

博士論文

ブタ精子および精漿の機能解析，それを基とした
凍結精液による人工授精法の開発に関する研究

平成 22 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

岡崎 哲司

目次

第一章	緒論	4
第二章	至適浸透圧と glycerol 濃度の検討によるブタ精子新規凍結希釈液の開発	
	序論	9
	材料および方法	12
	結果	17
	考察	19
	要約	21
	図および表	23
第三章	耐凍能を負に制御する因子の同定と、その作用機序の解明	
	序論	30
第一節	Toll-like receptor を介した精子の初期免疫応答の解析	
	序論	32
	材料および方法	34
	結果	40
	考察	42
	図および表	44
第二節	凍結前処理液および凍結希釈液への LPS 阻害剤 PolymyxinB 添加が融解後精子機能性に及ぼす影響	
	序論	53
	材料および方法	54
	結果	56
	考察	58
	図および表	60
	総合考察	70
	要約	72

第四章 耐凍能の低い個体の精子を凍結可能にする新規凍結融解処理法の開発

序論	74
材料および方法	76
結果	78
考察	80
要約	82
図および表	84

第五章 動物由来物質を含有しない完全合成融解液の開発

序論	92
材料および方法	94
結果	98
考察	100
要約	102
図および表	103

第六章 総合論議 115

第七章 総括	119
図	123
謝辞	124
引用文献	125

第一章：緒論

1.ブタにおける繁殖技術の歴史と現状

1.1 ブタにおける液状精液による人工授精

ブタの発情周期はおよそ 21 日であり、雄を許容する発情持続期間は、2～3 日のものが多く平均 2.4 日間続く。このため、排卵期間も長く、数時間かけておよそ 10～20 個の卵子・卵丘細胞複合体が排卵される。排卵時期は発情期間を前期、中期、後期に分類した場合、後期に多いことが知られている（丹羽ら、1994）。このように、ブタにおいては、雄を許容する時間が長いため、雌 1 回の発情につき自然交配を 3 回行うことにより、排卵された卵子を全て受精するようにして、一腹産子数（一度の出産で誕生する産子数）の増大を図っている。しかし、自然交配では、作業者は体重が 300 kg 以上の雄を扱う必要から、種付け時に危険が生じること、夏から秋にかけて精子活力の減退による不受胎が増加し、生産性が低下することなど、問題点が多い。したがって、雄からあらかじめ精液を採取し、人工的に雌に注入する人工授精法（artificial insemination; AI）が望まれてきた。

ブタの人工授精は 1930 年頃、ロシアにおいて研究が開始され、その後、アメリカ、イギリス、オランダ、スウェーデン、ベルギーなど現在の養豚先進国へと進展した。我が国においては、1938 年に農林水産省畜産試験場が研究に着手し、独自の精液採取用人工膺（畜試式）や精液注入器（畜試式原型）が開発され、第二次大戦後、これらの国産技術とアメリカなどからの技術導入により人工授精が行われるようになった。

このブタにおける人工授精は、液状精液を用いたものであり、その手順は以下のものである（正木、2000）。

①精液採取

雄ブタを擬牝台に乗せ、手圧法にて精液を回収する。射出精液は約 90%の精子が最初の 50～100 ml に含まれ（濃厚部）、それ以降は、精漿とわずかな精子が含有する精漿部である。カウパー腺から分泌されるゼリー状の膠様物（エルゴチオネイン）をガーゼで濾過し、およそ 200 ml 程度精液を採取する。

②精液検査

採取後の精液検査では、量、精子濃度、精子活力、色・におい、浸透圧、pH 及び精子の奇形率をチェックする。一般的にブタの精液量は 200 ml 以上、精子濃度は 2 億匹/ml、精子活力はその運動方法によって、・（運動しないもの）、+/-（運動が最微弱で振り子運動をするもの）、+（微弱な運動をするもの）、++（活発な前進運動をするもの）、+++（運動が激烈で最活発な前進運動をするもの）に分類され、70+++以上（70%の精子が運動していて、その運動力が激烈なことを表す）あること、しばしば包皮内にある尿が混入することがあるため、色は乳白色であり、無臭であること、精液の浸透圧がおよそ 300 mOsm/kg、pH は 6.6～7.4、精子奇形率（原形質滴が中片部または頸部に付着しているもの、尾部が湾曲しているものなど）が 10%以下であることが人工授精に用いられる指標となり、これらから大幅にはずれる項目があれば使用あるいは配布されな

い。

③精液の希釈と保管

glucose, sodium citrate-2H₂O, NaHCO₃, EDTA-2Na, potassium chloride, Tris および penicillin G や amikamycine などの抗生物質で構成される希釈液 (Estienne et al., 2007) と精液を混合し、希釈後の精子数を 1×10^8 sperm/ml とする。この希釈後の精液を 50 ml に分注し、15°C の保管庫内で保存する。精子の運動率および受精能が低下することなく 7 日間までは、使用可能である。

④液状精液の人工授精

雄を飼養するスペースへ雌を搬入し、乗駕を許容することを確認後、カテーテルと呼ばれる注入器を用いて人工授精を行う。滅菌したカテーテルを尿道に入らないように注意しながら、頸管に挿入・固定し、保存しておいた希釈精液約 50 ml (総精子数 50 億匹) を徐々に、数分かけて注入する。雌 1 回の発情あたり 3 回の人工授精を行い、十分な産子数が得られる。近年、外筒のカテーテルを子宮頸管に挿入し、内筒の細いカテーテルを外筒の中に通して、子宮体あるいは子宮・卵管接合部に注入する子宮深部用カテーテルが開発された。これを用いた人工授精では、精液が雌の陰部から外部へ全く流出しないため、注入精子数を 1×10^9 sperm/ml に減少させても、産子が得られると報告された (Vazquez et al., 2005; Rozeboom et al., 2004)。

我が国では、国や各都道府県の公的機関、民間の種畜場が雄を飼養し、液状精液を作製し、生産者へ配布するシステムが確立している。輸送は精液ボトルを発泡スチロールに入れ、温度変化を最小限に抑えた条件で、輸送する。生産者は液状精液保管用のインキュベーター内で保管し、雌の発情を確認後人工授精行うことで種付けに対する業務を簡便化している。

1.2 液状精液による人工授精の利点と問題点

生産者は液状精液による人工授精を用いると次のような利点が見られる。

- ① 人工授精に用いられる精子は、その性状、活力など受精能力を事前に確認しているため、その受胎率または産子数など繁殖成績が自然交配と比較して向上する。
- ② 生産者が飼養する雄ブタの頭数を大幅に削減可能となり、その飼養コストや労働力が低減される。
- ③ 精液の状態での輸送することは生体の移動と比較して、輸送に伴う業務やコストが軽減されるだけでなく、生体導入による伝染性疾患の感染がない。
- ④ 細菌性あるいはウイルス性伝染性疾患は自然交配によって伝播し、繁殖障害を招くが、人工授精では雄の生殖器が雌畜に触れることがないため、精液中に感染していない限り、疾病の蔓延につながらず衛生的な種付けが行える。

さらには、液状精液による人工授精の確立は、国や各都道府県の公的機関、民間の種畜場などが行う育種改良にも大きく貢献している。自然交配では、1 回の射精で 1 頭の雌にしか受精させられないが、人工授精では優良形質を備えた雄個体の精液を最大限に活用できる。すなわち、1 射精あたりの受精可能頭数は約 40 頭へと増大することができるため、優れた雄の遺伝形質を多数の雌畜に導入でき、改良の速度を上げることが可能となる。また、優秀な種雄豚を造成するため、

多数の雌に同一個体由来の精液を人工授精し、生産された個体の形質を調査することで、成績の優秀な種雄を選抜する後代・兄弟検定の効率が向上するという利点もある。我が国における系統造成豚の造成にも、優良な遺伝形質を有し、血縁・近交係数を高め、その能力を均一化させるためにも広く利用されている。液状精液による人工授精は、この各機関が造成した系統造成豚を迅速に生産者へと普及させることを可能とするため、生産者の母豚の能力向上が図られ、間接的にも養豚業の生産性に貢献している。このように、ブタ液状精液の人工授精の確立により、理論上では上記のように、養豚業の生産性は自然交配主体の時代と比較して増大させることとなった(正木, 2000)。

しかし、液状精液は以下の問題点があるため、十分には普及していないのが現状である。その理由として、

- I. 精液の利用期間が7日間以下と短い。
- II. 15℃の温度で一定に保つ必要があり、夏や冬では輸送中に温度が上下し、精子の機能が低下する。
- III. 宅配による輸送のため、急な発情に間に合わず、受精適期を逃す。その結果、産子数にばらつきが生じる。

ことが挙げられることから、我が国における液状精液の人工授精普及率は40% (養豚基礎調査全国集計結果, 2008) で停滞しており、未だ自然交配が半数以上で行われている。

1.3 ブタ精液の凍結保存の意義と歴史

精子を液体窒素により-196℃で凍結保存することが可能となれば、精子の利用期間は半永久的となり、輸送も液体窒素タンクを用いて容易に行うことができる。さらには、液体窒素タンクの導入のみで、各農場において凍結精子を簡単に保管できるため、受精適期を逃すことなく生産効率を改善する人工授精を実施することができる。さらに、ブタにおける凍結精子を用いた人工授精は、系統造成豚の血縁・近交係数の急激な上昇を防ぐことが可能となること、あるいは、遺伝資源をスペースをとらず維持できること、それを半永久的に可能とすること、優秀な雄や貴重な品種の遺伝子を保存・供給が可能となることなど、生産者のみでなく精液配布機関・研究機関においても重要視されている。

ブタ凍結精子の人工授精による受胎は、Hess et al. (1957) により初めてその成功例が得られたと丹羽ら (1989) は紹介している。彼らは、-95℃で1~19日間保存した凍結ブタ精子を、25頭の母豚に人工授精し、受精後20~60日で屠殺し子宮内の胎子数を測定した。その結果、7頭の雌ブタが受胎し、平均9.4頭の胎子を確認した。その後、多くの研究者により受胎率向上を目的とした研究が行われてきた。丹羽ら (1989) は、ウシ精子の凍結に用いられる卵黄クエン酸緩衝液を第一希釈液とし、ブタ精液を希釈後、第一希釈液に最終濃度7.5~10%のglycerolを添加した第二希釈液を添加して-79℃へ凍結させる方法により、融解後の精子運動率を向上させた。凍結前処理を終えた0.1~0.2 mlの少量の精液をドライアイス上に作製した小孔内に滴下して急速に凍結する錠剤化凍結法(ペレット法)が開発されて以降、この手法が一般的に用いられるようになった。しかし、Westendorf (1975) は、精液5 mlを大型のストロー内に封入し、両端をシーリング

ボールで封じ、液体窒素の上面 4 cm の位置に並べ、液体窒素の蒸気にて凍結するストロー法を考案し、ストロー法がペレット法よりも優れていると主張した。

1.4 ブタ精液の凍結保存法の現状

丹羽ら (1989) は、「豚凍結精液利用技術マニュアル」を作成し、日本国内における凍結精液製造方法を統一化させた。この方法は、現在でも我が国の試験研究において標準的方法として利用されている。その手法を以下に述べる。

①精液採取

採精は最初の 50~100 ml の濃厚部のみ採取し、上述した精液検査を行う。検査項目に合格し、活力が 80+++以上の精液のみを凍結に用いる。

②前処理希釈

採取した精液は Modena 液の組成に類似した前処理液にて等倍希釈し、室温に静止した後、数時間かけて 15°C へ冷却する。

③希釈液除去・第一次希釈

冷却後、遠心分離にて前処理液および精漿の混合液を除去する。凍結希釈液には主に以下の 2 種類が用いられている。NSF (Niwa-Sasaki freezing extender) は lactose を主成分とし(丹羽ら, 1989), BF-5 は glucose, TES, Tris で構成される (Pursel and Johnson, 1975)。これら凍結希釈液に 20% (v/v) 卵黄を添加し、遠心分離にて顆粒を除去したものを第一次希釈液といい、これを精子ペレットに添加した後、2 時間程度かけて 5°C へと冷却する。

④二次希釈・ストロー充填

第二次希釈液は、第一次希釈液に 6% (v/v) glycerol と 1.5% (v/v) 界面活性剤である Orvus Es Paste (OEP) を添加したもので、これを希釈精液へ最終精子濃度が 1×10^9 sperm/ml となるように添加し、20 分以上 5°C で静置した後 (glycerol 平衡), 5 ml のストローへ充填する。

⑤予備凍結・液体窒素保管

ストロー充填後、液体窒素上面から 4cm 離れた場所で蒸気により 10 分間予備凍結し、その後、液体窒素中で保管する。

⑥融解・人工授精

融解は、凍結ストローを 40°C の温水中で 50 秒間浸漬し、37°C の融解液 (Modena や BTS など) へ投入する。この時の精子濃度は 50×10^8 sperm/50 ml であり、精子運動率が 30+++以上である時のみ液状精液と同様に人工授精する。

1.5 ブタ凍結精液による人工授精の問題点

上記の方法を用いて行われた大規模人工授精試験では、その受胎率は 47%、平均産子数は 7 頭と自然交配および液状精液による人工授精の受胎率 80%以上、平均産子数 10 頭以上と比較し、著しく低い値であった (Johnson et al., 1981, 2000)。我が国においても、1982 年から「豚凍結精液利用実用化促進事業」が開始され、1987 年まで 6 年かけて合計 5,300 頭の雌ブタに授精試験を実施している。その結果においても、受胎率はおおよそ 50%、平均一腹産子数は 8 頭程度であつ

た。このようにその繁殖成績が液状精液より著しく劣るため、凍結精液による人工授精は普及に至らず、現場段階で全く使用されていない。

2.研究目的

我が国の養豚業では、自然交配が60%（地域によっては70%）を占めているため（養豚基礎調査全国集計結果，2008），種雄豚を各養豚農家で飼養する必要があり，これにかかる費用は増大である。また，体重が300 kg以上の雄ブタを扱うことから作業の危険性を伴うこと，育種改良が遅延することなど欠点が多い。射出精液を保存液で希釈する「液状精液による人工授精」は自然交配の欠点を一部克服することを可能とするが，保存期間が7日間程度と短いこと，夏～秋にかけて精子の活力が減退し，受胎率が35%に悪化すること（Kozdrowski and Dubiel, 2004; Murase et al., 2007），精液配布機関からの輸送に時間を要するため，急な発情に対応できないことなどから，その普及率は40%で停滞している。したがって，ブタ精子の凍結法を確立し，現行の種付け（自然交配）から凍結精液による人工授精へと移行されれば，養豚業の生産効率は飛躍的に改善されると期待されている。

ブタ精子の凍結用希釈液に添加される卵黄は，リン脂質やコレステロールなどを多量に含有している。これらは，精子を常温から-196℃へと低下させる，温度変化という精子へのストレスを緩和させる作用があると考えられている。界面活性剤であるOEPは，卵黄中に含まれるこれら有効成分を均一に希釈液へ溶解させるため，凍結希釈液に両者を添加することが一般化された（Kozumplík, 1983）。また，凍結時の温度変化による精子への悪影響の原因となる細胞内氷晶形成を抑制するため，水分子を保持することでその結晶の肥大化を防ぐglycerolを凍結希釈液に添加する（Wilmut and Polge, 1971）。しかし，これらの物質を添加した凍結希釈液を用いてブタ精子を凍結しても，融解後の精子運動率は50%以下と著しく低く，現在においても凍結希釈液の最適化は成されていないと判断される（Hu et al., 2008）。融解後の精子運動率の低下は，融解時の急激な温度変化によっても起因することからも，融解条件の最適化もまた重要な課題である。しかし，使用される融解液は既存の液状精液の希釈液が一般的に用いられているのが現状であり，その改良に関する報告はほとんどない。さらに，ブタ個体間で，凍結時の温度変化に対する感受性（耐凍能）が大きく異なることも，凍結精液を用いた人工授精による受胎率や産子数低下に影響していると考えられるが（Roca et al., 2006），その原因追及も充分には行われていない。

このような現状から，ブタ精子の凍結保存を「凍結条件」と「融解条件」とに区分して，それぞれ検討し，最適化することが重要であると考えに至った。そこで，本研究第二章では，ブタ凍結希釈液における最適浸透圧条件とその時の最適glycerol濃度を決定し，凍結による精子へのダメージを最小限に抑制する新規凍結希釈液の開発を試みた。第三章では，ブタ精子の耐凍能を負に制御する因子を同定し，その原因因子を抑制する精子処理法の開発を行った。第四章，第五章では，第三章までに得られた，知見を基にして，耐凍能の低い個体を含めた全ての雄個体の精子を凍結可能とする新規凍結融解処理法の開発を試み，ブタ凍結精液による人工授精の繁殖成績を，液状精液と同様なレベルにまで向上させ，実用可能な技術とすることを目的とした。

第二章：至適浸透圧と glycerol 濃度の検討による

ブタ精子新規凍結希釈液の開発

序論

精子は多くの酵素を含む先体, DNA を収納する頭部, エネルギー供給源であるミトコンドリアを含有する中片部, 運動能を司る尾部で構成される. 凍結や融解による急激でかつ大きな温度変化は, 精子のそれぞれの部位を物理的に損傷させ, 機能性を低下させる結果, 受精能に悪影響を与えている (Curry, 2000). 凍結融解による大きな形態的变化では, 頭部と尾部を結ぶ頸部が損傷を受け, 頭部と尾部が乖離する場合もある (正木, 2000). また, 精子先体部の詳細な解析法として, 先体内に糖タンパク質が存在することから, この糖鎖に結合する蛍光標識 lectin を用いた検査がある. この方法を用いて精子先体部の損傷を検出すると, 融解後に部分的な損傷や一部では全欠損していることが明らかとなった (Chauhan et al., 1994; Aboagla and Terada., 2003). 頭部においては, 凍結・融解により原形質膜の損傷や異常が発生するために, 死滅細胞の膜のみ透過する Propidium iodide (PI) により核が染色される精子の割合が増加している (Barthelemy et al., 1990; Bollwein et al., 2008). さらに, これらの PI 陽性精子では, クロマチンの構造変化や DNA の断片化が起こっている (Royere et al., 1996). また, 中片部においてはミトコンドリアの内部構造が破壊され, その機能の低下が起こることも報告されている (Courstens et al., 1989; Carvajal et al., 2004). 精子は膜の単純拡散あるいは, 細胞膜に発現するタンパク質である Aquaporines により細胞内外の水分子の透過が行われているが (Callies et al., 2008), この細胞内自由水が急速凍結により氷晶を形成するため, 氷晶が細胞質, 細胞小器官, 細胞膜に対して物理的ダメージを与え, 融解後に上記に示す損傷が生じ, その結果, 精子の運動率の低下が起こると考えられている (Watson and Duncan., 1988; Watson, 2000; Johnson et al., 2000; Nishizono et al., 2004).

