ウシ凍結融解精子の受精能獲得に対する β -メルカプトエタノールの効果

郡司さとみ・浜野晴三

(社)家畜改良事業団 家畜バイテクセンター, 東京都品川区 140-0002

(2000.9.6 受付, 2001.1.22 受理)

要 約 3頭の種雄牛の凍結融解精子を用い, 受精能獲得誘起に及ぼす β -メルカプトエタノール(β -ME)の効果および受精後の胚盤胞への胚発生に及ぼす影響を検討した. 黒毛和種種雄牛 A, B および C の洗浄精子を, ヘパリン(10 μ g/ml)およびウシ血清アルブミン(3 mg/ml)を含む β -ME 無添加あるいは添加 BO 培地に懸濁して媒精を行った. その結果, 媒精後 8 時間における β -ME 無添加区の精子侵入率は, それぞれ 66, 30 および 28% であったのに対して, 10 μ M 添加区では種雄牛 A で 92%, 25 μ M 添加区では種雄牛 B および C でそれぞれ 53 および 63% と無添加区に比べて有意に高い侵入率であった($P < 0.05$). 精子侵入時期の観察では, 種雄牛 A および B の場合, 媒精後 2 時間の無添加区でそれぞれ 6.7 および 5.1% の侵入率が認められたのに対し, 添加区ではそれぞれ 26.7 および 18.5% と有意に高い割合となった($P < 0.05$). 一方, 種雄牛 C では, 媒精後 2 時間で両区間に有意差は認められなかったものの, 6 時間では無添加区の 28.6% に対し, 添加区では 49.1% と有意に高い割合となり($P < 0.05$), 種雄牛によって侵入時期が異なることが明らかにされた. 媒精後の卵子を卵丘細胞単層と共培養して胚盤胞への発生を観察した結果, 種雄牛 A では無添加区の 26.0% に対して, β -ME 10 μ M 添加区では 58.6% と有意に高い値を示した($P < 0.05$). また, 種雄牛 B では無添加区の 8.3% に対して, 25 μ M 添加区の値は 21.4% と有意に高かった($P < 0.05$) が, 種雄牛 C ではそれぞれ 10.0 および 11.8% で両区間に有意差は認められなかった.

日本畜産学会報, 72 (9) : J329-J336, 2001

哺乳動物精子の体外での受精能獲得と先体反応の誘起条件の設定は, 哺乳動物卵子の体外受精研究における重要な課題であることが提示され続けてきた. これまでウシ精子を用いた体外受精には, 射出精子の雌性生殖道内での培養¹¹⁾, 高イオン強度培地(HIS 培地)中での前処理^{3,4)}, イオノフォア A23187 による処理²⁰⁾ およびヘパリン処理^{13,19)}, あるいは精巣上体精子の合成培地内での培養^{2,14)} により可能となることが報告されている. これらの手法を用いたウシ体外受精系は, 新たな繁殖技術の一端を担う技術として確率されつつある¹²⁾ が, 複数の種雄牛の精子に対するヘパリン, あるいはカフェインおよびヘパリン併用による処理方法では, 卵子への精子侵入率が必ずしも一致していないことが報告されており^{17,18)}, 受精能獲得誘起には個体毎の差の存在を否定できていない.

一方, 低分子還元剤である β -メルカプトエタノール

(β -ME)の効果については, ウシ初期胚の培養培地に β -ME を添加することにより, 培養環境を改善し胚の発生能を向上させる試みがなされており¹⁰⁾, さらにはその作用機序の解明も報告されている^{22,23)} が, 体外受精時の添加効果についての知見は得られていない. また精子に対しては, クロマチン検査の際に処理溶液に添加することにより細胞の核膜に脆弱効果のあることが知られている¹⁵⁾.

そこで本試験では, 複数の種雄牛の精子の受精能獲得誘起に対する β -ME の効果について, 培地への至適添加濃度の検討と精子の侵入時期の観察, β -ME を添加した条件下で媒精に供した卵子の胚盤胞への発生に対する影響を検討した. 加えて, β -ME 添加による精子頭部の変化についての所見を得るため, Chlortetracycline (以下 CTC) 蛍光染色法を用いて, 凍結融解精子の受精能獲得および先体反応についての観察を行った.

