

〔カテキンの精子活性化作用を利用した家畜繁殖率の向上（共同研究）〕

## EGC g を添加した受精培地における受精能力の維持効果について

西木秀人・浜野晴三\*

(生産技術科) \* (社) 家畜改良事業団家畜バイテクセンター

【要 約】カテキン類はその抗酸化作用により精子の運動性を維持するが、体外受精培地に一定濃度（0.05～0.1mM）添加した EGC g には、精子の受精能を維持する効果があることが認められた。

### 【目 的】

抗酸化作用が注目されているカテキン類を利用し、体外・体内受精における精子を酸化から保護し、活性化することにより繁殖率の向上を試みる。カテキン類の中でも抗酸化力の強いエピガロカテキンガレート（EGCg）を添加した培地で一定時間保存した精子を体外受精に供し、受精能力の維持効果を確認する。

### 【方 法】

融解した凍結精液を Brackett&Oliphant (BO) 液で遠心洗浄後、20mg/ml BSA と EGC g を添加した BO 液で等倍希釈し、最終精子濃度が  $1 \times 10^7$ /ml となるよう精子懸濁液を調製した。媒精は精子懸濁液に体外成熟卵子を導入して 5 時間行い、媒精終了後 8～9 時間で培養卵子の一部を用いて標本を作成し、精子の侵入状況を観察した。残りの卵子は、5%子牛血清加 TCM-199 中で培養し、48 時間後の分割状況を観察した。EGC g の濃度は、0, 0.05, 0.1 および 0.2mM とし、試験区は精子懸濁液の調製を媒精の 6 時間前に行い、媒精まで 38.5℃、2%CO<sub>2</sub> 下で保存した。対照区は 0 時間保存（通常の方法）として成績を比較した。

### 【成果の概要】

- 1) 対照区では、EGC g の添加濃度による精子侵入卵子数、多精子侵入卵子数、正常受精卵子数に有意な差は認められなかった。一方、媒精の 6 時間前に懸濁液を調製した試験区においては、精子侵入卵子数、正常受精卵子数に有意な差が見られ、正常受精卵子数では、0.1mM 区が 0.05mM 区を除く他の区よりも高く、0.2mM 区が無添加区（0mM 区）を含む他の区よりも有意に低かった（表 1）。
- 2) 胚の発生において対照区では、0.05mM 区で高い傾向が見られたが、有意な差はなかった。試験区のなかでは、0.1mM 区が無添加区（0mM 区）ならびに 0.2mM 区よりも有意に高く、0.2mM 区は無添加区（0mM 区）を除く他の区よりも有意に低かった（表 2）。
- 3) EGC g の各添加濃度ごとに正常受精率ならびに分割率への影響を見ると 6 時間前に懸濁液を調製した試験区は、正常受精率、分割率ともに対照区よりも低かったが、正常受精率では 0.1mM 区、分割率では 0.05mM 区ならびに 0.1mM 区においては統計的に有意な差は認められなかった（図 1, 2）。
- 4) まとめ：以上のことから体外受精培地に一定濃度添加した EGC g には、精子の受精能を維持する効果があることが認められた。このことは、人工授精を用いた体内受精において、精子の受精能力保持時間を延長させるためにカテキン類が利用できる可能性が示唆された。

表1 体外受精培地に添加した EGCg が受精におよぼす影響

	EGC g 濃度 (mM)	供試卵数	精子侵入卵子数	多精子侵入卵子数	正常受精卵子 <sup>1)</sup> 数
			(%)	(%)	(%)
対照区	0	83	58 (69.9)	3 (5.2)	55 (66.3)
	0.05	27	22 (81.5)	3 (13.6)	19 (70.4)
	0.1	63	49 (77.8)	7 (14.3)	42 (66.7)
	0.2	68	45 (66.2)	4 (8.9)	41 (60.3)
試験区	0	83	21 (25.3 <sup>a</sup> )	0 (0.0)	21 (25.3 <sup>a</sup> )
	0.05	34	16 (47.1 <sup>b</sup> )	2 (12.5)	14 (41.2 <sup>ab</sup> )
	0.1	72	40 (55.6 <sup>b</sup> )	2 (5.0)	38 (52.8 <sup>b</sup> )
	0.2	68	7 (10.3 <sup>c</sup> )	0 (0.0)	7 (10.3 <sup>c</sup> )

1) (精子侵入卵子数 - 多精子侵入卵子数)  
同区・同列異符号間に有意差あり (p<0.05)

表2 体外受精培地に添加した EGCg が胚の発生に及ぼす影響

	EGC g 濃度 (mM)	供試卵数	分割卵子 <sup>1)</sup> 数 (%)
対照区	0	108	39 (36.1)
	0.05	58	28 (48.3)
	0.1	84	36 (42.9)
	0.2	91	40 (44.0)
試験区	0	110	21 (19.1 <sup>ad</sup> )
	0.05	56	17 (30.4 <sup>bd</sup> )
	0.1	81	27 (33.3 <sup>bc</sup> )
	0.2	90	5 (5.6 <sup>a</sup> )

1) 媒精後 48 時間に観察した 5 細胞期以上の胚数  
同区・同列異符号間に有意差あり (P<0.05)

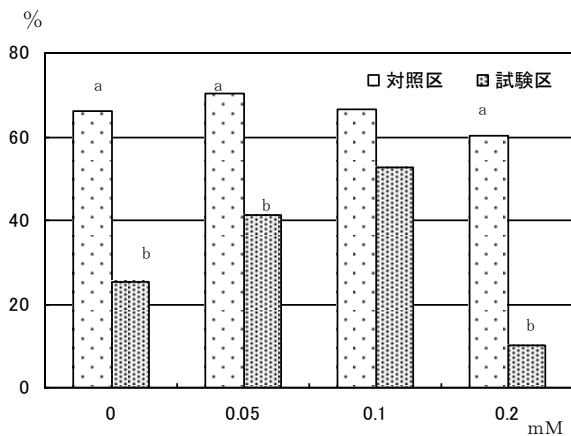


図1 添加濃度ごとの正常受精率  
同濃度異符号間に有意差あり (P<0.05)

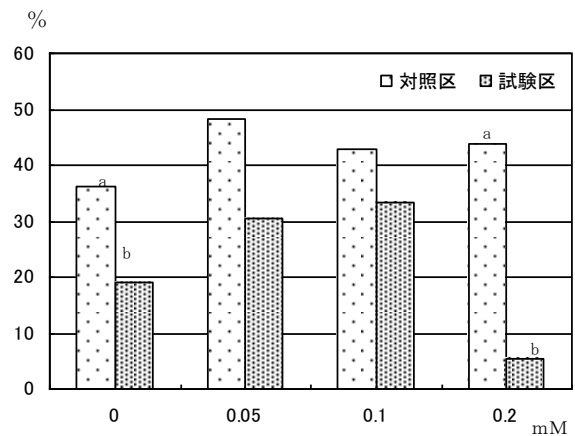


図2 添加濃度ごとの分割率  
同濃度異符号間に有意差あり (P<0.05)