Lovelock and Polge (1954) は, 凍結用希釈液へ glycerol を添加することにより, 凍結により精子が被るダメージが低下することをウサギ, 家禽, ウシ精子において発見した. glycerol は不凍液と呼ばれ, 細胞外溶液の凍結による氷量を最小限に抑制し, 精子の物理的損傷を緩和する (鈴木ら, 1990). また, glycerol は極性のある小分子であり細胞膜透過性に優れるという特徴も有している (Alberts et al., 2004). このような特性により, 細胞内自由水と置換し, 細胞内の氷晶形成を防止すると共に, 細胞内の塩類の濃縮による細胞構成タンパク質の変性を防止する (Lovelock and Polge, 1954). glycerol 以外にも凍結保護剤には ethylene glycol や dimethyl sulphoxide (DMSO) などがあり, それぞれ細胞膜透過性が異なる. 透過性は ethylene glycol が最も高く, 次いで DMSO, glycerol の順である (Gilmore et al., 1998). そのため, 胚などの大型の細胞の凍結には ethylene glycol がよく用いられている (Fahning and Garcia, 1992; Tominaga, 2004). 一方, 精子の凍結には glycerol が融解後の精子生存性に最も有効であるとの

比較実験から、一般的に用いられている (Gilmore et al., 1998; Royere et al., 1996).

glycerol は精子を凍結によるストレスから保護するが、細胞毒性も合わせ持ち、精子の代謝活性を阻害するなど、精子の生存性に対して負の影響も及ぼすことが報告されている (Jeyendran et al., 1985; Hammerstedt et al., 1990; McLaughlin et al., 1992; Guthrie et al., 2002). さらに、Gao et al. (1993) は、凍結希釈液への glycerol 添加は溶液中の浸透圧を急上昇 (glycerol 濃度 3%; 1600 mOsm/kg) させ、凍結直前に精子から水分子を急激に流出させることで、精子頭部の収縮や尾部の変形が起ることを確認した。また、融解時には浸透圧を等張にするために、glycerol の細胞外への流出と水分子の再流入が起き (Gilmore et al., 1996, 1998; Gao et al., 1995; Guthrie et al., 2002), この glycerol による水および glycerol 分子の急激な膜通過は、細胞膜に不可逆的な影響を与えると考えられており、この変化を Osmotic shock と呼んでいる。Osmotic shock は融解後の精子運動率や受精率を低下させる (Jeyendran et al., 1985; McLaughlin et al., 1992).

Gilmore et al. (1998) は、マウス、ヒト、ブタ精子の glycerol の細胞毒性を、精子運動率を指標に測定した。その結果、ヒト、マウス、ブタの順で細胞毒性に対する耐性が高いことを示した。特に、ブタは他動物種のそれと比較して、glycerol の細胞毒性に対する耐性が著しく弱いことが知られている (Almlid and Johnson, 1988; Gilmore et al., 1998)。実際、凍結希釈液に添加する至適 glycerol 濃度は、ウシ 10~11% (Wiggin and Almquist, 1975), ヒツジ 4~6% (Fiser and Fairfull, 1984), ヒト 5% (Pilikian et al., 1982) であるが、ブタでは 4% 以上の添加濃度では精子膜の損傷が激しく、融解した精子を用いた人工授精後の受精率が低下する (Wilmot and Polge., 1974)。Buhr et al. (2001) は、種々の glycerol 濃度でブタ精子を凍結し、融解後の運動率および先体膜正常率を測定した結果、glycerol 濃度が 4~8% において融解後の精子前進運動率は高い値を示したが、先体膜正常率は、わずか 11%~36% にすぎないと報告した。さらに、先体膜の正常性と機能性を維持させるには glycerol 2% が最も最適な濃度であることを示した。このように、ブタにおいては、精子膜機能性を低下させないために、glycerol を高濃度添加することができない。したがって、低濃度の glycerol でも細胞内の氷結を抑制する精子処理法を開発する必要がある。

Liu et al. (1998) は、凍結希釈液を高浸透圧条件にしてウシ精子を凍結すると、冷却、凍結過程で、精子の脱水が生じ、結果的に細胞内氷晶形成を抑制することで融解後の精子運動率を向上させたと報告した。また、凍結希釈液を高浸透圧にすると、精子の膜が保護され、運動率の向上と生存率が改善するとヒツジ (Fiser et al., 1981), ブタ (Zeng et al., 2001) でも報告された。これらのことから、凍結前に高浸透圧条件で処理することは、glycerol 非依存的に細胞内自由水を脱水できる有効な手法であると考えられる。

希釈液中あるいは細胞中の水分子の透過性は、glycerol などの凍結保護剤 (CPAs; Cryoprotectant agents) 存在下では低下することから (Gilmore et al., 1995), glycerol を添加する前段階、すなわち、15°C での第一次希釈時に凍結希釈液の高浸透圧条件で精子細胞内の水分子を流出させ、次に、5°C での第二次希釈時に既存より低濃度の glycerol を添加することで、glycerol による Osmotic shock を最小限に緩和できるのではないかと推察した。しかし、ブタ精子の凍結

において、精子の高浸透圧条件下での影響や、その時の至適 glycerol 濃度は全く報告されていない。

そこで、本章では、ブタ凍結希釈液 Niwa-Sasaki freezing extender (NSF) を基礎希釈液とし、その第一次希釈液 (NSF-1) の浸透圧を 300, 400 または 500 mOsm/kg に調整し、第二次希釈液 (NSF-2) の glycerol 濃度を 1, 2, 4, 6% (最終 glycerol 濃度は 0.5, 1, 2, 3%) とした計 12 処理区において、最適な組み合わせを決定することを目的とした。実験 1 では、3 頭の雄ブタから精液を採取し、それぞれの希釈液を用いて凍結し、融解後の精子運動率におけるブタ個体、浸透圧、glycerol 濃度間に、統計学的に有意差が存在するかを検討した。実験 2 では、実験 1 で得られた浸透圧の最適な条件である 400 mOsm/kg における、至適 glycerol 濃度を融解後精子運動率、精子膜および先体膜正常率を指標にして決定した。実験 3 では、実験 1 および 2 で得られた最適な組み合わせとした凍結希釈液で作製した凍結精液と、既存の希釈液浸透圧 300 mOsm/kg, glycerol 濃度 3% で作製した凍結精液の運動率と精子膜正常率を比較すると共に、さらに、体外受精および人工授精における受精能についても検討した。

材料および方法

精子凍結融解に用いる希釈液の組成

精液採取直後に希釈する前処理液 (丹羽ら, 1989) は 0.33 mol/L D-glucose (Nakarai, Osaka, Japan), 12.8 mmol/L trisodium citrate dehydrate (Nakarai), 14.3 mol/L sodium hydrogen carbonate (Nakarai), 9.9 mol/L EDTA-2Na (Nakarai), 1,000 U/ml penicillin G potassium (Meiji Seika, Tokyo, Japan), 1 mg/ml streptomycin sulfate (Meiji Seika) を添加して作製した。

精子の凍結時に用いたNSF希釈液は、第一次希釈液として用いられるNSF-1と第二次希釈液としてNSF-2に分けられる (Kikuchi et al., 1999)。NSF-1は、80% (v/v) 0.31 mol/L lactose monohydrate (WAKO, Osaka, Japan), 20% (v/v)卵黄, 1,000 U/ml penicillin G potassium, 1 mg/ml Streptomycin sulfateを添加し、10,000 x g にて40分間遠心分離後、上澄みを0.45 μ mフィルター (Millipore S.A., Molsheim, France) に通し、使用時まで-20℃にて保管した。卵黄無添加NSF-1の浸透圧は300 mOsm/kgである。高浸透圧希釈液を作製するため、2倍濃度の卵黄無添加NSF-1をあらかじめ作製し、滅菌した超純水を徐々に加えて、浸透圧を400または500 mOsm/kgとした。浸透圧は超過冷却方式による氷点降下法を採用した浸透圧計 (OSMOSTAT, OM-6020, ARKRAY, Kyoto, Japan) により測定した。浸透圧調整後の希釈液に卵黄等を上記と同様に添加し、高浸透圧修正NSF-1を作製した。NSF-2は、0.15% Orvus Es Paste (OEP) (Miyazaki Kagaku, Tokyo, Japan) と各濃度のglycerol (Nakarai) 1.0, 2.0, 4.0, あるいは6.0% (最終濃度0.5, 1.0, 2.0, 3.0%) をそれぞれの浸透圧に調整したNSF-1に添加し作製した。

凍結精液の融解液は、0.15 mol/L D-glucose, 26.7 mol/L trisodium citrate, 11.9 mol/L sodium hydrogen carbonate, 15.1 mol/L citric acid (Nakarai), 6.3 mol/L EDTA-2Na, 46.6 mol/L Tris (Nakarai), 1,000 U/ml penicillin G potassium からなる Modena solution を使用した (Funahashi and Sano, 2005)。

精液の採取

大分県農林水産研究センターにて繁殖しているランドレースの20~28ヶ月齢の雄ブタ3頭 (ブタ A, B, C) を使用した。これらのブタはパドック付きのストールにて飼養し、実験前に適正なワクチンプログラム (5月に豚日本脳炎・パルボウイルス混合生ワクチン, 不活化ワクチン接種) と、疾病検査 (オーエスキー, PRRS 陰性を確認) を行い、健康状態が良好であることを確認した。精液の採取は1週間に1回とした。手圧法にて精液を採取した。紫外線滅菌した採取用カップにガーゼを二重に重ね、膠様物を除去し、濃厚部のみ (50~100ml) を採取し、実験に用いた。

精子の凍結融解法

採取した濃厚部は、精子濃度を測定後、前処理液にて2:1 (pre-treatment solution:semen) に希釈し、2時間かけて15℃に冷却した。混合希釈精液は800 x g にて5分間遠心分離し、アスピレーターにて精漿と前処理液を除去した。沈殿した精子ペレットに15℃のNSF-1を精子濃度 20×10^8 sperm/ml となるように添加し、その後、精液低温処理装置 (Sanyo) を用いて、1.5時間以

上かけて 5°C へ徐々に冷却した。冷却した希釈精液にあらかじめ 5°C に冷却した等量の NSF-2 を加えて最終精子濃度を 10×10^8 sperm/ml とした。二次希釈液添加後、glycerol 平衡を行う目的で 20 分以上静置させた後、ストローマシン (INT-705, Fujihira, Tokyo, Japan) を用いて、0.5 ml プラスチックストロー (Fujihira) に充填した。封入したストローを液体窒素液面から 4 cm 離れた場所に置き、蒸気中にて 10 分間予備凍結を行った後、液体窒素中へ入れて、保管した。

融解時には、取り出したストローを 60°C の水に 8 秒間浸して融解し、即座に 37°C に保温した Modena solution と混合した。

精子運動率の測定

4.5 ml の Modena solution と混合した融解精子 (最終濃度 1×10^8 sperm/ml) は、37°C で培養し、Computer-assisted sperm motility analysis (CASA) system を搭載した精子運動解析装置 (Version 8.1, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) を用いて精子運動率を測定した。37°C に保温したチャンバーに 5 μ l の精液を乗せ、1 サンプルに対して 3 画面以上を測定し、その平均値を測定値とした。

精子膜及び先体膜損傷の検出

精子膜損傷の検出は、SYBR14-Propidium iodide (PI) (Sperm viability kit; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) の二重蛍光染色法にて行った。精子の培養液 500 μ l に 0.5 μ l SYBR14 (Component A を DMSO (WAKO) で 10 倍希釈) を添加し、37°C で 5 分間暗室にて培養後、5 μ l の PI をさらに加えて 5 分間培養した。蛍光標識した精子培養液 5 μ l をスライドガラスに滴下し、37°C に保温したウォームプレート (Kitazato-supply, Shizuoka, Japan) に乗せ、蛍光顕微鏡 (ECLIPSE 50i, D-FL, Nikon, Tokyo, Japan) を用いて素早く観察した。蛍光ブロックは G-2A (EX515-550) を選択した。SYBR14 (緑) に反応する精子は膜正常精子 (図 1A)、PI (赤) にて染色された精子を膜損傷精子 (図 1B) として、1 サンプルあたり合計 200 個以上の精子をカウントした。

先体膜の損傷は、FITC-labeled peanut agglutinin (PNA) (Sigma, St. Louis, MO, USA) と PI の二重蛍光染色法にて検出した。Modena solution を用いて融解した凍結精子は、さらに、同液にて 10 倍希釈し、スライドガラスに塗抹した。風乾後、99%メタノール (WAKO) により 10 分間室温条件で固定し、PBS (-) で 100 μ g/ml に調整した FITC-PNA を 30 μ l 精子に滴下して 37°C 飽和水蒸気圧条件下で 30 分間加温した。その後、PBS (-) で 5 分間洗浄を 3 回繰り返し、風乾させた。染色した部位に glycerol にて調整した PI (VectaShield with PI; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) を一滴滴下し、カバーガラスを被せ、マニキュアで封入した。蛍光ブロックは G-2A (EX515-550) を選択し、蛍光顕微鏡にて観察した。PI 陽性精子を総合精子数とし、先体膜正常率は先体が FITC-PNA により完全に染色されている精子 (図 1C) 数 / PI 陽性精子 \times 100 として算出した。

卵巣の採取、運搬、回収

食肉処理場で、未経産ブタの卵巣を採取し、血液などをキムタオルで拭った後、100 µg/ml のカナマイシン (Meiji) を添加し、オートクレーブ (121°C, 30 分) で滅菌した 0.85% (w/v) 生理食塩水 (28°C) に入れ、2 時間以内に研究室へ持ち帰った。

卵巣はキムタオルで生理食塩水等を拭った後、25~28°C に保った部屋で最終添加濃度 0.05% (w/v) PVP (Sigma), 100 µg/ml カナマイシンを添加し、オートクレーブ (121°C, 30 分) で滅菌した Dulbecco-PBS (D-PBS) を入れたシャーレに入れた。破断した剃刀で直径 3~8 mm の卵胞を切開し、先を研磨した薬さじで卵胞内容物を回収した。回収した内容物を、網目の一片が 212 µm の振るいにつけ、壁顆粒層細胞などを除去し、さらに 125 µm の振るいにつけ、単離した壁顆粒層細胞を除いた。篩いに付着した内容物を D-PBS に回収し、実体顕微鏡下でコンパクトな多層の卵丘細胞を有する卵丘細胞卵子複合体 (COC) を選別した。あらかじめ乾熱滅菌 (120°C, 90 分) したシャーレ、剃刀、薬さじ、ピペット、ビーカーを実験に使用した。

卵子の成熟培養

選別した COC を成熟培地で 3 回洗浄後、以下に記した成分の成熟培地 300 µl を入れたウェル (Nunc 48 well dish, Nunc) に COC を入れ、インキュベーター (39°C, 5% CO₂, 水蒸気飽和条件下) で 44 時間培養した。

成熟培地には、0.5 µg/ml porcine FSH (pFSH, Sigma, F2293), 1.0 IU/ml human chorionic gonadotrophin (hCG; Veterinary puberogen, Sankyo, Tokyo, Japan), 10% (v/v) FCS (Gibco, BRL, Grand Island, NY), 7 mM turine (Sigma) を添加した修正 NCSU37 (Petter and Reed, 1991) を用いた。培養開始 3 時間以上前に成熟培地をウェルに移し、ウェルとウェルの間を超純水で満たし、インキュベーターに入れ、ガス平衡により使用開始時の成熟培地の pH を 7.4 に調節した。

体外受精

体外受精は Shimada et al. (2003) の方法に従って実施した。44 時間成熟培養した COCs は、修正 Tris-buffered medium (mTBM) (Abeydeera and Day, 1997) に 0.1% (w/v) BSA (A7888, Sigma) と 5 mM caffeine-sodium benzoate (Sigma) を添加した培地 (受精培地) で 3 回洗浄した。受精培地 50 µl の液滴は媒精の 3 時間以上前に作製し、ミネラルオイルで覆い、39°C, 5% CO₂ 条件のインキュベーター内で平衡化させ、これに洗浄した COCs を 20 個/液滴となるように入れた。COCs の受精培地での培養は媒精の 30 分前には完了させた。

凍結精子は前述したとおり、温水で融解し、37°C に加温した 0.1% (w/v) BSA 添加 mTBM 培地 (洗浄培地) と混合した。700 x g, 5 分間条件で 2 回遠心分離にて精子を洗浄後、精子ペレットに 5 mM caffeine-sodium benzoate および 10% (v/v) FCS を添加した mTBM (前培養培地) を精子濃度 2×10^8 sperm/ml となるように添加し、90 分間、39°C, 5% CO₂ 条件のインキュベーター内で前培養した。精子の前培養終了後、精子濃度が 2×10^6 sperm/ml となるように受精培地で希釈し、これを COCs が入った 50 µl の液滴へ 50 µl 注入し (最終精子濃度 1×10^6 sperm/ml), インキュベーター (39°C, 5% CO₂, 水蒸気飽和条件下) で 6 時間媒精を行った。

mTBM培地は、11 mM glucose, 5 mM sodium pyruvate (Sigma), 113.1 mM NaCl (Nakarai), 3 mM KCl (Nakarai), 7.5 mM CaCl₂ · 2H₂O (WAKO), 20 mM Tris (Sigma)で作製し、39°C, 5%CO₂ 条件下で18~24 時間平衡することでpH 7.2~7.3 に調整したものを使用した。