連絡者: 郡司さとみ (fax : 03-3740-2719, e-mail : gunji@liaj.or.jp)

材料および方法

ウシ卵子の体外成熟、体外受精ならびに発生培養は Hamano と Kuwayama⁹⁾ の方法に準じた。

卵子の採取と成熟培養：食肉市場で採取した黒毛和種牛の卵巣は、37℃ に加温した生理食塩水中に浸漬した状態で1時間以内に実験室に持ち帰った。ウシ未成熟卵子は、卵巣表層の直径2～5 mm の卵胞から注射器を用いて吸引採取した後、卵丘細胞が5～6層付着した卵子を選別して成熟培養に供した。成熟培地には、5% 非働化牛胎子血清 (Filtron, PTY, Ltd., Victoria, Australia) を添加した TCM-199 (Earle's salts with 25 mM HEPES, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) に抗生物質を添加して用いた。培養は、ミネラルオイル (Squibb, 和光純薬, 大阪) 下の 1 ml 液滴中に 100 個の卵子を導入して 21 時間行った。

すべての培養は、2% CO₂, 98% 空気, 38.5℃ の条件下で行った。

精子処理：(社)家畜改良事業団で繋養している3頭の黒毛和種雄牛 (以下種雄牛 A, B および C) の人工授精用凍結精液を融解して用いた。37℃ の微温湯中で融解後、試験管内にストローの内容を移し、グルコース欠 10 μg/ml ヘパリン (ノボヘパリン, 日本ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社, 東京) および 3 mg/ml 牛血清アルブミン (BSA, Fraction V, 和光純薬, 大阪) 添加 BO 培地を加え、800×g, 5 分間の遠沈を2回繰り返して洗浄を行った。

β -ME 添加培地は、グルコース欠ヘパリンおよび BSA 添加 BO 培地に 1 mM になるよう添加して窒素ガスを充填した後 4℃ 下で保存したストック液を用いて、使用直前に、 β -ME 濃度を 10, 25 および 50 μM となるよう調整した。また、無添加区を対照とした。これらの培地に対し、洗浄精子を最終濃度が 1×10^7 /ml となるように加えて、媒精用の精子浮遊液とした。

媒精：成熟培養を終えた卵子を成熟培地中でピペティングして、卵丘細胞の一部を除去した後、卵子を調整を終えた精子浮遊液の液滴中に直ちに導入して媒精を行った。体外受精後の卵子は卵丘細胞層と共培養を行うために、卵丘細胞を懸濁した成熟培地で培養を継続した。すなわち、媒精後5時間で精子浮遊液から卵子を取り出し洗浄を行った後、卵丘細胞との共培養を開始した。

β -ME 添加効果の検討：媒精後8時間で卵子のホールマウント標本を作製し、25% 酢酸アルコールで固定、1% 酢酸オルセインで染色してノマルスキー微分干渉顕微鏡または位相差顕微鏡により精子侵入の有無を観察した。

精子の侵入は、尾部を伴った膨大精子頭部の存在あるいは雄性前核の有無により判定した。

精子侵入時期の観察： β -ME 無添加および β -ME を 10 または 25 μM 添加した条件で媒精を行った後、2, 4, 6 および 8 時間で卵子のホールマウント標本を作製し、固定染色後に鏡検し、精子の侵入状況を観察した。

胚発生の観察：媒精後の卵子を、卵丘細胞単層と共培養し、媒精後 48 時間での分割状況を検査した後、4 細胞期以上に発生した胚の培養を継続し、媒精日を Day 0 として Day 6～8 までに発生した胚盤胞を観察した。

