cryopreserved epididymal spermatozoa from Lanyu boars---Yu-Hsin Chen |



圖 4. ICBSP 的口頭專題發表會場



圖 5. 在 ICBSP 的海報展示區與國際學者交流討論。

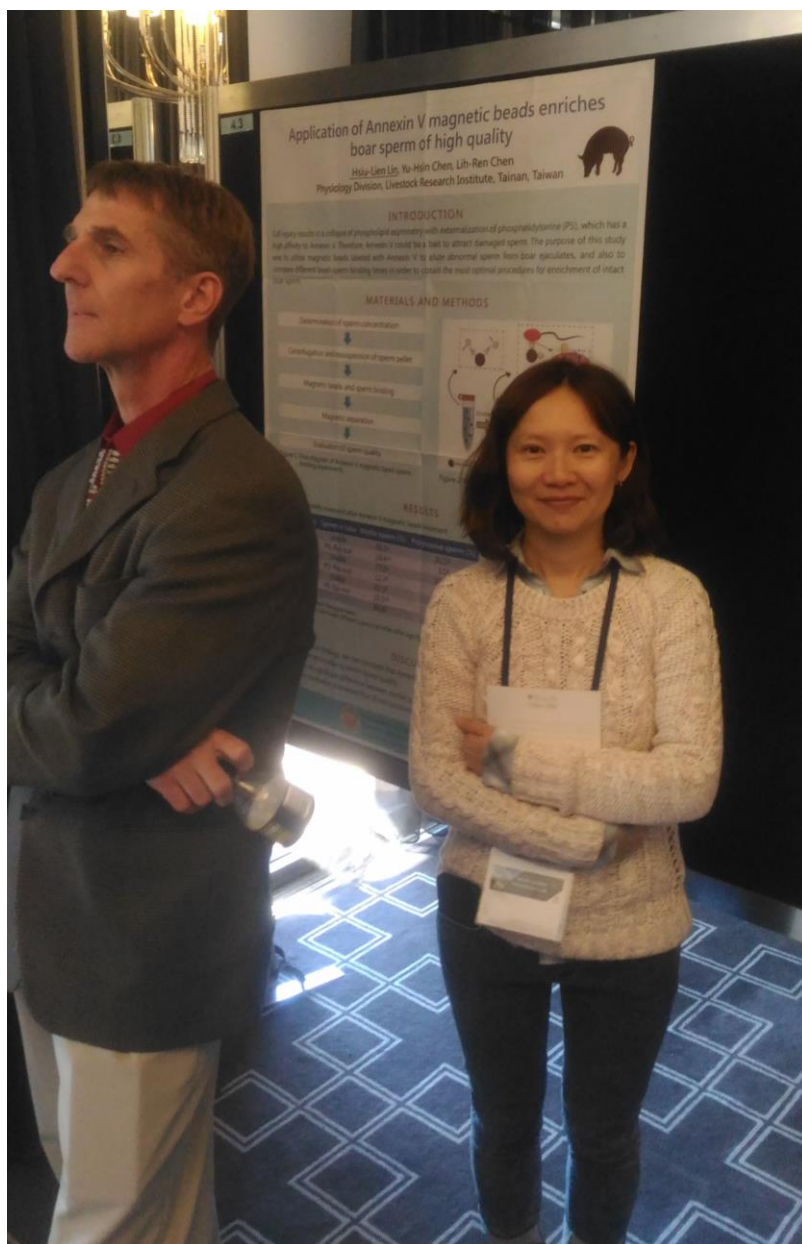


圖 6. 林秀蓮助理研究員以海報發表「Application of Annexin V magnetic beads enriches boar sperm of high quality」。