6時間後、受精卵を回収し、3回発生培地で洗浄した後にミネラルオイルで被せた100 µlの発生培地液滴に移し、さらに12時間インキュベーター内で培養した。発生培地はmNCSU37に0.4% (w/v) BSA (A-8022, Sigma) を添加したものを使用した。

精子侵入率の観察

培養後、回収した卵子をエッペンドルフチューブに移し、ボルテックスで3分間攪拌して透明体に付着した精子を除去した。精子を取り除いた卵子をD-PBSで洗浄後、スライドガラス上に少量のD-PBSと共に20個の卵子を乗せ、ワセリンパラフィンを4つ角につけたカバーガラスをかぶせて50%, 100%酢酸エタノール(酢酸:エタノール=1:3)を濾紙で吸い取りながら順に流し込み、酢酸エタノール内で48時間以上固定した。固定後、カルノア液(エタノール:クロロホルム:酢酸=6:3:1)で卵子の脂質を溶解させた後、アセトラクモイド液(酢酸45%, ラクモイド1%)で染色を行い、カルノア液で余分な染色液を除去した。その後、アセトグリコール溶液(グリセリン:酢酸:超純水=1:1:3)で満たし、マニキュアで封入後、卵子の核相と膨化した精子頭部あるいは膨化はしていないが精子頭部が存在するかを確認し、精子の侵入を判定した。

雌ブタの発情確認および人工授精

発情の同期化は、Kikuchi et al. (1999) に準じて行った。28日間の哺乳期間を終了した雌ブタは、離乳から24時間後に1,000 IU eCG (Veterinary peamex, Sankyo) を投与した。雌ブタはeCG投与72時間後に、同様にhCGを500 IU投与した。発情はeCG投与後48時間から9:00および16:00の1日2回確認した。雌ブタを雄に近づけ(nose-to nose)背圧法にて許容すれば発情と判定した。

hCG投与40時間後に、Modena solutionで希釈した液状精液あるいは凍結精液50 × 10⁸ sperm/50 mlを1回、頸管注入法にて人工授精した。

受胎率および着床率

雌ブタの妊娠は人工授精後25日齢で超音波画像診断装置(Super eye, SSD-500, Aloka, Tokyo, Japan)にて判定した。妊娠が確定した雌ブタは人工授精30日後に食肉処理場へ出荷し、その卵巣及び子宮を回収した。雌生殖器を実験室に持ち帰った後、黄体数、着床部位の数、生存胎児数、死滅胎児数をカウントした。受胎率は、妊娠雌ブタ総数/人工授精頭数、着床率は、着床部位の総数/黄体数で算出した。

実験計画

【実験1】各浸透圧及び glycerol 濃度の3×4 処理区にて凍結した精子の融解後精子機能性の検討

実験1では、3頭の雄ブタ(A, B, C)から精液を採取し、それぞれの希釈液を用いて凍結し、融解後の精子運動率に対してブタ、浸透圧、glycerol 濃度を主効果として三元配置分散分析を行

った。さらに、浸透圧と glycerol 濃度が運動率に与える影響についても検討した。

【実験2】高浸透圧条件下での最適な glycerol 濃度の検討

実験2では、実験1で得られた浸透圧の最適な条件である 400 mOsm/kg での至適 glycerol 濃度を融解後精子運動率、精子膜および先体膜正常率を指標に決定した。

【実験3】高浸透圧および低濃度 glycerol の有効性

実験3では、新しい組み合わせ条件で作製した凍結精液と、既存の希釈液である浸透圧 300 mOsm/kg, glycerol 濃度 3%で作製した凍結精液の融解後の運動率と膜正常率を比較し、体外受精および人工授精における受精能についても検証した。

統計処理

各実験の結果をStatView (SAS Institute) を用いて統計分析した。試験をそれぞれ3回以上繰り返し、統計処理に際してパーセントで示した値を、 \arcsin で変換後、一次元ANOVAを行った。平均値の比較は、Fisherの最小有意差検定法により判定し、5%水準で有意差を評価した。実験1では、ブタ、浸透圧、glycerol濃度を主効果として三元配置分散分析を行った。また、実験3の受胎率については χ^2 乗検定を行った。

結果

【実験1】ブタ個体間、浸透圧処理区間およびglycerol濃度処理区間を主効果とし、融解後精子の0.5, 3, 6時間培養後の運動率において三元配置分散分析による統計的有意差があるか否かを検討した。その結果、全ての培養時間でブタ個体間には有意差は認められなかった ($P>0.05$) (表1)。一方、浸透圧およびglycerol濃度は0.5, 3, 6時間後のいずれの培養時間において、融解後の精子運動率に有意な影響を及ぼした ($P<0.01$)。

glycerol濃度および浸透圧間において有意な差が認められたため、次に、それぞれの各処理区内での統計処理を行った。glycerol 0.5%処理区は1%以上の処理区と比較して、全ての培養時間で融解後精子運動率は有意に低かった ($P<0.05$) (表2)。glycerol 2%は最も高い運動率であったが、3%と比較して有意な差は認められなかった。浸透圧は0.5時間の培養区を除いた全ての培養時間で、400 mOsm/kgが他の浸透圧と比較して有意に高い値であった ($P<0.05$)。このことから、浸透圧は400 mOsm/kgが最適条件であることが明らかとなった。

【実験2】浸透圧400 mOsm/kgの高張条件下における至適glycerol濃度を検討した。融解後の精子運動率は、全てのブタにおいてglycerol 2%または3%が高い傾向を示したが、有意な差は認められなかった (図2A)。また、先体膜正常率においても各濃度のglycerol添加は影響を及ぼさなかった (図2C)。しかし、全てのブタにおいて、glycerol 2%または3%で処理した精子の精子膜正常率は、1%処理区と比較して有意に高い値であった ($P<0.01$) (図2B)。さらに、ブタAとCにおいては、glycerolを3%添加すると2%でのそれと比較して精子膜の損傷率が高い値を示した。これらの結果から、浸透圧を400 mOsm/kgの高張条件とし、glycerol濃度を2%とした希釈液で精子を凍結することが、融解後の精子機能性を向上させることが示された。

【実験3】実験2で考案した新規凍結希釈液 (400 mOsm/kg + glycerol 2%)と既存の希釈液 (300 mOsm/kg + glycerol 3%) (Kikuchi et al., 1999) で作製した凍結融解精子の機能性を比較検討した。全てのブタにおいて、精子融解後0.5時間の精子運動率においては有意差はなかったが、培養3時間後においてブタAおよびCでは、新規凍結区のそれは高い値で維持された (ブタA; $P<0.01$, ブタC; $P<0.05$) (図3)。培養6時間では、全てのブタにおいて新規凍結希釈液が高値を示した (ブタA; $P<0.01$, ブタB; $P<0.05$, ブタC; $P<0.05$)。また、新規凍結希釈液にて作出した精子は、既存の希釈液と比較して、有意に膜正常性が保持されていた ($P<0.01$) (図4A)。一方、体外受精における卵子内への精子侵入率においては、わずかに新規凍結希釈液が高い値を示したが、両処理区間に有意な差は認められなかった (図4B)。

次に、A, B, C3頭の精子を、両処理法によりそれぞれ凍結し、体内での受精能を評価するため人工授精に供試した。eCG-hCG処理した雌ブタに定時1回人工授精した結果、既存の希釈液で凍結した精子を用いた場合では、受胎率が29%と著しく低かったが、新規凍結希釈液で作出した精子では79%と有意に高い受胎率を示した ($P<0.05$) (表3)。また、既存の希釈液では受胎した雌ブタの子宮内着床部位数は5.8個であり、それは黄体数 (排卵された卵子数) の33.8%と低い割合 (着

床率)であった。しかし、新規凍結希釈液では、着床部位数は10.4個であり着床率は57.5%と有意に高かった ($P<0.05$)。これは、新規凍結希釈液による人工授精は、体内での受精率が高いことを示している。

考察

凍結保護剤であるglycerolは、細胞質内の自由水による氷晶形成を減少させ、凍結によるダメージを抑制するが、高濃度のglycerol添加は細胞毒性を持ち、融解後の精子運動率を低下させる (Jeyaendran et al., 1985; McLaughlin et al., 1992; Guthrie et al., 2002). Almilid and Johnson (1988) は、ブタ精子はglycerolの細胞毒性に対する感受性が他動物種と比較して高いことから、glycerol非依存的あるいはその機能を補助する手法により細胞内の氷晶形成によるダメージを緩和することが、ブタ精子を凍結するために必要であると考察している。

本章において、凍結用希釈液の浸透圧を高張条件にすることで、glycerol添加前に細胞内の水分子を脱水することが、低濃度glycerol添加条件における融解後の精子に及ぼす影響を検討した。その結果、精子を第一次希釈する際に400 mOsm/kg条件で処理することが、融解後精子の運動率を最も向上させることが明らかとなった。近年、Corcuera et al. (2007) は、lactoseを12%へと増加させた (浸透圧360 mOsm/kg) 凍結希釈液でブタ精子を凍結すると、融解後の運動率が向上することを報告している。実験2において、400 mOsm/kg条件下において、glycerol濃度の融解後の精子機能性への影響を検討した結果、1%以上へと増加させると、濃度依存的に運動率はわずかではあるが増加した。一方、精子膜正常率はglycerol添加濃度を3%から2%へと減少させることにより有意に改善された。高濃度のglycerolは融解後の精子膜、先体膜およびミトコンドリア膜の損傷に関与していると報告されている (Crister et al., 1988; Gao et al., 1995; Ball and Vo, 2001)。さらに、Lovelock (1957) は高濃度のglycerolに暴露された精子は、細胞膜の脂質二重層の不安定化を起し、その結果、膜の細胞質側のリン脂質量が減少することを示した。これらの報告と本章の結果から、凍結希釈液を400 mOsm/kgの高張条件にし、それに伴いglycerol濃度を3%から2%へと減少させることは精子膜の保護に重要であると結論づけられた。

この低glycerol濃度、高張条件の新規凍結希釈液は、一般的に使用されている凍結希釈液の300 mOsm/kg + 3% glycerolと比較して、精子運動率が融解後0.5時間では差は見られなかったが、その後、高い運動率が長時間にわたって維持された。さらに、これらの精子は正常な精子膜を保持していた。体外受精による卵子内への精子侵入率は、既存の希釈液により作製された精子と差が認められなかったが、人工授精による受胎率および着床率は、新規凍結希釈液で作製された精子により著しく改善された (受胎率; 29% vs 79%, 着床率; 33.8% vs 57.5%)。体外受精に用いる精子は、caffeineにより受精能が誘起されることで、わずか10分間の媒精で十分な卵子内への精子侵入率が得られる (Almiñana et al., 2005)。本研究の体外受精においても、caffeineを添加して精子を前培養しており、供試したブタAの融解直後、0.5時間までの精子運動率は既存の希釈液で作製した場合においても70%以上と新規凍結希釈液のそれと比較しても差はなく、高い運動率を示していたことから、体外受精では精子侵入率に有意な差が認められなかったと考えられる。一方、体内の受精部位である卵管へ精子が到達するには、子宮への注入後数時間を要することが知られている (Suarez, 2008.)。Bailey et al. (2000) は、運動率の低下した精子は、受精部位である卵管内Sperm reserver (SR) へ結合できず、卵子への侵入が果たせないと報告した。したがって、新規凍結希釈液により作製した精子を用いた人工授精による高受胎率は、融解後においても正常

な精子膜を有した精子の割合が高いため、融解後3時間以降においても高い運動率が維持されている結果であると推察された。

以上の結果から、凍結希釈液を400 mOsm/kgの高張条件として第一次希釈を行った後、最終 glycerol濃度を既存の3%から2%へと減少させた第二次希釈液を用いて凍結することは、融解後の精子運動率および精子膜正常率を向上させること、これにより作出された精子による人工授精は、高い受胎率および着床率を示すことが明らかとなったことから、ブタ精子凍結希釈液の最適条件の確立に成功した。

要約

家畜において精子を凍結させ長期間安定的に保存することは、貴重な遺伝資源の保護や生産効率の改善に大きく寄与する。しかし、精子は凍結融解の過程で、細胞膜、先体膜およびミトコンドリア膜の損傷が起こり、融解後の運動率や受精能が低下する。精子細胞内の自由水が凍結時に氷晶を形成することがこれらのダメージの原因であることから、細胞内外の氷晶形成を抑制するglycerolの添加は、精子の凍結を可能とする。しかし、ブタ精子はglycerolの細胞毒性による感受性が高く、他の家畜において使用される濃度では凍結できない。したがって、ブタ精子を凍結するには、glycerolの機能を補助する手法の開発が必要である。凍結希釈液を高浸透圧条件にし、精子を凍結すると、冷却、凍結過程で精子の脱水および頭部の収縮が生じ、結果的に細胞内氷晶形成を抑制することで融解後の精子運動率を向上させるが、ブタ精子において、凍結希釈液の浸透圧に対する耐性および、高張条件下における至適glycerol濃度は検討されていない。

そこで本章において、凍結希釈液 (NSF) の浸透圧を300, 400, 500 mOsm/kg, 最終glycerol濃度を0.5, 1, 2, 3%として3×4処理区を作成し、ブタ精子における浸透圧とglycerol濃度の最適化を試みた。実験1では、それぞれの希釈液を用いて凍結し、融解後の精子運動率に対してブタ個体間、浸透圧処理区間、glycerol濃度処理区間を主効果とした三元配置分散分析による統計学的分析を行った。その結果、融解後精子運動率において、全ての培養時間でブタ個体間には有意な差は認められなかったが、浸透圧およびglycerol濃度には有意な差が認められた ($P < 0.01$)。そこで、各浸透圧およびglycerol濃度が融解後精子運動率に及ぼす影響を検討した結果、glycerol濃度1, 2および3%区は0.5%区と比較して高い運動率を示し、浸透圧では400 mOsm/kgが最も高い値であった。この浸透圧の最適な条件である400 mOsm/kgにおける、至適glycerol添加濃度を融解後精子運動率、精子膜及び先体膜正常率を指標に検討した実験2では、glycerol添加濃度2, あるいは3%区が融解後の運動率において1%区のそれらと比較して高い傾向を示した。また、精子膜はglycerol 2%の場合が有意に高い正常性を保持していたことから、「浸透圧400 mOsm/kg, 最終glycerol濃度2%」という条件がブタ凍結希釈液において最適であることが示された。実験3においては、この新しい条件で作製した凍結精液と既存の希釈液である「浸透圧300mOsm/kg, glycerol濃度3%」条件により作製した凍結精液の融解後の精子運動率と膜正常率を比較し、さらに、体外受精および人工授精試験により体外および体内における受精能についても検討した。両処理区間において、培養初期（融解後0.5時間）には融解後精子運動率に有意な差は認められなかったが、3あるいは6時間後の長期間の培養では、新規凍結希釈液で作製した精子で有意に高い運動率が維持されていた。さらに、新規凍結希釈液により作製した精子は、全てのブタで精子膜の損傷率が低かった。体外受精では両処理区間で有意な差はなかったが、雌ブタへの人工授精による受胎率は新規凍結希釈液にて作出した精子において79%と大きく改善した（既存の凍結希釈液にて作出した凍結精子を人工授精に用いた場合は29%）。また、受胎した雌ブタにおける着床率も57.5%と既存法の33.8%と比較して有意に高かった。

以上の結果から、凍結希釈液を400 mOsm/kgの高張条件とし第一次希釈を行った後、最終glycerol濃度を既存の3%から2%へと低下させた第二次希釈液を用いて凍結を行うことは、融解後

の精子運動率および精子膜正常率を向上させることが示された。さらに、これにより作製した凍結融解精子による人工授精は高い受胎率および着床率を示したことから、ブタ精子凍結希釈液の最適条件を確立した。

表1. 凍結融解後の精子運動率における各パラメーターの効果 (3元配置分散分析)

パラメーター	P値			
	d.f.**	0.5h*	3h*	6h*
ブタ	2	NS#	NS	NS
浸透圧	2	0.009	0.000	0.000
Glycerol濃度	3	0.000	0.000	0.000

*; 精子融解後の培養時間

**; 自由度

#; 有意差なし

表2. ブタ3個体における各浸透圧およびGlycerol濃度 (3 × 4処理区) の希釈液で凍結融解した精子の運動率

効果の変動	培養時間 (h)		
	0.5	3	6
Glycerol濃度 (%)			
0.5	35.7+/-9.4 ^a	18.9+/-10.5 ^a	6.8+/-5.3 ^a
1	48.5+/-11.0 ^b	34.6+/-12.0 ^b	14.1+/-9.1 ^b
2	60.6+/-11.9 ^c	44.3+/-9.9 ^c	21.7+/-13.2 ^c
3	59.6+/-9.2 ^c	41.7+/-13.3 ^c	16.3+/-11.8 ^b
浸透圧 (mOsm/kg)			
300	47.2+/-11.9 ^a	28.2+/-10.6 ^a	7.8+/-5.7 ^a
400	54.6+/-11.8 ^b	42.5+/-15.9 ^c	22.3+/-12.0 ^c
500	51.5+/-14.5 ^b	33.9+/-14.8 ^b	14.0+/-10.3 ^b

数値は平均値±S.D

a, b, c; 同一欄内 (Glycerol濃度, 浸透圧および各培養時間) の異文字間に有意差有り (P<0.05)

表3. 新規凍結希釈液(400mOsm/kg+2% Glycerol)または既存の希釈液(300mOsm/kg+3% Glycerol)を用いて凍結処理した融解精液による人工授精の受胎成績

処理区	n	受胎率(%) (受胎頭数)	黄体数 (範囲)	着床部位数 (範囲)	着床率 (%)
液状精液	3	100 (3/3)	13.7 (12-15)	10.7 (10-11)	78.4
300mOsm/kg 3% Glycerol	21	29 (6/21)	18.2 (13-24)	5.8 (3-10)	33.8
400mOsm/kg 2% Glycerol	14	79 (11/14)*	18.0 (14-22)	10.4 (7-15)	57.5*

*; 既存の希釈液と新規凍結希釈液との間で有意差有り (P<0.05)