精子先体の観察：洗浄精子を 10 μM β -ME 添加または無添加の BO 培地で 0～5 時間培養した後、CTC 蛍光染色⁸⁾に供した。すなわち、精子濃度を 1×10^7 /ml に調整した懸濁液 400 μl に Hoechst bis-benzamide (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) を最終濃度が 1.0 μg/ml となるように混合して室温下で3分間保持した後、PVP (PVP-40, Sigma) を 3% 濃度に溶解した PBS 4 ml を静かに加えて 800×g, 5 分間の遠心分離を行った後、上澄を除去して 50 μl の BO 培地に再懸濁した。次いで、20 mM Tris+130 mM NaCl 溶液に 750 μM MCTC (Sigma) と 5 mM システイン (Sigma) を溶解した CTC 溶液 45 μl と同量の精子懸濁液とを混合した。さらに 0.5 M Tris 溶液に 12.5% のパラフォルムアルデヒドを添加した溶液 8 μl を加え、検査試料とした。無蛍光スライドガラス上に滴下した検査試料と等量の抗退色封入液 (グリセロールと PBS を 9:1 で混合した溶液に、0.22 M 1-4-Di-azabicyclo [2.2.2] octane (Sigma) を融解) を混合した後、カバーガラスで封入して蛍光顕微鏡下で鏡検した。

観察にはニコン社のフィルター、UV-2A (330–380 nm, 420 nm) および BV-2A (400–440 nm, 470 nm) を用いた。

蛍光染色の判定は、精子頭部が青く光らない場合を生精精子と判定した。また、精子頭部全体が黄色く発光している精子を受精能獲得および先体反応が共に誘起されていないもの、頭部の前半が黄色く発光している精子を受精能獲得は誘起されているが先体反応は誘起されていないもの、頭部全体が発光していない精子を受精能獲得および先体反応が共に誘起されているものと判定した。

統計処理：得られた結果は、 χ^2 検定により有意差検定を行った。

結 果

精子侵入率の観察

媒精後8時間で卵子のホールマウント標本を作製して、精子侵入率ならびに単精子受精率を観察した結果を表1に示した。

Table 1. Effect of β -mercaptoethanol (β -ME) on *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro*

Bull	Concentration of β -ME (μ M)	No. of oocytes examined ¹⁾	No. (%) of oocytes penetrated			No. (%) of Monospermic oocytes
			Total	With enlarged sperm head	With male pronucleus	
A	0	67	44(66) ^a	39(58)	5(7)	43(98) ^a
	10	52	48(92) ^b	39(75)	9(17)	46(96) ^a
	25	31	28(90) ^b	22(71)	6(19)	25(89) ^a
	50	49	43(88) ^b	35(71)	8(16)	39(91) ^a
B	0	30	9(30) ^a	7(23)	2(7)	9(100) ^a
	10	32	15(47) ^{ac}	11(34)	4(13)	13(87) ^a
	25	34	18(53) ^{bc}	12(35)	6(18)	17(94) ^a
	50	37	15(41) ^{ac}	10(27)	5(14)	13(87) ^a
C	0	69	19(28) ^a	14(20)	5(7)	19(100) ^a
	10	69	34(49) ^b	26(38)	8(12)	31(91) ^a
	25	72	45(63) ^b	35(49)	10(14)	44(98) ^a
	50	58	28(48) ^b	20(34)	8(14)	26(93) ^a

¹⁾ Oocytes were examined 8h after insemination.Values with different superscripts in the same column differ significantly at $P < 0.05$.

種雄牛 A では、 β -ME 無添加区の精子侵入率 66% に対し、 β -ME 10, 25 および 50 μ M 添加区では、それぞれ 92, 90 および 88% とすべての添加区で有意に高い侵入率が観察された ($P < 0.05$)。単精子侵入率は、すべての区で 89~98% と高い割合が観察され、 β -ME 添加の有無および添加濃度による差は認められなかった。

種雄牛 B では、無添加区の精子侵入率 30% に対して、 β -ME 10, 25 および 50 μ M 添加区ではそれぞれ 47, 53 および 41% であり、とくに 25 μ M 添加区が無添加区に対して有意に高い侵入率を示した ($P < 0.05$)。単精子侵入率は、全区間に差は認められなかった。