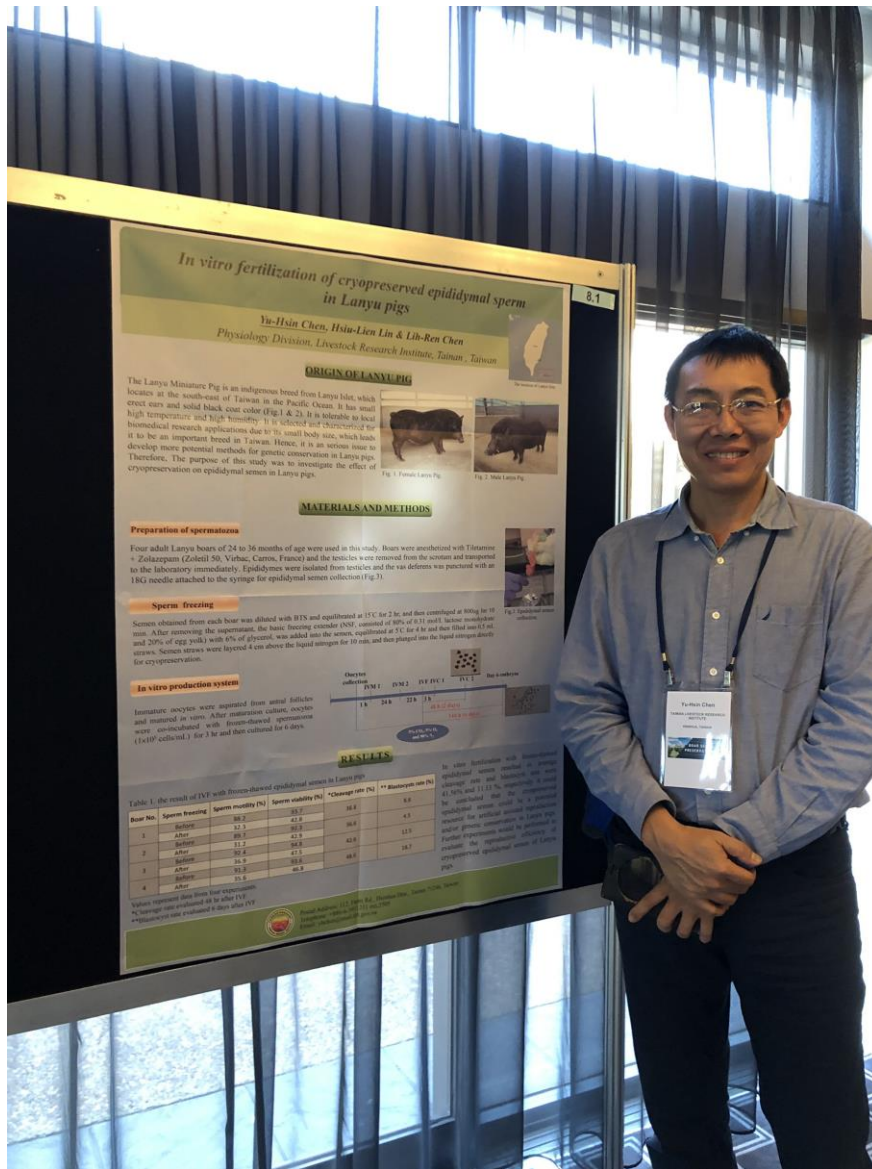


圖 7. 陳裕信助理研究員以海報發表「Successful IVF of IVM porcine oocytes with cryopreserved epididymal spermatozoa from Lanyu boars」。



圖 8. 林秀蓮助理研究員口頭報告「Application of PrestoBlue™ to evaluate boar semen quality」。



圖 9. 林秀蓮助理研究員口頭報告「Application of PrestoBlue™ to evaluate boar semen quality」。

8月18日於 International Convention Centre 參加澳大利亞生殖內分泌研討會



圖 10. 陳裕信助理研究員出席澳大利亞生殖內分泌研討會。

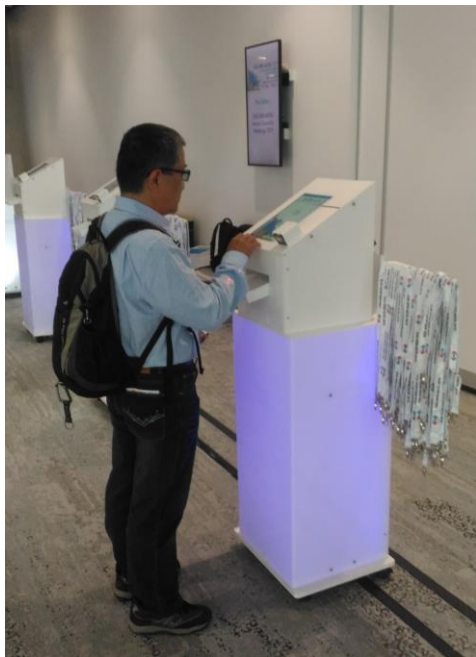


圖 11, 12. 陳立人研究員兼組長出席澳大利亞生殖內分泌研討會。

肆、心得與建議

(一) 1985 年，國際公豬精液保存會議成立於瑞典烏普薩拉並舉行第一次會議，會議由創始人 Kjell Larsson 和 Larry Johnson 共同召集，隨後在歐洲和北美交替舉行。本屆會議是 ICBSP 首次選擇於非北半球的澳大利亞雪梨舉辦。ICBSP 會議的主要目的，乃是提升國際學研和產業界對公豬精液處理和人工授精技術原理的思考、研究和應用。本次會議的重點領域則聚焦於面對氣候變遷影響豬隻生殖效能的挑戰下，對應之豬人工生殖科技研發的最新進展。其中，包括涉及應用於精液保存和豬人工生殖技術主題相關的基因體學、蛋白質體學、生物資訊學、奈米技術和基因編輯的研究進程。並且，對於公豬精子的光刺激（光對於精子泳動行為影響）、趨熱性（溫度對於精子泳動行為影響）、流體力學評估精子品質、精子性別鑑定、以流式細胞儀和 CASA 進行精子品質評估和篩檢、和精子運動學等方面研究技術創新與設備的改良，亦進行充分的討論與交流。此外，非洲豬瘟疫病的大爆發，也使得如何應用人工生殖技術以提升生物安全性和落實生產管理方面，成為此次專家會議討論的主題。

- (二) 本次赴澳參與國際公豬精液保存會議，藉由發表公豬精液保存相關研究的成果，以及全程參與各相關主體的演說與討論，獲得很豐富深廣的經驗知識及研發創新的視野，可很清楚見識到國際間在這個研究領域中，現行的研究的方法與成果、未來研發方向的規劃與國際分工。返臺後，將透過技術盤點與知識分享，規劃本所未來的研究方向。
- (三) 本次會議屬於技術專業度與知識密度極高的國際性的公豬精液保存研討會。豬在臺灣為產值非常大也非常重要的畜牧產業，且國內從事此領域的研究人員亦不在少數。但前往與會發表成果、參與討論和交流則僅有本所三位同仁，是較為可惜之處。建議未來本會能夠編列足夠之預算，持續派員參與，大會所有論壇與相關之衛星研討會，當能獲致更多之進步技術與尖端資訊，助益我國產業之發展。同時，亦能藉由與各國學者專家直接交換研究發展心得的機會，以提高我國相關研究成果的國際能見度，開擴我國在此類國際會議之參與空間，提升我國之研究水準。