人工授精はeCG-hCG処理した雌ブタに1回のみ行った

人工授精は頸管注入用のカテーテルで行った

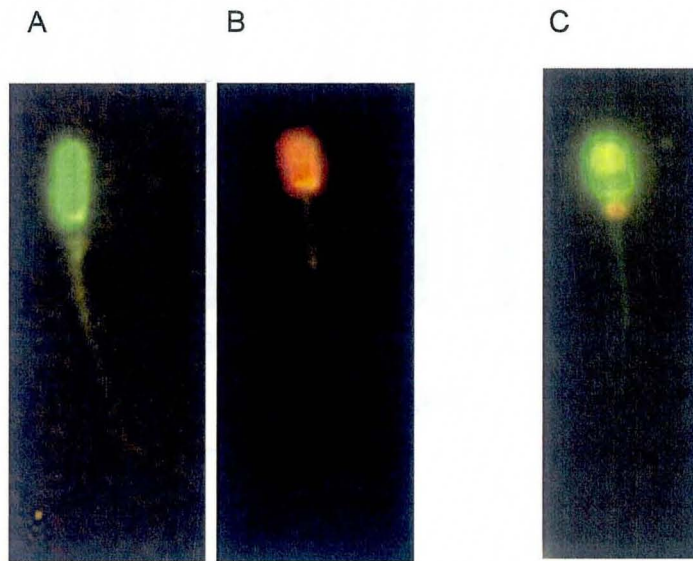


図1. SYBR14-PIおよびFITC-PNA染色による精子像

A; SYBR14陽性精子 (精子膜正常精子) B; PI陽性精子 (細胞膜損傷精子) C; FITC-PNA染色像 (先体膜正常精子)

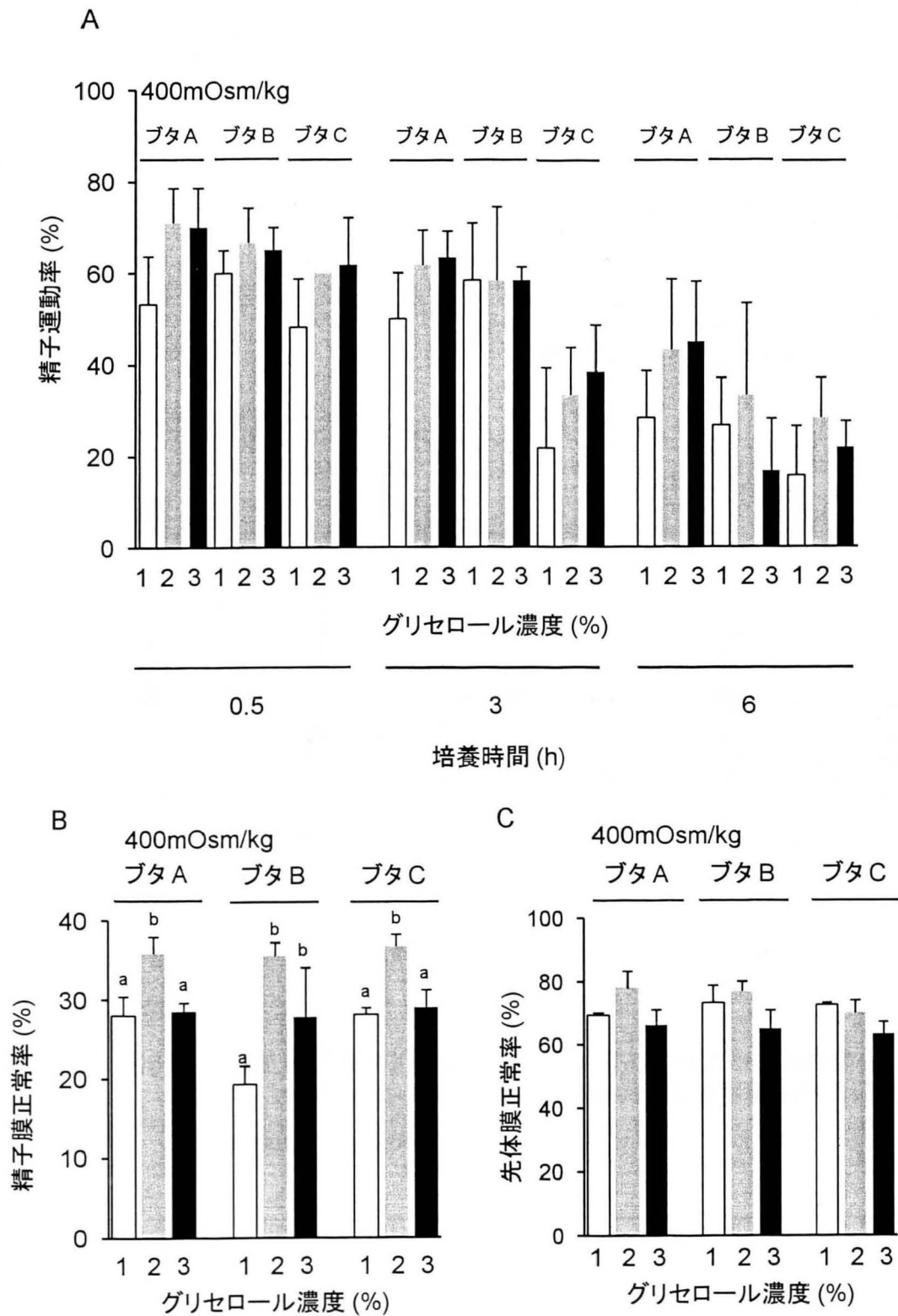


図2. 浸透圧400mOsm/kg条件下におけるGlycerol濃度の違いが精子に及ぼす影響

A; 精子運動率, B; 精子膜正常率, C; 先体膜正常率

^{a-b}異文字間に有意差有り (P<0.05)

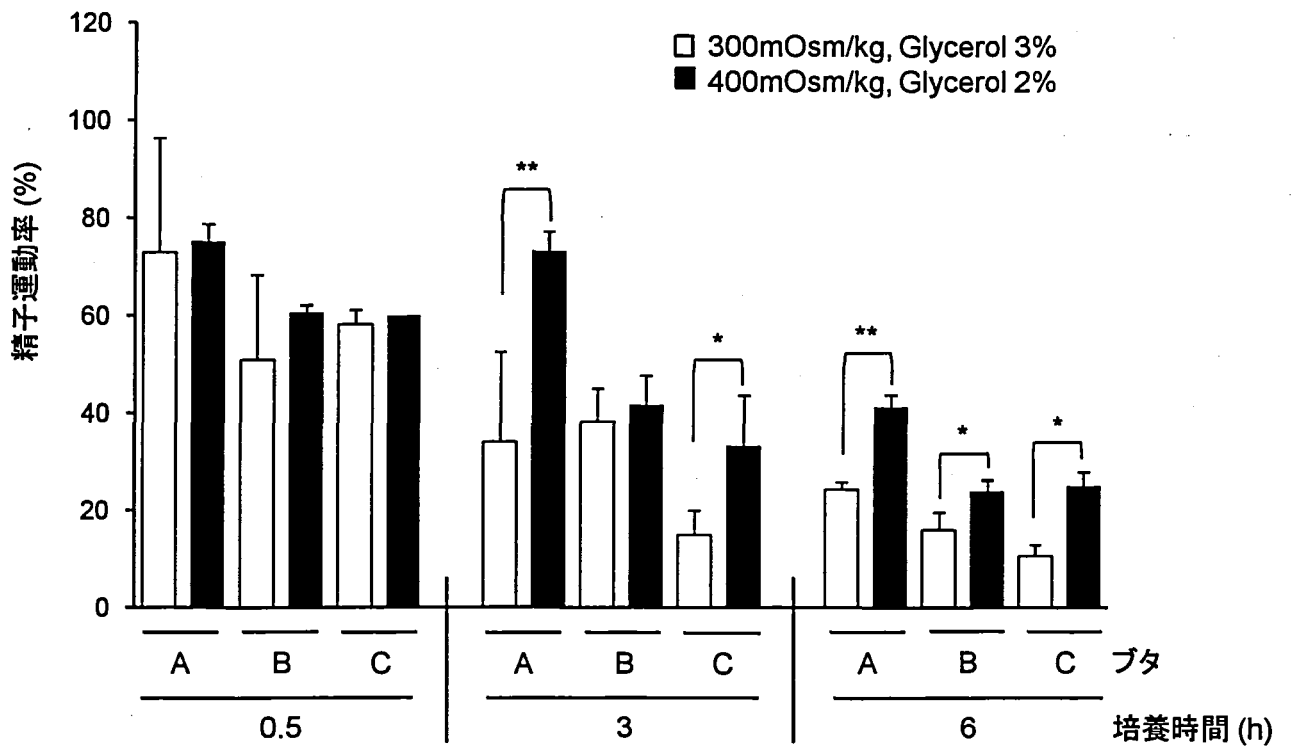


図3 新規凍結希釈液(400mOsm/kg+2% Glycerol)または既存の希釈液(300mOsm/kg+3% Glycerol)で凍結した融解後精子の運動率
* (P<0.05), ** (P<0.01)

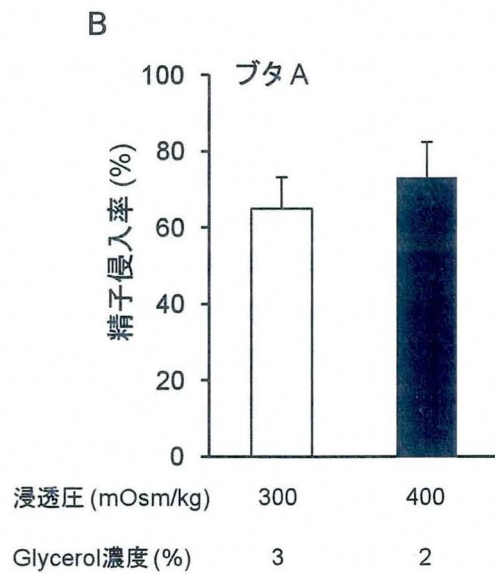
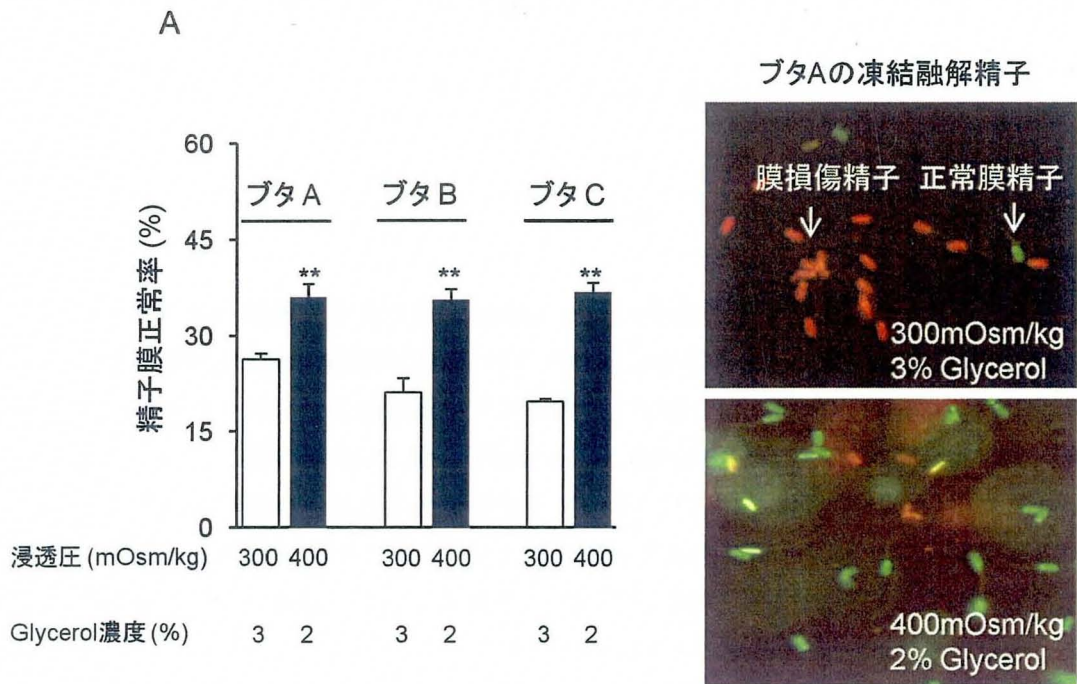


図4. 新規凍結希釈液(400mOsm/kg+2% Glycerol)または既存の希釈液(300mOsm/kg+3% Glycerol)で凍結した融解後精子膜正常率および体外受精における精子侵入率

A; 融解後精子膜正常率, B; 精子侵入率

** (P<0.01)

第三章：耐凍能を負に制御する因子の同定と、

その作用機序の解明

序論

前章において、浸透圧を 400 mOsm/kg, glycerol 添加濃度を 2% (v/v)とした新規凍結希釈液でブタ精子を凍結すると、融解後の精子運動率は既存の希釈液と比較して有意に向上した。しかし、新規凍結希釈液を用いた 3 頭の雄ブタにおいて、1 頭では、凍結融解後の精子運動率は 33%と他の 2 頭と比較して低い値を示した。Wang et al. (1995) も雄ブタ個体間において、凍結融解後の運動率に個体差が認められることを報告している。さらに、耐凍能の低い雄ブタが全体に占める割合を検討した丹羽ら (1989) は、303 頭の雄ブタから精液を回収し、凍結精液を作製し、融解後の運動率について解析した。その結果、融解後の運動率が 50%を下回った個体が 70%以上も存在することを示した。このように、耐凍能が低い個体の割合が高いために、増体、肉質および繁殖形質に優れた雄であっても耐凍能の低い可能性は高く、その場合、凍結精液の利用ができないこととなる。

Thurston et al. (2001) は、射出精子頭部の形状をフーリエ解析を用いて 3 パターンに分類し、その割合と凍結融解後の精子運動率、前進精子率、および先体正常率との関係について検討した。その結果、個体毎に特徴づけられる頭部の形状の特性により耐凍能が異なることを示した。さらに、彼らは、増幅断片長多型法 (Amplified fragment length polymorphism; AFLP) を用いて、耐凍能に関連する遺伝マーカーを検出した (Thurston et al., 2002)。これらの結果から、ブタ個体間における耐凍能の違いは遺伝的要因であると主張した。

一方、同一個体から採取した精液を凍結した時においても、その射出精液間で融解後の精子運動率は変動する (Roca et al., 2006)。また、耐凍能の低い個体においても、その同一個体の精巢上体精子の耐凍能は、射出精子のそれと比較して高いことも明らかにされている (Lasley and Bogart, 1944; Berger and Clegg, 1985; Rath and Niemann, 1997)。これらの報告は、精子の耐凍能を左右する要因は精子形成に関わる遺伝的要因だけではなく、射出時に精子と混ざり精液を構成する精漿成分にも起因し、かつその原因は後天的であると推察される。

ブタ精液中には、多くの細菌が検出されることが知られている。精液中の細菌感染は生殖器道内由来のものと、包皮内に存在していた細菌による混入、精液採取者の手の汚染などの環境中の汚染からのものがある。その細菌数はおよそ $10^1 \sim 10^6$ 個と報告され(曾根ら, 1990; Koppang and Filseth, 1958), それらには, *E. Coli*, *Pseudomonas* spp, *Bacillus* spp, *Staphylococcus* spp, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp, *Citrobacter* spp などグラム陰性細菌とグラム陽性細菌が共に含まれている (Kharenko, 1975)。これら細菌数や検出される細菌種は地域によって大きく異なる (Maes et al., 2008)。Althouse et al. (2005) は、北米の養豚施設 23 農場で飼育されている雄ブタから精液を回収し、その細菌検査を行った結果、1 種類の細菌が検出された個体が全体の 66%, 2

種類以上が 34%であり、全体の約 90%で何らかの細菌が感染していると報告した。ブタの液状精液は 15～20℃で保存し、凍結精液製造時においても室温で数時間あるいは長くて 24 時間以上放置することから、希釈精液中で細菌により悪影響を受ける可能性が考えられる。

Sone et al., (1982) は、精液中への細菌の混入が精子の運動率低下、細胞膜の異常や精子頭部の凝集を引き起こし、その保存性を著しく低下させると報告している。この原因として、細菌の増殖が精液中あるいは希釈液中の pH や基質濃度の変化を引き起こし、間接的に精子へ悪影響を及ぼすと考えられている (Althouse et al., 2000)。したがって、精液の保存液には溶菌作用あるいは増殖抑制作用を示す penicillin G, streptomycin および amikamycin などの抗生物質が多く使用されている (Homonnai et al., 1975; Back et al., 1975; Arriola et al., 1982)。しかし、これらの抗生物質を精子保存液に単独あるいは併用添加しても、細菌による負の影響を部分的にしか抑制できないことも報告されていることから (Kozumplík and Vlcek, 1984; Mazurová and Vinter, 1991)、細菌が放出する可溶性因子が精子に対して負に作用すると推察した。

そこで本章では、22 個体の雄ブタから精液をそれぞれ採取し、細菌検査によりその数と種を同定した。次に、細菌が精子機能性を負に制御している作用機序を解明し、それを抑制する凍結処理法を開発することを目的とした。

第一節：Toll-like receptor を介した精子の初期免疫応答の解析

序論

精液中の細菌感染は、人工授精により雌個体への伝染や子宮内膜炎を誘発し、妊娠率を低下させるだけでなく、細菌感染器官の機能を低下させるため、精子形成不全や精子成熟不全などによる雄性繁殖障害の原因にもなる (Prieto et al., 1996; Ochsendorf, 2008). さらには、精液中の細菌は、射出精液中においても、精子の運動率低下や頭部間凝集などを誘起し、精子の保存性にも悪影響を与えることが知られている (Diemer et al., 2000; Moretti et al., 2009). このような射出精液中における精子への負の影響は、細菌増殖による溶液中の pH あるいは基質濃度の変化や細菌から放出される細胞壁構成成分であるリポポリサッカライド (lipopolisaccharide; LPS), ポリペプチドおよびペプチドグリカンなど強い病原性を示す内毒素によるものと推察される.