種雄牛 C でも無添加区の精子侵入率 28% に対し、 β -ME 10, 25 および 50 μ M 添加区でそれぞれ 49, 63 および 48% とすべての添加区で有意に高い侵入率が観察された ($P < 0.05$)。単精子侵入率は、すべての濃度区で 91~100% と高い割合が観察され、試験区間に差は認められなかった。

精子活力および生存性の観察

媒精直後、種雄牛 A, B および C におけるすべての濃度区での精子活力ならびに生存率は、++60~70 であった。媒精後 3 時間では、無添加区と 10, 25 および 50 μ M 濃度区のすべてで +30~40 と活力、生存率共に低下し、媒精後 5 時間ではすべての区で +10~20 となった。この結果、 β -ME 添加による精子の生存性および活力の維持

効果は認められなかった。

精子侵入時期の観察

種雄牛 A は 10 μ M, 種雄牛 B および C は 25 μ M 濃度の β -ME を添加した培地でそれぞれ媒精を行い、媒精後 2 時間毎に 8 時間まで経時的に卵子のホールマウント標本を作製して精子の侵入時期を観察した結果を図 1 に示した。

種雄牛 A の対照区では、媒精後 2 時間で 6.7% の精子侵入率が観察され、その後 4, 6 および 8 時間ではそれぞれ 23.8, 47.6 および 53.3% と時間の経過にともない精子侵入率は増加した。 β -ME 添加区では、媒精後 2 時間で 26.7% の精子侵入率が観察された。その後 4, 6 および 8 時間ではそれぞれ 75.0, 75.0 および 84.5% となり、それぞれ対照区の同時間に比べ有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。

種雄牛 B の対照区では、媒精後 2 時間で 5.1% の精子侵入率が観察され、その後 4, 6 および 8 時間ではそれぞれ 14.8, 21.8 および 31.0% と時間経過にともない精子侵入率は増加した。 β -ME 添加区では、媒精後 2 時間で 18.5% の精子侵入率が観察され、その後 4, 6 および 8 時間ではそれぞれ 2.8, 43.6 および 53.6% と増加した。すなわち種雄牛 A とは異なり時間の経過に伴う急激な精子侵入率の増加は観察されなかったが、すべての時間区で対照区に比べ有意に高い精子侵入率が観察された。

Fig. 1. *In Vitro* fertilization of bovine oocytes examined at various time after insemination with spermatozoa in a medium with or without β -mercaptoethanol (β -ME).

*: Values with asterisk in experimental groups significantly differ from those in control groups at each period ($P < 0.05$).

($P < 0.05$).

種雄牛Cの対照区では、媒精後2時間で11.6%の精子侵入率が認められ、4、6および8時間ではそれぞれ17.8、28.6および25.6%と時間の経過に伴い侵入率は緩

慢に増加した。β-ME添加区では、媒精後2時間において10.5%の精子侵入率が観察され、その後4、6および8時間ではそれぞれ31.7、49.1および51.7%と緩慢な増加となった。この結果、対照区との比較では媒精後6およ

Table 2. Development of bovine oocytes inseminated *in vitro* in a medium which include β-mercaptoethanol (β-ME) after *in vitro* maturation

Bull	β-ME concentration (μM)	No. of oocytes cultured	No. and % of oocytes cleaved ¹⁾	No. and % of oocytes developed to blastocyst ²⁾
A	0	662	406(65.3) ^a	162(26.0) ^a
	10	319	275(86.2) ^b	187(58.6) ^b
B	0	216	53(24.5) ^a	18(8.3) ^a
	25	224	97(43.3) ^b	48(21.4) ^b
C	0	239	64(26.8) ^a	24(10.0) ^a
	25	212	64(30.2) ^a	25(11.8) ^a

¹⁾ Oocytes were examined 48 h after insemination.

²⁾ Day 7-8 (Day 0=day of insemination).

Values with different superscripts in the same column differ significantly at $P<0.05$.