後者の細菌放出因子の原因説として、細菌感染した精液中には多くの白血球が検出されることがその根拠の一つとなっている (Saleh et al., 2002). 免疫担当細胞である白血球は、LPS などの病原性破片を認識する受容体である toll-like receptor (TLRs) family を発現している (Takeda and Akira., 2005). 哺乳動物 (マウスおよびヒト) において TLR family は現在までに 11 種同定されており、細菌やウイルスなどそれぞれ認識する病原体が異なるが、TLR4 はグラム陰性細菌の構成因子である LPS を特異的に認識する (Poltorak et al., 1998; Hoshino et al., 1999). LPS を含む病原体により活性化された TLRs はアダプタータンパクである myeloid differentiation primary response gene 88 (MYD88) または TIR domain-containing adaptor protein (TIRAP) を介して nuclear factor kappa B (NF- κ B) をリン酸化し、リン酸化 NF- κ B は核内へと移行し、生理活性物質として知られるサイトカインやケモカインの遺伝子発現を増強させることで、その免疫細胞の生存性や、免疫機能の制御を行う (Pålsson-McDermott and O'Neill, 2004). *Tnfa* は TLRs の標的遺伝子であり、分泌される TNF- α は細胞のアポトーシス誘起を引き起こす因子である (Aggarwal, 2003). 近年, Perdichizzi et al. (2007) は、ヒト射出精液に TNF- α を添加すると、濃度および時間依存的に精子の運動率が低下し、初期アポトーシスの現象である、phosphatidylserine (PS) の細胞膜表面への局在が検出されると報告した. この報告は、精液中の細菌感染による精子運動率低下は、精液中に蓄積した白血球が病原性破片を TLRs を介して認識し、TNF- α などのサイトカインを分泌することで起こることを示している.

最近、免疫担当細胞だけでなく、その他の体細胞も TLRs を介した自然免疫能を保持していることが報告された (Jiang et al., 2006). 生殖細胞においては、ラット精巣、精巣上体、精管に TLRs が発現していること (Palladino et al., 2007), マウスのセルトリ細胞に TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 が高発現しており、それらは各リガンドによる活性化により、interleukin (IL) -1 α , IL-6 や interferon α/β などの炎症性サイトカインを発現させることが明らかとされている (Wu et al., 2008). さらには、Shimada et al. (2006, 2008) は、マウスの排卵された卵子を取り囲む卵丘細胞に TLR2 と TLR4 が発現しており、それらが LPS および TLR2 のリガンド (Pam3Cys) を認

識し、サイトカインやケモカインを分泌することも報告している。また、彼らは、免疫機能を調節する chemokine receptor family (CCR and CXCR) がマウス精子に発現し、これらが、卵丘細胞が分泌するケモカインを認識し、卵子卵丘細胞複合体に対する走化性と受精能獲得に関与し、受精を制御していることを明らかとした (Shimada et al., 2008)。以上の報告から、精液中の細菌感染による精子の運動率低下は、白血球が産生するサイトカインによるものだけでなく、精子が自ら免疫細胞様に自然免疫能を保持し、LPS などの病原体を TLRs を介して直接的に認識することによって起こるとも推察される。しかし、哺乳動物精子における TLRs の発現やその機能に関する研究は全く行われていない。

そこで本節では、ブタ精子における TLRs およびその関連遺伝子の発現とその機能を解明することを目的とした。実験 1 では、22 個体の精液を回収し、細菌検査を行い、その細菌数と種を同定した。また、それぞれの個体における細菌数と精子運動率との相関関係を求めた。実験 2 では、実験 1 で細菌の多くがグラム陰性菌であったことから、ブタ精漿中の LPS 濃度をリムルス試験にて検出した。実験 3 は、ブタ精子における LPS 受容体である TLR4 (*Tlr4*) とその co-receptor である *Cd14* およびグラム陽性菌の膜構成成分であるポリペプチドの受容体である TLR2 (*Tlr2*) の発現と局在を RT-PCR, Westernblotting および Immunofluorescence 法を用いて検出した。最後に、実験 4 では、精漿を洗浄除去し、精子培養液に LPS あるいは TLR2 リガンドである Pam3Cys を添加し、精子の運動率、生存率、先体膜損傷率、cleaved-caspase-3 の活性化およびアポトーシスを検出し、精子の機能性に果たす TLR の役割の解明を試みた。

材料および方法

精子の運動率測定, 精子生存率 (精子膜正常率) 測定, 精子先体膜正常率測定および統計処理は第二章と同様に行った。

ブタ

大分県農林水産研究センターで飼養しているランドレース, 大ヨークシャーおよびデュロックの雄ブタ (12~36 ヶ月齢) 22 頭を用いた。人工授精を行うための雌ブタはランドレース種 (12~14 ヶ月齢) を使用した。使用する種ブタは第二章と同様のワクチンプログラムを実施した。

精子の培養

第二章と同様に精液を手圧法にて採取し, 800 x g, 10 分間の条件で遠心分離を行い, 精漿を除去した。沈殿した精子に同一個体の精漿を精子濃度 1×10^8 sperm/ml となるように添加し, インキュベーター (38.5°C, 5% CO₂, 水蒸気飽和条件下) で 6 時間まで培養した。TLR2 および TLR4 リガンド添加時における精子機能性変化を検討する実験では, 遠心分離後の精子ペレットに 0.1% (w/v) BSA を添加した mTBM を加えてさらに 2 回, 同一条件で遠心分離を行い, 精子を洗浄した。洗浄精子は 1mM caffeine sodium benzoate 添加 mTBM で精子濃度が 1×10^8 sperm/ml となるように希釈した後, インキュベーター内 (38.5°C) で培養した。

TLR4 リガンドである LPS は *Escherichia Coli* 0111:B4 由来の LPS (Sigma) を, TLR2 リガンドであるポリペプチドは, その合成化合物である Pam3Cys-Sr-(LYS)₄ (Pam3Cys; Calbiochem, Los Angeles, CA, USA) を mTBM で溶解し, -20°C で保存したものを使用した。

精漿中の細菌検査

ブタ精液を遠心分離 (800 x g, 30 分間) 後, その上清み (精漿) を回収し, 直ちに 5°C へ冷却し, 細菌検査に用いた。滅菌した生理食塩水で段階希釈した精漿各 100 μl を寒天培地上に加え, 37°C, 6.9% CO₂ 条件で好気培養を 48 時間行った (農林水産省消費・安全局, 2008)。それぞれのコロニーを回収し, さらに同様の培地を用いて 48 時間培養した。培地は Trypticase soy; 5% ヒツジ血液寒天培地 (WAKO) および Desoxycholate-hydrogen sulfide-lactose (DHL) 寒天培地 (WAKO) を用いた。*Clostridium* または *Campylobacter* はそれぞれ, CW 血液寒天培地 (WAKO) または CCDA 寒天培地 (WAKO) を用いて嫌気条件にて培養し, 検出した。腸内細菌は細菌同定キット API20E を用いて, 非腸内細菌は API20NE システムにて同定した。

精漿中 LPS 濃度測定

血漿および精漿中の LPS 含量は, エンドスペシー-ES-50M セット (Seikagaku biobusiness, Tokyo, Japan) を用いたリムルステストにより検出した (Elin et al., 1975)。ブタ血漿は, 鼻保定し, ヘパリン加工真空採血管を採血ホルダー (Terumo, Tokyo, Japan) に装着し, 外側頸静脈から採血した。回収した血液を 800 x g, 20 分間遠心分離し, 血漿を回収した。精漿は 800 x g, 10

分間の条件で遠心分離を行った後、精子を完全に除去したものを使用した。回収した血漿および精漿は LPS 測定まで -80°C で保存した。

① サンプルの前処理

サンプルの前処理は、血液中 LPS 測定の前処理法の一つである希釈加熱を参考に実施した (Yokota et al., 1989)。サンプル $50\ \mu\text{l}$ をエンドトキシンプリー注射用水 $450\ \mu\text{l}$ に加え、10 倍希釈し、 90°C にて 20 分間加熱後、冷却した。 $5,000\ \text{x g}$ で 5 分間遠心分離を行い、上清を希釈加熱サンプルとしてリムルス測定に供した。

② リムルス測定

専用のマイクロプレートに前処理したサンプルあるいはエンドトキシン標準品として CSE-L ($0.088\text{EU}/17.85\text{pg/ml}$ 、生化学工業(株)) を $50\ \mu\text{l}$ ずつ分注した。さらに、カプトガニの血球抽出成分 LAL (limulus amebocyte lysate) と発色合成基質 (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA) で構成される LAL 試薬を $50\ \mu\text{l}$ 添加し、 37°C で 30 分間反応させた。反応後、亜硝酸ナトリウム液、スルファミン酸アンモニウム液および N-(1-ナフチル) エチレンジアミン二塩酸塩液 (トキシカラー DIA-MP セット (Seikagaku kogyou, Tokyo, Japan) をそれぞれ $50\ \mu\text{l}$ ずつ加えた。反応終了後、マイクロプレートリーダー (Model680 Bio-Rad) の $545\ \text{nm}$ 波長にて遊離 LPS を検出した。

Tlr2, *Tlr4* および *Cd14* の RT-PCR

① RNA の回収

精液中の白血球を除去するため、射出精液を Modena solution にて 2 回洗浄し、 -80°C で保存した。精子の Total RNA 回収については、SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて行った。その概略は以下のとおりである。

- PBS で 3 回洗浄した精子が入ったエッペンドルフチューブに $175\ \mu\text{l}$ の SV Lysis Buffer を入れ、軽くボルテックスをかけた。
- SV RNA Dilution Buffer を $350\ \mu\text{l}$ 入れ、2, 3 回転倒混和した。その後、エッペンドルフチューブを 70°C に熱したヒートブロック (ALB-101 Thermmo alumi bath, Iwaki, Tokyo, Japan) で 3 分間熱し、溶液中のタンパク質を変性させ、10 分間 $10,000\ \text{x g}$ で遠心分離し、上澄みを回収した。
- 上澄みを回収したエッペンドルフチューブにエタノールを加え、エッペンドルフチューブ内のすべてを付属のスピンカラムに移し、1 分間 $10,000\ \text{x g}$ で遠心分離した。
- スピンカラムの下に落ちた液を捨て、 $600\ \mu\text{l}$ の washing solution をスピンカラムに入れ、再び 1 分間 $10,000\ \text{x g}$ で遠心分離した。
- 遠心分離後、スピンカラムから落ちた液を捨て、Reaction Buffer ($40\ \mu\text{l}$)、 MnCl_2 ($5\ \mu\text{l}$)、DNase I ($5\ \mu\text{l}$) を混合した反応液 $50\ \mu\text{l}$ を入れ、15 分間室温で反応させた。
- 15 分後、DNase I stop solution を $200\ \mu\text{l}$ を入れ、1 分間 $10,000\ \text{x g}$ で遠心分離した。
- スピンカラムの下に落ちた液を捨て、washing solution ($600\ \mu\text{l}$) を加え、1 分間 $10,000\ \text{x g}$ で遠心分離した。

- スピんカラムの下に落ちた液を捨て、再び washing solution (250 μ l)を加え、2分間 10,000 \times g で遠心分離した。
- スピんカラムの上部をエッペンドルフチューブにセットし、nuclease free water (100 μ l) を添加し、1分間 10,000 \times g で遠心分離した。
- エバポレーターで遠心乾固した。
- 遠心乾固後、-80°Cで使用直前まで保存した。

②RT-PCR

Total RNA は 500 ng poly-dT および 0.25 U avian myeloblastosis virus-reverse transcriptase を用いて 42°C 75 分間の条件で逆転写し、95°C 5 分間の条件で逆転写酵素の不活性化を行った。

Tlr2, *Tlr4* および *Cd14* に対する PCR プライマーには、表 1 に示したものをを用いた。また、それぞれのプライマーを用いて得られる PCR 産物のサイズについても、表 1 に示した。

PCR の手順は以下のとおりである。94°C 30 秒、62°C 1分、68°C 1分を 35 サイクル行い、68°C 7分間により PCR 産物を安定化させた。PCR 産物を、loading buffer (Takara, Tokyo, Japan) と混合後、エチジウムブロマイドを添加した 1.5% (w/v) アガロース (Nakarai) ゲルで、TBE 溶液中で 100V の条件で 30 分間電気泳動した。電気泳動後、トランスイルミネーターで産物を可視化し、撮影した。

TLR2 および *TLR4* 蛍光免疫染色法

回収した精液を PBS で洗浄し精漿を完全に除去後、PBS で 10 倍希釈した。PBS で希釈した精液をスライドガラスに塗抹し、室温で乾燥させた。サンプルを 4% (w/v) paraformaldehyde / PBS で、30 分間 4°C で固定した。PBS で 2 回洗浄後、Vector M.O.M immunodetection kit (Vector Laboratories Inc.) の Mouse Ig blocking reagent で、1 時間室温でブロッキングを行った。M.O.M.™ Protein Concentrate で各一次抗体 (anti-*TLR2* antibody, MAb m*TLR2*, InvivoGen), anti-*TLR4* antibody (MAb m*TLR4*/MD2, InvivoGen San Diego, CA, USA) を 1 : 500 で希釈した反応液と、4°C で 12 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、FITC-conjugated goat anti-rat (mouse) IgG 抗体 (1:250, Sigma) と 1 時間室温で反応させた。染色した部位に DAPI または PI (VectaShield with PI (DAPI); Vector Laboratories Inc) を一滴滴下し、カバーガラスを被せ、マニキュアで封入した。蛍光ブロックは G-2A (EX515-550) および DAPI (EX370) を選択し、蛍光顕微鏡にて観察した。

FITC conjugated-LPS を用いた精子における *LPS* 結合部位の観察

回収した精液を mTBM で洗浄し、完全に精漿を除去した後、mTBM で 1×10^8 sperm/ml となるように調整し、培養液へ 10 μ g/ml の FITC conjugated LPS (F8666, Sigma) を添加し、30 分間 38.5°C でインキュベートした。mTBM を用いて 800 \times g で 2 回精子を洗浄後、蛍光ブロック G-2A を設定した蛍光顕微鏡にて観察した。

TLR2, TLR4, Cleaved-Caspase-3 およびリン酸化 NF- κ B の Western Blotting

① SDS-PAGE

TLR2 および TLR4 の陽性対照としてマウス脾臓およびブタ白血球を使用した。ブタ白血球は真空採血管で採血を行い、800 x g, 20 分間遠心分離を行い、中間層に存在する白血球層を回収した。また、精子先体部を損傷させるため、人為的に先体反応を誘起した。100 ng/ml progesterone 添加 mTBM 培地で精子を 6 時間培養し、その精子を遠心分離にて回収し、サンプルに供試した。

laemmli sample buffer で調整した精子溶解液 20 μ l を、10 秒間の超音波破碎後、5 分間煮沸した。煮沸したサンプルを、作製した 10% polyacrylamide gel で展開した。polyacrylamide gel の組成は以下の通りである。

Separating gel

40% Acrylamide		1.875 ml
\times 4Tris (Nakarai)/SDS	pH8.8	2.5 ml
dH ₂ O		5.515 ml
10% APS (STREM CHEMICAL)		100 μ l
TEMED (半井化学薬品)		10 μ l
		計 10 ml

Stacking gel

40% Acrylamide		487.5 μ l
\times 4Tris (Nakarai)/SDS	pH6.8	1.25 ml
dH ₂ O		3.2075 ml
10% APS		50 μ l
TEMED		5 μ l
		計 5 ml

泳動バッファーには、25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% (w/v) SDS を用いた。

Power Pac Basic (Bio-Rad) を用いて、100V, 室温条件下で電気泳動を約 1 時間行った。

② 転写

転写バッファーには、25 mM Tris, 192 mM glycine, 10% (v/v) メタノール (Nakarai), pH8.3 を用いた。

polyvinylidene fluoride membrane (PVDF membrane, GE Bioscience, Newark, NJ, USA) の前処理については、PVDF membrane をメタノールで 10 秒間洗浄後、超純水で 15 分間振揺させ、転写バッファーに移して使用するまで最低 10 分間振揺した。

使用する濾紙は、ゲルの大きさに合わせて切断後、転写バッファーで使用するまで最低 10 分間振揺した。

泳動後の gel を転写装置 (Mini Trans-Blot, Bio-Rad) の陽極上に濾紙を重ね、その上に前処理した PVDF membrane を置いた。その上に gel の転写した側を下に置き、気泡が入らないよ

うに重ねた。その上から濾紙を重ね、この側を陰極側にして 100mA, 4°Cで一晩転写させた。

③ PVDF membrane のブロッキング

転写した PVDF membrane を TBS (TBST; 10mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) で 5 分間洗浄した。

洗浄した PVDF membrane を 5% (w/v) BSA (Sigma) 添加 TBS で 3 時間ブロッキングした。

④ 一次抗体反応

ブロッキングした PVDF membrane を 2.5% BSA 添加 TBST (0.1% (v/v) tween-20 (Sigma) 添加 TBS) に anti-TLR4 antibody (1:1000, IMGENEX, San Diego, CA, USA), anti-TLR2 antibody (1:1000, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA), anti-cleaved caspase 3 (Asp175) (1:2000, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA), あるいは anti-phospho NF- κ B antibody (1:2000, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA) を添加した液で 4°C 条件下で一晩反応させた。

⑤ 洗浄

非特異的に結合した抗体を除去する目的で、一次抗体と反応させた PVDF membrane を TBST で 2 時間振揺させ洗浄した。

⑥ 二次抗体反応

洗浄した PVDF membrane を 1:2000 に希釈した horseradish-peroxidase-labeled anti-rabbit IgG (GE Bioscience) を添加した 5% BSA 添加 TBST を用いて 1.5 時間室温で反応させた。

⑦ 洗浄

非特異的に結合した抗体を除去するため、二次抗体と反応させた PVDF membrane を TBST 中にて 1 時間室温で振揺させた。

⑧ 検出

HRP 活性の検出については、ECL detection system (GE Bioscience) を用いて行った。まず、検出を行う前に冷暗室に保存してある ECL の試薬 A と試薬 B とを等量混合した。

洗浄した PVDF membrane 上に混合した ECL 試薬を均一に広げて、温室条件で 5 分間反応させ、5 分後、反応を停止させるために PVDF membrane を濾紙に挟んで反応液を除去した。

暗室で、X-Ray Film (FujiFilm, Tokyo, Japan) をセットした Lightinig Plus (岡本製作所) の上に反応液を除去した PVDF membrane を表が X-Ray Film 側になるようにセットし、1 分間感光させた。

アポトーシス精子の検出 (annexin-V assay)

培養後の精子を培地と共に 100 μ l エッペンチューブに採取し、5,000 x g, 2 分間にて遠心分離後、上清を除去した。検出キットは (Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit, cat: K101-25, BioVision, CA, USA) を用いた。精子ペレットに annexin-V binding buffer を 100 μ l 添加し、さらに、annexinV-FITC (green) と propidium iodide (red) をそれぞれ 1 μ l 添加した。室温で 10 分間反応 (暗室) させた後、蛍光顕微鏡 (蛍光ブロック ; G-2A) にて観察した。観察時には、精

子の生存性が低下しないように、38℃にウォームプレート (Kitazato) をセットし、スライドガラスをその上に乗せた状態で観察した。annexin V 陽性精子率=annexinV 陽性精子数 / 明視野にて観察される総精子数 (200 sperm/検体), にて算出した。

実験計画

【実験 1】ブタ精液中の細菌と精子運動率の関係

実験 1 では、22 個体の精液を回収し、細菌検査を行い、その細菌数と種を同定した。また、それぞれの個体において、細菌数と精子運動率との相関関係を求めた。

【実験 2】ブタ精漿中 LPS 濃度の測定

実験 2 では、実験 1 で細菌の多くがグラム陰性菌であったことから、それが放出するブタ精漿中の LPS 濃度をリムルス試験にて検出した。

【実験 3】ブタ精子の TLR2 (*Tlr2*) および TLR4 (*Tlr4*) の発現と局在

実験 3 では、LPS に対する受容体である TLR4 (*Tlr4*) とその co-receptor である *Cd14* およびグラム陽性菌の膜構成成分であるポリペプチドの受容体である TLR2 (*Tlr2*) のブタ精子における発現と局在を RT-PCR, Western Blotting および Immunofluorescence 法を用いて検出した。

【実験 4】ブタ精子における TLR4 および TLR2 の機能

実験 4 では、精漿を洗浄除去し、精子培養液に LPS あるいは TLR2 リガンドである Pam3Cys を添加し、精子の運動率, 生存率, 先体膜損傷率, cleaved-caspase-3 の活性化およびアポトーシスについてそれぞれ検討した。

結果

【実験 1】 22 個体から回収した精液の細菌検査を行った結果、細菌の総数は未検出から最大で 12,000 CFU/ml と個体間で大きなばらつきが認められた (表 2)。細菌が検出されたブタは 19 頭 (グラム陰性菌 13 頭, グラム陽性菌 3 頭, グラム陰性菌+グラム陽性菌 3 頭) であった。検出された細菌は *Pseudomonas aeruginosa*, *E. Coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* spp のグラム陰性菌と *Aerococcus viridans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Cellulomonas* spp のグラム陽性菌であった (表 3)。特に, *Pseudomonas aeruginosa* は 13 頭の雄ブタから検出された。

これら細菌数と精子運動率との関係を明らかにするため、採取した精液を抗生物質無添加条件で 0, 1, 3, 6 時間の培養を行った。培養 0 時間では $R^2=0.000$ と全く相関関係は見られず、培養 1 時間になると $R^2=0.034$ と有意ではないが、負の相関関係が認められるようになった (図 1)。培養 3 時間において、有意な負の相関関係 ($R^2=0.279$, $P<0.05$) が認められ、細菌が精子運動率を負に制御していることが示された。

【実験 2】 実験 2 では、ブタ精液中に感染する細菌はグラム陰性菌が多くを占めることから、その病原性破片として知られる LPS (エンドトキシン) に焦点をあて、精漿中 LPS 含量を、リムルテストを用いて検出した。その結果、0~153.3 pg/ml の範囲で検出され、細菌数と同様ブタ個体間でばらつきが認められた (図 2)。このことから、細菌数の多い個体においては LPS が直接的に精子に悪影響を及ぼしている可能性が示唆された。

【実験 3】 LPS はマクロファージなどの免疫担当細胞において、細胞膜に発現する TLR4-CD14 複合体により認識されることから、ブタ精子における TLR4 (*Tlr4*) および CD14 (*Cd14*) の発現を検討した。RT-PCR および Western Blotting によりブタ精子においても TLR4 (*Tlr4*) は遺伝子、タンパク質レベルで発現していることが明らかとなった (図 3A, B)。免疫蛍光染色法の結果から、精子先体部および中片部に強く局在していた (図 3C)。さらに、progesterone により人為的に先体反応を誘起し、先体部を損傷させた精子では、Western Blotting において、TLR4 量の減少が認められた。精子における LPS 結合部位を明らかにするため、FITC 標識した LPS と精子を共培養した結果、精子頭部および中片部に結合していた (図 3D)。これらのことから、TLR4 は精子頭部、特に先体部と中片部の細胞膜に存在し、そこに LPS が結合することが明らかとなった。

精液中にはグラム陽性菌も存在することから、その病原性因子であるポリペプチドの受容体である TLR2 (*Tlr2*) も同様に検出した。TLR2 (*Tlr2*) は TLR4 と同様に遺伝子、タンパク質レベルで精子に発現しており、精子先体部と中片部に局在していた。

【実験 4】 実験 3 において、精子に TLR2 と TLR4 が発現していることが明らかとなったことから、精子が LPS あるいは Pam3Cys 刺激により、どのように応答するか否かを検討した。LPS あるいは Pam3Cys 添加培地で精子を培養した時、精子運動率は LPS 濃度および時間依存的に有意に低下した (図 4A)。全ての LPS 添加濃度において、運動率は培養 1 時間において有意に低下し

た ($P<0.01$). Pam3Cysにおいても、培養1時間で10または50 $\mu\text{g/ml}$ の添加により、運動率は有意に低下した ($P<0.05$, 図5A). SYBR14-PIの二重蛍光染色による精子死滅率の測定においても、両リガンドは濃度依存的に死滅精子の割合を有意に増加させた (図4B, 図5B). 先体膜損傷率はLPS濃度1または5 $\mu\text{g/ml}$ 添加において、培養3時間から有意な損傷率の増加が認められた (図4C).

免疫細胞において、LPSにより活性化されたTLR4はcaspase依存的なアポトーシスを誘起することが知られている。そこで、LPSあるいはPam3Cysで刺激した時、アポトーシス陽性精子の割合を検出した。初期アポトーシスの現象として知られる膜リン脂質 phosphatidylserine の細胞膜外側への移行を、phosphatidylserine に特異的に結合するタンパク質 annexin-V を用いて検出した。1または5 $\mu\text{g/ml}$ LPS を添加した時、培養6時間で Annexin-V 陽性精子率が有意に増加した ($P<0.01$, 図4D). さらに、これらの精子は培養3時間でLPS無添加区のそれと比較して cleaved-caspase-3 の強いバンドが検出された (図4E). Pam3Cys 添加処理した精子においても、濃度依存的に annexin-V 陽性精子率は増加し、cleaved-caspase-3 も培養6時間で認められた (図5C, D). これらの結果から、LPS あるいは Pam3Cys により精子は caspase-3 を介したアポトーシスを誘起することが示された。

LPS 添加培地で培養した精子は、TLR4 シグナルの下流に存在するタンパク質である NF- κ B をリン酸化することから (図4F), 精子はTLR4およびTLR2を発現していること、LPSやPam3Cysによる精子運動率の低下はTLRsを介した細胞膜の損傷およびcaspase-3活性によるアポトーシスによるものであることが初めて明らかとなった。

考察

本章において 22 個体の雄ブタから採取した精液の細菌検査を行った結果, 最大 12,000 CFU/ml 検出され, 検出された細菌の多くが *Pseudomonas aeruginosa* や *E. Coli* などのグラム陰性菌であった. また, 検出された細菌数と細菌種共にブタの品種間で差は認められなかった. これら細菌数と精子運動率には培養 1 時間までは相関関係は認められなかったが, 培養 3 時間で有意な負の相関関係が認められた. グラム陰性菌やグラム陽性菌は内毒素として知られる LPS やポリペプチドを放出することから, 本節実験 2 において, ブタ精漿中のグラム陰性菌由来 LPS 含量をリムルテストにて測定した. その結果, 最大で 153.3 pg/ml が検出された. これは血漿中濃度の 10 倍以上であった. このことから, 細菌による精子への負の影響は, これら病原性破片によるものであると推察された.

グラム陰性菌の LPS は TLR4, グラム陽性菌のポリペプチドは TLR2 により認識されることが免疫細胞において知られていることから (Tsan and Gao, 2004; Fournier and Philpott., 2005), 精子におけるこれら受容体の発現を検討した. その結果, ブタ精子において, TLR4 および TLR2 は精子先体部およびミトコンドリアが集積する中片部に特異的に発現・局在していた. 近年, Eley et al. (2005) は *Chlamydia trachomatis* 由来 LPS 添加培地でヒト精子と培養すると, 精子は運動率を低下し, アポトーシスを起こすと報告した. 本節において, LPS および Pam3Cys は濃度依存的に精子運動率, 生存率および先体膜正常率を低下させ, caspase-3 を介したアポトーシスを誘起した. 病原体により活性化した TLRs は, その下流に存在する NF- κ B をリン酸化することが知られている (Takeda and Akira, 2005). 本章においても, LPS 添加が精子の NF- κ B のリン酸化を誘起させたことから, 精子に発現する TLR4 は機能性を有しており, 細菌感染を LPS による TLR4 の刺激として感知し, 上述した精子への負の影響が生じることが明確化された.

LPS あるいは Pam3Cys により精子膜や先体膜が培養初期で損傷を受けることも示された. また, caspase による初期アポトーシスにおいても, 膜の異常 (phosphatidylserine の細胞膜外側への移行) が誘起されていた. 精子膜の正常性は精子の運動率維持に重要であることから (Nishizono et al., 2004), LPS-TLR4 または Pam3Cys-TLR2 に起因する膜の異常が精子運動率低下の原因であると考察された.

活性化した TLRs は MYD88 と, その下流に存在する caspase を介してアポトーシスを誘起することがマクロファージにおいて報告されている (Aliprantis et al., 1999, 2000). 本節においても, LPS および Pam3Cys は caspase-3 を活性化させ, アポトーシスを誘起した. また, LPS や Pam3Cys で活性化された TLRs は, 細胞内の Ca^{2+} を増加させることが知られている (Chun and Prince., 2006). 精子において, TLR4 および TLR2 は精子の Ca^{2+} ストア (貯蔵部位) が存在する中片部に強く発現していたことから, 刺激を受けた TLR は, Ca^{2+} ストアから大量の Ca^{2+} を細胞内で放出すると推察される. 精子における細胞内の急激な Ca^{2+} 増加は, 精子膜の変化に伴う自発的な受精能獲得 (capacitation) や先体反応 (acrosome reaction) を誘起し, 生存の持続時間が短縮される他, アポトーシスを誘起すると報告されている (Mishra et al., 2006). 実際, LPS で精子を刺激すると capacitation の指標となるタンパク質のチロシン残基がリン酸化された (データ

未発表, Okazaki et al.). したがって, LPS や Pam3Cys による TLR を介した精子の死滅は, caspase によるアポトーシスと, Ca^{2+} 放出による精子のネクローシスに起因すると考えられた.

このようにブタ精漿中に LPS が存在し, それが精子に発現する TLR を介して精子の機能性を著しく低下させることが明らかとなったが, 精漿中にはおよそ数十 pg/ml の低濃度で検出された. それに対して, LPS 添加実験において, 精子の機能性が低下するには少なくとも 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度が必要であった. Harris et al., (2001) は, ヒト精漿中に可溶性の sCD14 (soluble CD14 α, β) が存在すること, また, Malm et al., (2005) は LBP (lipopolysaccharide-binding protein) が精漿中のプロスタソームに存在していることをそれぞれ示した. sCD14 および LBP は共に LPS に強く結合し, その活性を変化させる. 本節で行ったリムルステストでは LPS-sCD14 および LPS-LBP 複合体は検出できず, 遊離 LPS のみを検出している. したがって, ブタ精漿中には検出値以上の LPS が存在しているものと推察される.

以上の結果から, ①ブタ精液中はグラム陰性菌, グラム陽性菌に感染していること, ②ブタ精漿中には LPS が存在すること, ③ブタ精子は LPS やグラム陽性菌の病原性破片であるポリペプチドを認識する TLR4 および TLR2 を発現し, 先体部および中片部に局在していること, ④LPS, Pam3Cys は TLR を介して精子の膜の異常およびアポトーシスを誘起し, 精子の運動率を低下させているという, 精子の初期免疫応答が初めて明らかとなった (図 6).

表1. RT-PCRに使用したプライマーとPCR産物のサイズ

Gene	Forward Primer	Reverse Primer	Size (bp)	Annealing temperature	Cycle
<i>Tlr2</i>	5'-GAGCGAGTGGTGCAAGTACG-3'	5'-ACCAGCATCGGACCAAGACT-3'	270	62	35
<i>Tlr4</i>	5'-TTGGTCAGCCTCCAAACCTT-3'	5'-CCAGAATCCTGAGGGAGTGG-3'	241	60	35
<i>Cd14</i>	5'-AGCTCTCTGTCCGCGCAAGT-3'	5'-TTGCTCCAGCTCAGCGAATG-3'	226	62	35

表2. 各ブタにおける精液中細菌数 (CFU/ml)

ブタ No.	細菌数 (CFU/ml)			ブタ No.	細菌数 (CFU/ml)		
	G(-)	G(+)	総数		G(-)	G(+)	総数
W458	1100	400	1500	D621			0
L327	11000		11000	W7036	700	3900	4600
W771	7200		7200	D735		500	500
L181	4500	5000	9500	W7418			0
W374			0	D540	1300		1300
W449	2500		2500	D2439	1000		1000
D699	100		100	L291	7300		7300
D754	12000		12000	L381	4100		4100
W1062		10	10	L404	5500		5500
D708	1100		1100	D589	100		100
W7251	1100		1100	L66		3200	3200

G(-); グラム陰性菌, G(+); グラム陽性菌

L; ランドレース, W; 大ヨークシャー, D; デュロック

表3. 精液中から同定された細菌種と検出されたブタの個体数

グラム陰性菌	検出されたブタの個体数 (n=22)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
<i>Escherichia coli</i>	3
<i>Proteus mirabilis</i>	3
<i>Klebsiella spp.</i>	1
<hr/>	
グラム陽性菌	
<i>Aerococcus viridans</i>	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
<i>Cellulomonas spp.</i>	1