Table 3. Fluorescence patterns of frozen-thawed bovine spermatozoa¹⁾ incubated in a medium with 10 μM β-mercaptoethanol (β-ME) and stained with chlortetracycline

Bull	β-ME treatment	Culture periods (h)	Sperm viability (%)	Pattern in sperm head ²⁾	
				CP	AR
C	—	0	93.3	52.5	5.3
		1	71.9	43.8	6.3
		3	53.8	54.0	25.0
		5	21.5	7.5	91.5
	+	1	79.2	63.3	7.3
		3	61.7	59.0	28.9
		5	33.2	4.0	95.5

¹⁾ Only Bull C spermatozoa were examined.

²⁾ CP : capacitated spermatozoa.

AR : acrosome reacted spermatozoa.

び8時間で、有意に高い精子侵入率が観察された ($P<0.05$).

媒精後の胚の培養

種雄牛 A は 10 μM, 種雄牛 B および C は 25 μM 濃度の β-ME を添加した培地で媒精を行い、媒精後 5 時間で卵丘細胞を残した成熟培地へ卵子を移し、卵丘細胞との共培養を行った結果を表 2 に示した.

種雄牛 A の媒精後 48 時間の分割率は、対照区の 65.3% に対し、添加区では 86.2% と有意に高い割合であった ($P<0.05$). 培養卵子数に対する胚盤胞の割合は、

対照区の 26.0% に対し添加区は 58.6% と有意に高い値であった ($P<0.05$).

種雄牛 B も同様に、媒精後 48 時間の分割率は対照区 24.5% に対し、添加区は 43.3% で、有意に高かった ($P<0.05$). Day 6~8 までに発生した胚盤胞の割合は、対照区の 8.3% に対し添加区は 21.4% と、有意に高かった ($P<0.05$).

一方、種雄牛 C の媒精後 48 時間の分割率は対照区の 26.8% に対し、添加区は 30.2% で、両区間に有意な差は認められなかった. Day 6~8 までに発生した胚盤胞へ

の発生率は、対照区の 10.0% に対して添加区では 11.8% で、両区間に有意な差は認められなかった。

CTC 染色法による精子先体の観察

受精能獲得ならびに先体反応の観察結果を表 3 に示した。

培養開始直後の精子の生存性は 93.3% であったが、培養開始後 3 および 5 時間では β -ME 無添加区でそれぞれ 53.8 および 21.5%、添加区でそれぞれ 61.7 および 33.2% と、いずれも培養時間の経過にともない低下した。

培養開始直後における生存精子に占める受精能獲得が誘起されている精子は 52.5%、先体反応が誘起されている精子は 5.3% であった。無添加区および添加区において、培養開始後 3 時間で先体反応が誘起された割合はそれぞれ 25.0 および 28.9%、5 時間ではそれぞれ 91.5 および 95.5% であった。

考 察

本試験において、3 頭の種雄牛の凍結融解精子を種々の濃度の β -ME を添加した培地中で媒精をした結果、 β -ME 10 または 25 μ M 濃度区において対照区より有意に高い割合で精子侵入が観察されたことから、 β -ME の受精培地への添加はウシ卵子への精子侵入率を促進させることが示された。

体外受精に用いる種雄牛の精子の場合は、雌生殖道内とは異なる環境の合成培地内で膜変化を誘起させ、かつ一定時間の生存性を維持させなければならないことが必須条件である。液状精液の保存という観点からウシ精子の体外での生存性延長にキサンチン誘導体添加の効果が報告¹⁶⁾されている。一方、精子の受精能獲得に対してはイオノフォア A23187 単体の使用で受精能獲得が高率に誘起される反面、生存性が著しく損なわれるとの理由から、キサンチン誘導体の一つであるカフェインが併用されている²⁰⁾。また、ヘパリンを添加することによる受精能獲得誘起方法においても、カフェインの添加¹⁷⁾やテオフィリンの添加の有効性²¹⁾が報告されている。本試験では β -ME の精子への生存性へおよぼす効果を観察する目的でこれらキサンチン誘導体を含まない培地を使用した。が、 β -ME の添加が精子の生存性および運動性に与える影響はとくに観察されなかった。しかし受精率を有意に改善することから、運動性維持に効果の認められるキサンチン誘導体との併用により、さらに受精率が改善されるかも知れない。