22個体の雄ブタから精液を回収し、それぞれ細菌検査に供試し、API20EまたはAPI20NEシステムを用いてその種を同定した。

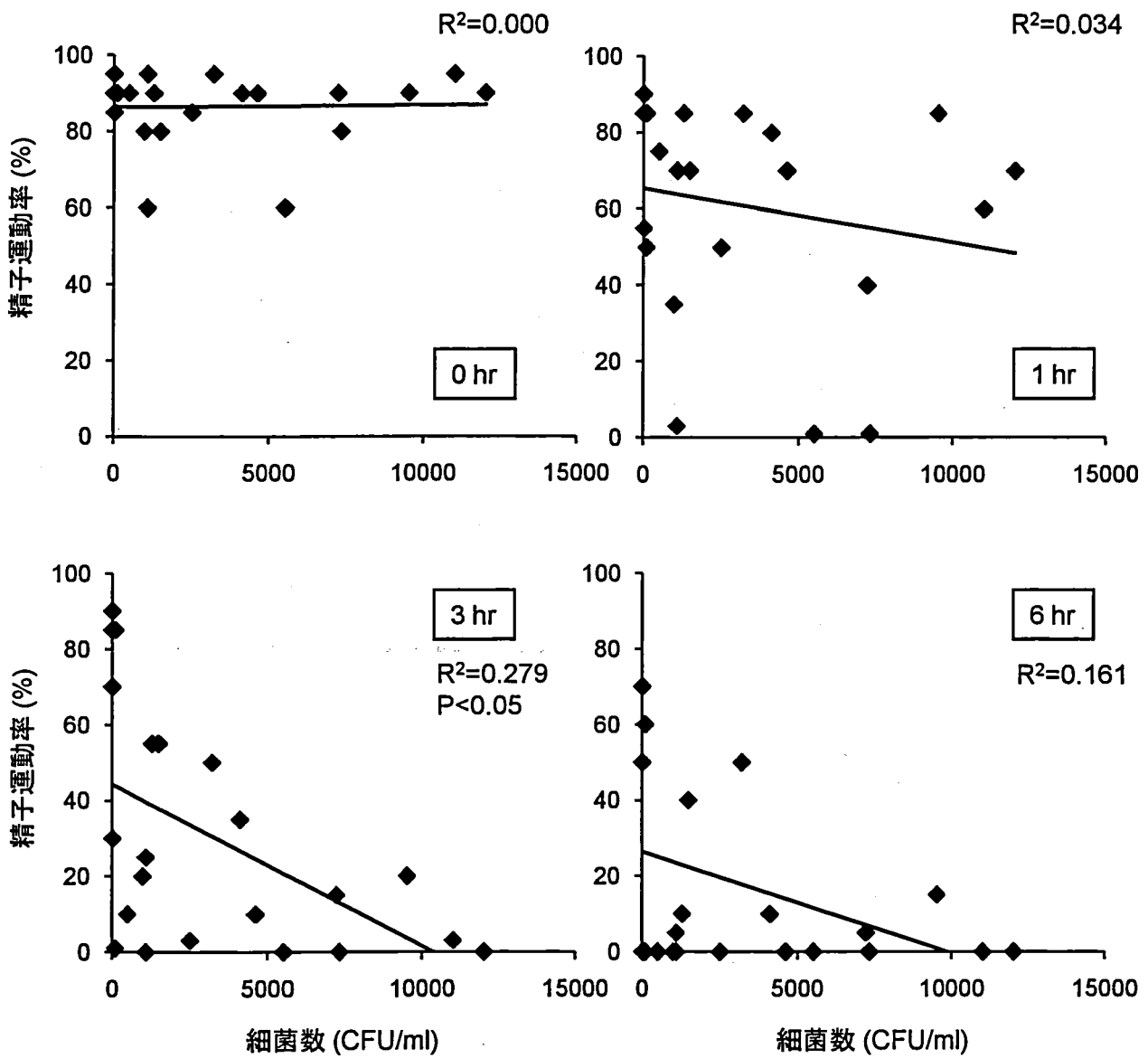


図1. 精液中細菌数と精子運動率の関係

22個体の雄ブタから精液を回収し、細菌検査と精子運動率測定に供試した。各培養時間における精子運動率と細菌数の相関関係を算出した。

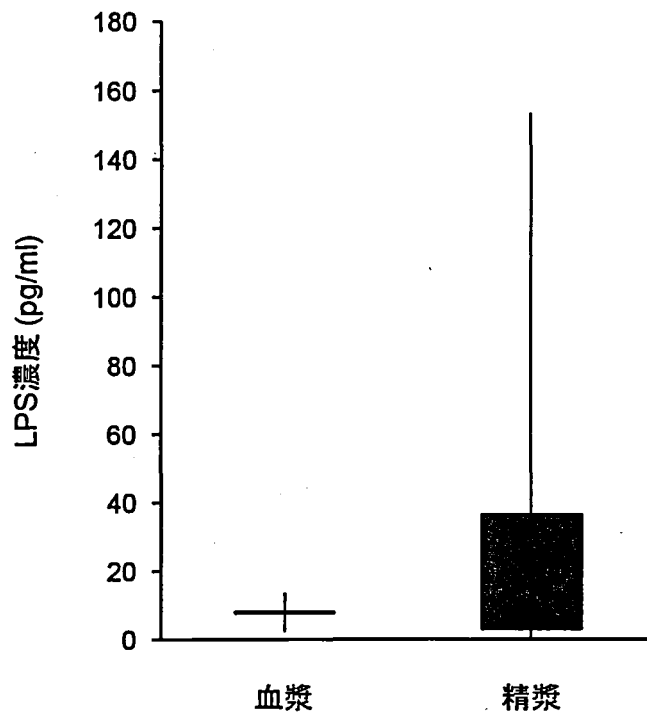


図2. ブタ血漿および精漿中LPS濃度

10頭の雄ブタから血漿および精漿を回収し、各個体のLPS濃度をリムルステストを用いて測定した。

LPS濃度は箱ひげ図(最小値, 第一四分点, 第三四分点, 最大値)で示す

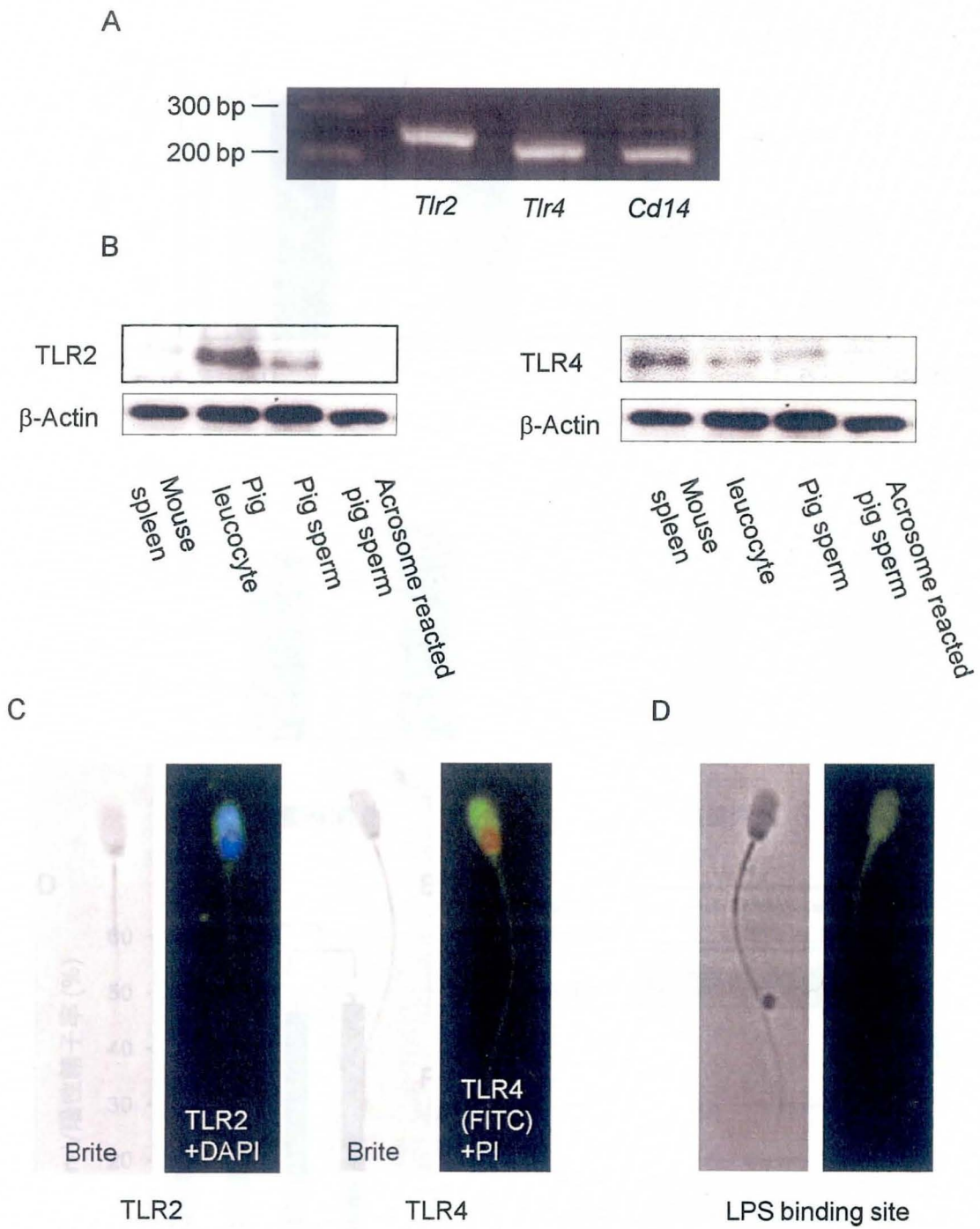


図3. ブタ精子におけるTLR2 (*Tlr2*) およびTLR4 (*Tlr4*) の発現と局在

A; RT-PCR, B; Western blotting, マウス脾臓とブタ白血球を陽性コントロールとした, C; Immunofluorescence, D; LPS-FITC binding staining

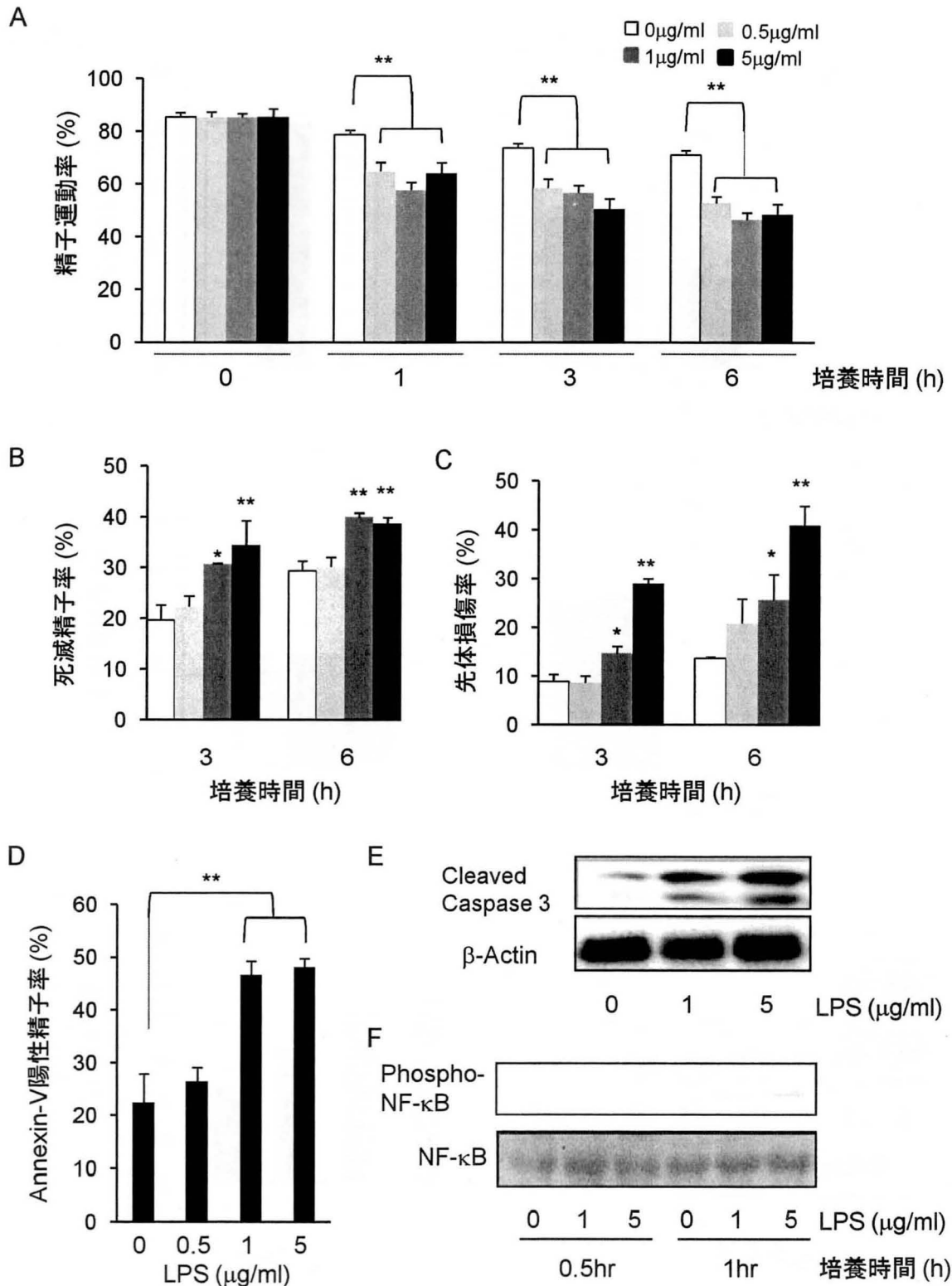


図4. LPSが精子機能性に及ぼす影響

A; 精子運動率, B; 精子死滅率, C; 先体膜損傷率

D; Annexin-V陽性精子率, E, F; 活性型Caspase-3とリン酸化NF-κB

*($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$)

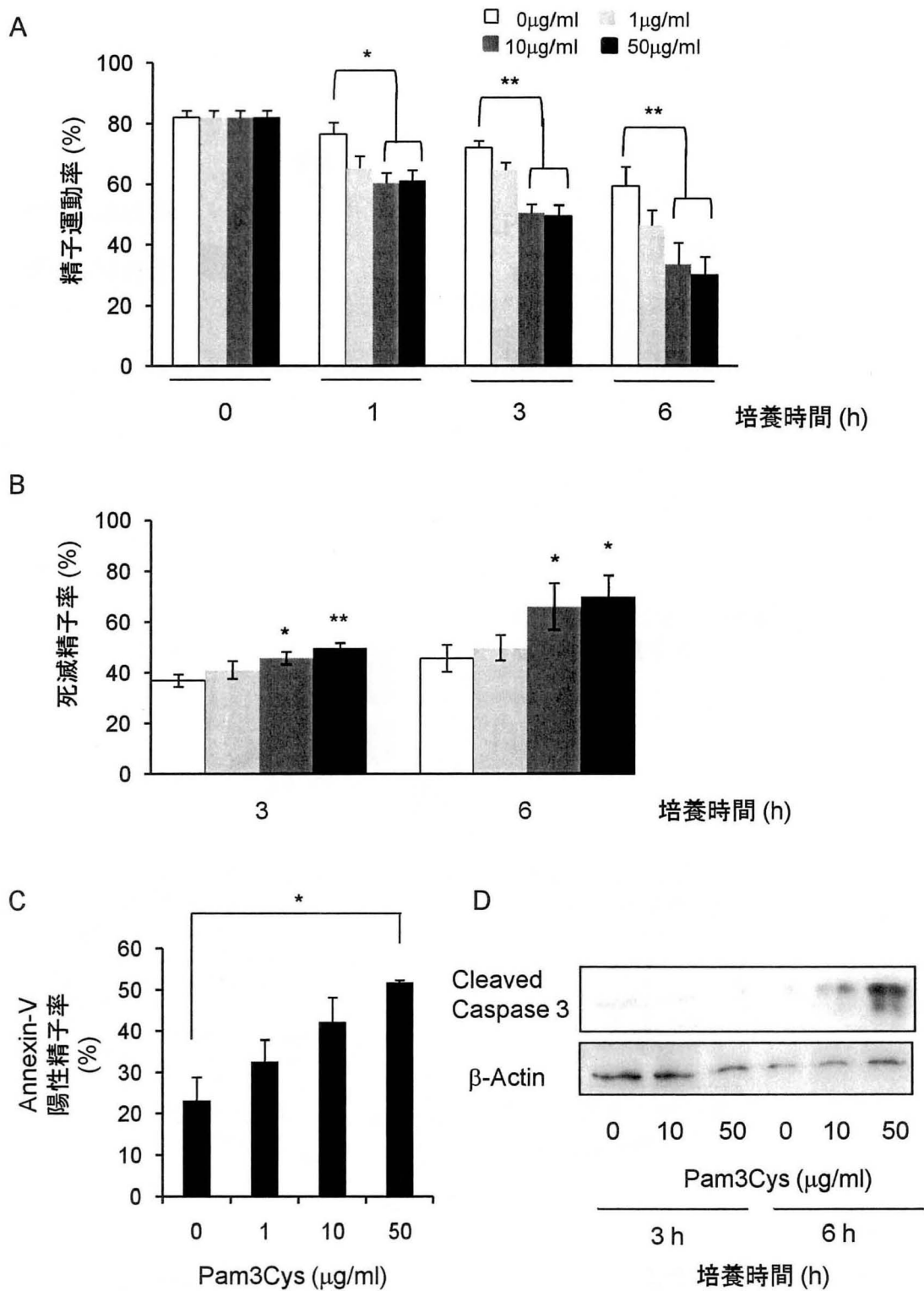


図5. Pam3Cysが精子機能性に及ぼす影響

A; 精子運動率, B; 精子死滅率, C; Annexin-V陽性精子率, D; 活性型Caspase-3

*($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$)

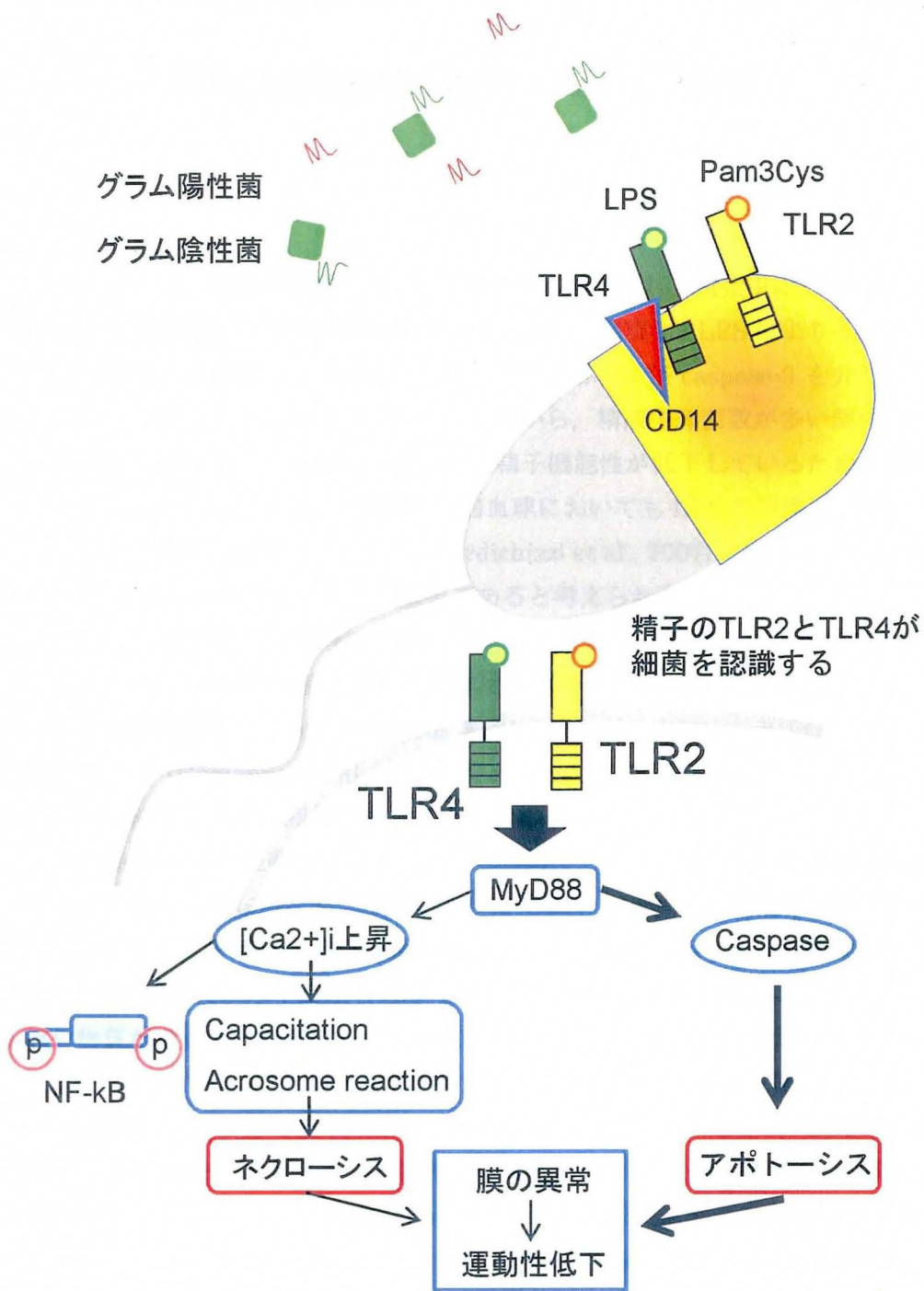


図6. TLR4およびTLR2を介した精子の自然免疫能

精液中にグラム陰性菌，グラム陽性菌が存在する。精子はTLRを発現し，それが精液中の細菌を認識し，アポトーシスにより生存性を低下させるという，精子の初期免疫応答を示す。