本試験において、 β -ME の受精培地への添加は体外成熟ウシ卵子への精子侵入に対して有効であった。チオー

ル化合物を添加した成熟培養液で成熟すると、グルタチオンレベルが有意に上昇し^{1,5-7)}、発生率が改善される^{1,7)}。しかし、受精率には影響は認められていない⁵⁾。したがって本試験における受精率の上昇は、受精の場に添加した β -ME が精子に影響していることによる可能性が考えられるが、精子の受精能獲得ならびにアクロゾーム反応に β -ME は影響しなかったので、本試験では明らかに出来なかった。

種雄牛 A および B では、媒精後 2 時間から対照区に比べ β -ME 添加区で有意に高い精子侵入率が観察され、種雄牛 C では媒精後 6 時間以降に対照区と添加区間に有意な差が認められた。また 3 頭の種雄牛において、精子侵入率の時間的な上昇パターンは異なっていたが、媒精後 6 時間以降にはいずれの個体においても β -ME 添加区において有意に高い精子侵入率が得られた。さらに、 β -ME 濃度に対する依存性が認められたが、種雄牛 A は 10 μ M 添加区、B および C は 25 μ M 添加区でもっとも高い精子侵入率が観察され、いずれの種雄牛も 50 μ M 添加区では 25 μ M 添加区に比べて精子侵入率が有意に低くなった ($P < 0.05$)。Ohgoda ら¹⁸⁾は複数の種雄牛の凍結融解精子を用い体外受精したところ精子侵入率に有意に差があったことを、Niwa と Ohgoda¹⁷⁾は、受精培地にヘパリン単体よりもカフェインとヘパリンを添加した場合に精子侵入率が有意に高くなるが、種雄牛による侵入率の差は改善されなかったことを報告しており、本試験でも同様の結果が得られた。一方、Hillery ら¹¹⁾は、体内での受精率の異なる 2 つの牛群から得た精液を用い、ヘパリン含有タイロド液を用いて体外受精を行った結果、ヘパリンへの濃度依存はあるものの体外での卵母細胞への精子侵入能力とその後の体外での胚発生能力は、体内での受胎性と相関関係のあることを示しており、本試験の結果はこれら^{11, 17, 18)}の報告を支持すると考えられる。

謝 辞

本稿の御校閲を賜った社団法人家畜改良事業団家畜改良技術研究所正木淳二所長に深謝いたします。

文 献

- 1) Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN. Presence of β -mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 50 : 747-756. 1998.
- 2) Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD, First NL. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *Biology of Reproduction*, 28 :

- 717-725. 1983.
- 3) Brackett BG, Oh YK, Evans JF, Donawick WJ. Fertilization and early development of cow ova. *Biology of Reproduction*, 23 : 189-205. 1980.
- 4) Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following *in-vitro* fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*, 27 : 147-158. 1982.
- 5) de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Baldassarre H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, 42 : 432-436. 1995.
- 6) de Matos DG, Furnus CC, Moses DF. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes : role of cumulus cells. *Biology of Reproduction*, 57 : 1420-1425. 1997.
- 7) de Matos DG, Furnus CC. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*, 53 : 761-771. 2000.
- 8) Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K. Ca^{2+} -regulating mechanisms that modulate bull spermatozoa capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Molecular Reproduction and Development*, 40 : 233-241, 1995.
- 9) Hamano S, Kuwayama M. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors : a comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*, 39 : 703-712. 1993.
- 10) Hamano S, Kuwayama M, Takahashi M, Okamura N, Okano A, Nagai T. Effect of β-mercaptoethanol on the preimplantation development of bovine embryos fertilized *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 40 : 355-359. 1994.
- 11) Hillery FL, Parrish JJ, First NL. Bull specific effect on fertilization and embryo development *in vitro*. *Theriogenology*, 33 : 249. 1990.
- 12) 鬼頭武資・浜野晴三. 牛体外受精卵の利用と現状. 北里獣医畜産学会誌. 4 : 1-14. 1997.
- 13) Leclerc P, Sirard MA, Chafoulas JG, Lambert RD. Decrease in calmodulin concentrations during heparin-induced capacitation in bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 94 : 23-32. 1992.
- 14) Lenz RW, Ball GD, Lohse JK, First NL, Ax RL. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and *in vitro* fertilization. *Biology of Reproduction*, 28 : 683-690. 1983.
- 15) Mannt T, Lutwak Mann C. Male Reproductive Function and Semen. 147-148, 238-239. Springer-Verlag. New York. 1981.
- 16) 宮本 元・西川義正. 牛精子の生存性におよぼすカフェインの影響. 日本畜産学会会報, 50 : 601-608. 1979.
- 17) Niwa K, Ohgoda O. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in-vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*, 30 : 733-741. 1988.
- 18) Ohgoda O, Niwa K, Yuhara M, Takahashi S, Kanoya K. Variations in penetration rates *in vitro* of bovine follicular artificial insemination using frozen semen from different bulls. *Theriogenology*, 29 : 1375-1381. 1988.
- 19) Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. *Theriogenology*, 24 : 37-549, 1985.
- 20) 高橋芳幸・花田 章. イオノホア A23187 で処理したウシ射出精子の体外における透明帯除去ハムスター卵への侵入. 家畜繁殖学雑誌, 30 : 30-39. 1984.
- 21) Takahashi Y, First NL. *In vitro* fertilization of bovine oocytes in the presence of theophylline. *Animal Reproduction Science*, 34 : 1-18, 1993.
- 22) Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N, Okano A. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biology of Reproduction*, 49 : 228-232. 1993.
- 23) Takahashi M, Nagai T, Okano A. Effect of β-mercaptoethanol on DNA synthesis in bovine embryos, *Animal Science Technology*, 67 : 740-741. 1996.

Effect of β -mercaptoethanol Treatment on Capacitation of Frozen-Thawed Bull Spermatozoa

Satomi GUNJI and Seizo HAMANO

Animal Bio-Technology Center, Livestock Improvement Association of Japan, Inc.
Shinagawa-ku, Tokyo 140-0002, Japan

Correspondings : Satomi GUNJI (fax : +81 (0) 3-3740-2719, e-mail : gunji@liaj.or.jp)

The effect of β -mercaptoethanol (β -ME) on the capacitation and penetration into *in vitro* matured oocytes in frozen-thawed spermatozoa from three Japanese Black bulls, and on the following development to the blastocyst stage was studied. Brackett and Oliphant medium with 10 μ g/ml heparin and 3 mg/ml bovine serum albumin was employed as a medium for *in vitro* capacitation and fertilization. After washing, spermatozoa were suspended in BO including 0, 10, 25 and 50 μ M β -ME, and then were cultured with *in vitro* matured oocytes. The rate of oocytes with enlarged sperm head or male and female pronuclei in the groups with β -ME 8 hours after insemination were 66, 30 and 28% in Bull A, B and C, respectively. These values were significantly higher than these in groups without β -ME ($P < 0.05$). The time-related increase of the rate of sperm penetration was quite different in each bull. The development rate of oocytes that were inseminated in a medium with β -ME in Bull A (10 μ M β -ME = 58.6 vs 0 μ M β -ME = 26.0%) and Bull B (25 μ M β -ME = 21.4 vs 0 μ M β -ME 8.3%) 6 to 8 days after co-incubation with a single layer of cumulus cells was significantly different, while there was no significant difference in Bull C (25 μ M β -ME = 11.8 vs 0 μ M β -ME = 10.0%) at the $P < 0.05$ level.

Animal Science Journal 72 (9) : J329-J336, 2001

Key words : Spermatozoa, Capacitation, β -mercaptoethanol, *In vitro* fertilization, Bovine