第二節：凍結前処理液および凍結希釈液への LPS 阻害剤 PolymyxinB

添加が融解後精子機能性に及ぼす影響

序論

前節において、精液中にはグラム陰性菌が多く検出され、精漿中に LPS が存在すること、ブタ精子はそれを認識する TLR4 (*Tlr4*) および *Cd14* を発現し、LPS によりそれらが活性化されると精子は短時間で運動率・生存性低下、精子膜の異常および caspase-3 を介したアポトーシスを誘起することが明らかとなった。これらの結果から、精液中細菌数が多い個体は、精液採取後、直ちに TLR4 が活性化し、凍結前処理過程で精子機能性が低下しているため、融解後の精子運動率が低いと考えられる。さらに、精液中の白血球においても LPS を認識し、精子へ負の作用を示すサイトカイン類を分泌することから (Perdichizzi et al., 2007; Sikka et al., 2001)、精液採取直後に精液中の LPS を阻害することが重要であると考えられる。

しかし、一般的にブタ精液の処理に用いる抗生物質は、精液中から検出される細菌種により、 β -lactam 系でグラム陽性菌球菌に抗菌作用を示す penicillin G, aminoglycoside 系でグラム陰性菌桿菌に抗菌作用を示す streptomycin あるいは amikamycin などの抗生物質が併用されるのが一般的である (Homonnai et al., 1975; Back et al., 1975; Arriola et al., 1982)。これらは溶菌作用あるいは細菌の増殖抑制作用を示す薬剤である。

一方、peptide 系抗生物質でグラム陰性菌桿菌に対して抗菌作用を示す polymyxin B (PMB) は、細菌膜の崩壊を起こし殺菌的に作用するだけでなく、LPS の生理活性部位である lipid A 構造に直接的に結合し、不活化する (Appelmeik et al., 1994)。しかし、一般的なブタ精液の処理液には PMB は使用されておらず、LPS による精子への負の作用が PMB により回復するか、さらには、本抗生物質が精液保存や凍結精液作製に効果があるか否かは全く検討されていない。

そこで、本節では、ブタ精子を処理するための至適 PMB 濃度を検討する目的で、実験 1 は、LPS に暴露した精子を 50, 100 および 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMB で処理し、経時的に精子運動率および cleaved caspase-3, アポトーシス陽性率を検出した。次に、至適濃度の PMB で処理した精子が受精能を有しているか否かを確認するため、原精液中に至適濃度の PMB を添加し、精漿中の LPS 含量をリムルステストにて測定した。また、PMB と penicillin G を液状精液に添加し (対照区は penicillin G のみを添加)、10 日間 15°C で保存後、人工授精を実施した。また、人工授精後の受胎率および産子数を測定した。実験 3 においては、凍結前処理液へ PMB と penicillin G を添加し (対照区は penicillin G のみを添加)、凍結・融解後の精子運動率を測定し、PMB の効果を検討した。また、実験 2 と同様に人工授精による受胎試験を実施した。

材料および方法

精子の運動率測定、受胎の確認および統計処理は第二章と同様に行った。cleaved caspase-3 の Western Blotting, annexin-V assay, リムルステストによる LPS 濃度測定は本章第一節に従って実施した。

ブタ

大分県農林水産研究センターにて飼養しているランドレース, 大ヨークシャーおよびデュロックの雄ブタ (12~36 ヶ月齢) 20 頭を用いた。人工授精を行うための雌ブタはランドレース種 (12~36 ヶ月齢) を使用した。用いた種ブタのワクチンプログラムは第二章と同様に行った。

精子の培養

第二章と同様に精液を手圧法にて採取し, 800 x g, 10 分間の条件で遠心分離を行い, 精漿を除去した。遠心分離後の精子ペレットに 0.1% (w/v) BSA を添加した mTBM を加えてさらに 2 回, 同一条件で遠心分離を行い, 精子を洗浄した。精子濃度が 1×10^8 sperm/ml となるように 1mM caffeine sodium benzoate 添加 mTBM を加えた後, 精子をインキュベーター内で培養した。

LPS は *Escherichia Coli* 0111:B4 由来の LPS (Sigma) を使用した。Polymyxin B (PMB) は Sigma (BioChemika) から購入したものを Modena solution で希釈後, -20°C で保存した。

精液の液状保存

採取した精液を Modena solution へ最終精子濃度が 50×10^8 sperm/50ml となるように希釈した。保存容器には, 紫外線滅菌したブタ液状精液用ボトル (AI bottle, Grobal pig farm, Gunma, Japan) を使用し, 人工授精まで 15°C のインキュベーター内で保管した。24 時間毎に沈殿した精子を転倒混和し, 溶液中の精子密度を均一にし, 運動率を測定した。

雌ブタの発情確認及び人工授精

初産ブタにおいては, 二度発情が確認されたブタのみ (およそ 8 ヶ月齢) を使用した。経産ブタにおいては, 離乳後の発情で人工授精を行った。いずれも自然発情中の雌ブタに人工授精を行った。雌ブタを雄に近づけ (nose-to nose) 背圧法にて許容を確認後, そのブタを発情と確定した。発情発見直後に 1 回目の人工授精を行い, その後 12 時間おきに合計 3 回の人工授精を実施した。Modena solution で希釈した液状精液あるいは凍結精液 50×10^8 sperm/50 ml を頸管注入法による人工授精に供試した。

分娩および一腹産子数の確認

人工授精後およそ 114 日で分娩が生じるが, 生存産子および白子 (妊娠後期の死亡胎子) を一腹産子数として算出し, 黒子 (妊娠中期の死亡胎子) およびミイラは除外した。

精液の凍結処理法

基本的な凍結処理法は第二章に順じて実施したが、本節においては、第二章で開発した新規凍結希釈液を用い、さらに、凍結前処理液および凍結希釈液 (NSF) へ PMB を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加したものを使用した。

実験計画

【実験 1】ブタ精子における至適 PMB 添加濃度の検討

実験 1 では、本章第一節で精子への負の影響があった LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度存在下における至適 PMB 濃度を検討するため、LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に 50, 100 および 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMB を添加した mTBM で精子を培養し、経時的に精子運動率、Westernblotting による cleaved caspase-3 の検出、および annexin-V assay によるアポトーシス陽性率を検出した。

【実験 2】精液へ添加した PMB の LPS 不活化効果と繁殖成績に及ぼす影響

実験 1 で明らかとなった PMB の至適濃度 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) が、精漿中の LPS を不活化するのに充分か否かを検討するため、PMB 添加処理した精漿中 LPS 含量をリムルステストにて測定した。また、PMB 処理が液状保存に及ぼす影響を検討するため、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMB と penicillin G を添加した液状精液を、10 日目まで 15°C で保存し、精子運動率を測定した。さらに、10 日間保存した液状精液を 15 頭の雌ブタに人工授精し、その受胎率および一腹産子数を算出した。液状精液において、一般的に用いられる抗生物質 penicillin G のみを対照区に設定した。

【実験 3】凍結前処理液および凍結希釈液への PMB 添加が融解後精子運動率および人工授精後の繁殖成績に及ぼす影響

実験 3 では、実験 1 で得られた至適濃度である 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMB 添加が凍結精液作製においても有効か否かを検討するため、凍結前処理液および凍結希釈液 (NSF) へ PMB を添加した。凍結処理過程の精子運動率の変化を検討するため、一次希釈時 (15°C) および二次希釈時 (5°C) の精子運動率を測定すると共に、融解後においても経時的に測定した。また、液状精液と同様、凍結融解精液を 10 頭の雌ブタに人工授精し、その受胎率および一腹産子数を算出した。凍結精液製造時において、一般的に使用される抗生物質 penicillin G のみ添加した区を対照区に設定した。

結果

【実験 1】 LPS 存在下での至適 PMB 添加濃度を検討した。LPS 濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ を mTBM 培地へ添加して精子を培養すると第一節と同様に精子の運動率は培養 3 時間から有意に低下し ($P < 0.05$), 培養 6 時間では運動率は 32.6% と著しく減少した (図 1)。LPS 阻害剤である PMB 50 $\mu\text{g/ml}$ 添加区では、わずかな回復を示したが、その差は有意ではなかった。しかし、100 $\mu\text{g/ml}$ PMB を添加した時、全ての培養時間で運動率の減少は認められず、LPS 無添加区と同等の値を示した。200 $\mu\text{g/ml}$ PMB を添加した区では、培養 3 および 6 時間で 100 $\mu\text{g/ml}$ PMB 添加区に比較して精子運動率はわずかに減少した。

100 または 200 $\mu\text{g/ml}$ の PMB 添加区において、LPS 抑制効果が認められたことから、これらの PMB 濃度を用いて LPS 添加培地で培養した精子の cleaved caspase-3 の Western Blotting を行ったところ、PMB 処理した精子において、LPS による caspase-3 の分解による活性化が抑制された (図 2A)。また、annexin-V assay によるアポトーシス精子率の測定においても、PMB 濃度 100 および 200 $\mu\text{g/ml}$ 添加処理両区において、LPS によるアポトーシス誘導を有意に抑制した (図 2B)。

以上の結果から、LPS による精子運動率低下およびアポトーシス誘起は、100 $\mu\text{g/ml}$ の PMB を添加することで、回復することが示された。

【実験 2】 実験 1 で明らかとなった PMB の至適濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ が、精漿中の LPS 活性を完全に不活化するか否かを検討するため、PMB 添加処理した精漿中 LPS 含量をリムルステストにて測定した。リムルステストは LPS の活性を測定していることから、濃度は活性値に比例している (Fumarola et al., 1979)。各個体の精液中から検出された LPS 濃度にばらつきが認められるものの、原精液中からは LPS が検出されたのに対して、PMB を添加した精液中からは LPS 活性は全く検出されなかった (図 3)。

次に、PMB 処理した精子の液状における長期保存への影響と、長期保存後における人工授精による受精能を評価した。抗生物質無添加で 15°C 保存した精子は保管 2 日目から急激に運動率が低下し、6 日目には 50% 以下の運動率で人工授精には使用できなかった (図 4)。液状精液で一般的に使用される penicillin G を添加した液状精液は、無添加区と比較して、運動率の低下は抑制されたが、保管 6 日目からは低下傾向を示した。しかし、penicillin G+PMB の複合処理区は 6 日目以降も高い運動率を維持し、保管 10 日目においても 60% 以上の運動率を示した。

15 頭の雄ブタから回収した精液を penicillin G 単独および penicillin G および PMB の複合処理した液状精液を 10 日間保存し、人工授精を行った結果、受胎率は penicillin G 処理区では 67% であったのに対して、PMB+penicillin G の複合処理区においては 93% と有意に高い値を示した ($P < 0.05$, 図 5)。同一精液において、penicillin G 処理した精液では不受胎を示したが、PMB との複合処理を行うことにより、受胎した例が 4 例認められた (表 1)。また、一腹産子数においても複合処理した精液の人工授精において高い傾向が見られた。

これらの結果から、回収した精液を PMB 処理することは、精子の機能性を失うことなく、長期間液状で保存可能となることが示された。

【実験 3】100 $\mu\text{g/ml}$ の PMB 添加は、精液中の LPS 活性を完全に阻害し、LPS 存在下でも精子機能性を維持できることが明らかとなった。そこで、この処理法を凍結処理過程に応用することを試みた。精液を採取後、100 $\mu\text{g/ml}$ の PMB を添加した前処理液および NSF 凍結希釈液を用いて、第二章の方法に従って精子を凍結した。精子運動率は、penicillin G+PMB の複合処理区は既存の方法である penicillin G 単独区と比較して凍結前、一次希釈時および二次希釈時ではわずかに高かったが、有意な差は認められなかった (図 6)。しかし、凍結・融解後の培養 3 時間において有意な差が認められ、PMB を複合処理して凍結した融解精子で高い運動率を維持していた ($P<0.05$)。penicillin G 単独処理区においては、融解後 6 時間ではわずかに 12% の精子運動率であったが、複合処理区では 38% を示した。

10 頭の雄ブタ精液を両処理法にて凍結し、1 頭の雄ブタあたり 2 頭の雌ブタに人工授精を実施した。その結果、既存の penicillin G 単独処理した凍結融解精子での人工授精後の受胎率は 50% と低い値であったのに対し、PMB の複合処理区のそれは、90% と有意に高い値を示した ($P<0.05$, 図 7)。また、雄ブタ No. L167, L181, D327 および L381 の 4 頭において、penicillin G 単独で処理して凍結した精子を用いた人工授精では、不受胎であったのに対して、PMB の複合処理した精子を用いた人工授精では受胎が確認された (表 2)。さらに、後者の人工授精では、平均 9.1 頭の一腹産子数であった。

以上の結果から、penicillin G と 100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の PMB を複合添加した処理液を用いることにより、精液中に存在する LPS を不活化し、精子の細胞膜が正常に維持され、その結果、凍結・融解後の精子運動率を向上させ、人工授精後の受胎率向上に有効であることが示された (図 8)。

考察

本章第一節において、LPS は精子に発現する TLR4 を介してアポトーシスを誘起し、その結果、精子運動率を著しく減少させることを明らかとした。peptide 系抗生物質である PMB は、この LPS の生理活性部位である lipid A 構造に結合し、不活化することが知られている (Jacobs and Morrison, 1977; Niemetz and Morrison, 1977)。精子処理において、一般的に使用される抗生物質は penicillin G や amidoglycoside 系であり、精子の機能性に対する PMB の効果は不明である。そこで、本節において、LPS 存在下において、PMB が精子機能性に及ぼす影響について検討した。その結果、100 $\mu\text{g/ml}$ の PMB 添加は LPS による精子の caspase-3 活性およびアポトーシスを有意に抑制し、長時間の運動率維持を可能とした。

LPS による精子のアポトーシス誘起は、精液中に蓄積している白血球が LPS を認識して分泌する TNF- α による精子の TNF- α -TNFR1 シグナルによるもの (Perdichizzi et al., 2007) と、前節で明らかとなった精子の直接的な LPS-TLR4 シグナルによるもの、との 2 パターンが考えられる。さらに、Girard et al. (2003) は LPS の lipid A 構造の違いが TLR2 も刺激しうることを報告した。前節において、精子には TLR2 が発現し、その活性も精子機能性を低下させることを明らかとした。したがって、精漿中に種々の細菌由来の LPS が存在する場合は、TLR4 および TLR2 依存的に精子のアポトーシスが起る可能性が示唆される。これらの報告から、射出精子のアポトーシスを抑制するためには、精漿中に存在する LPS を不活化することが重要であると推察される。実験 2 において、100 $\mu\text{g/ml}$ の PMB は精漿中の LPS を完全に不活化した。さらに、PMB+penicillin G で複合処理した液状精液は、長期間の保存においても精子の運動率は高い値を維持した。一方、抗生物質無添加あるいは、penicillin G 単独で処理して保存した精子においては、PMB 処理した精子と比較して、その運動率は有意に低下していた。penicillin G などの細菌増殖抑制あるいは溶菌作用を示す抗生物質は、細菌を死滅させ、菌体外へと LPS の放出を促進することが知られている (Appelmelk et al., 1994)。したがって、抗生物質無添加の希釈液で保存した精子は、細菌の増殖により間接的にダメージを受け、penicillin G 添加希釈液においては、細菌から放出された LPS により負の影響を受けることで運動率が低下したものと考察された。本研究で用いた penicillin G+PMB の複合処理は、高い運動率の長期間維持を可能としたことから、細菌の増殖および LPS による精子への負の影響を、いずれも抑制可能とする有効な処理法であると考えられた。実際、penicillin G 単独処理により保存した精子を用いた人工授精では受胎しなかった個体の精子でも複合処理により長期間保存した時、成功例が得られた。

採取した精子を LPS 添加培地で短時間 (30 分間) 培養し、その後、精子を洗浄し、LPS による影響から解除しても、培養 1 時間以降の精子運動率は LPS 無添加培地で培養した精子と比較して有意に低下したという実験結果 (データ未発表, Okazaki et al.) は、精子は TLR4 を介して LPS を感受すると直ちに不可逆的な精子膜の異常やアポトーシスが進行することを示している。したがって、精液採取後から細菌汚染が懸念される精漿と長時間共培養する凍結精液作製過程の精子は、すでに TLR4 が活性化し、アポトーシスの進行やそれに伴う膜の異常が起こっていると考えられる。そこで、本節実験 3 において、PMB を前処理液および凍結希釈液へ添加し、精子を凍結

することを試みた。その結果、冷却から凍結までの精子運動率は、penicillin G と PMB の複合処理した精子は、penicillin G 単独処理した場合と比較して変化は認められなかったが、融解後のそれは有意に改善された。さらに、複合処理して凍結した精子による人工授精の受胎成績は、penicillin G 単独処理した精子による人工授精より優れたものであった。これらの結果から、penicillin G などの細菌増殖抑制作用を示す抗生物質を使用する既存の凍結処理過程では、精子は TLR4 を介して、直ちに LPS を認識し、その結果、膜の異常を呈しているため、凍結融解するという温度変化への感受性が高まることから、融解後の運動率と受精能が低下していると結論づけられた。

以上のことから、凍結処理過程において、前処理液および凍結希釈液に 100 µg/ml の PMB を添加する新しい精子処理法は、精漿由来の LPS を完全に不活化し、融解後の精子機能性と人工授精による繁殖成績を向上させることが明らかとなった。

表1. 液状精液へのPMB添加が精子運動性及び繁殖成績に及ぼす影響

ブタ No.	0日目	精子運動率 (%)		受胎		一腹産子数 (頭)	
		10日目		P	P+PMB	P	P+PMB
		P	P+PMB				
D699	88	60	65.09	Y	Y	13	14
D735	91	78.2	83.5	Y	Y	9	13
D754	88	61.8	80.5	Y	Y	9	11
D2439	84	66.9	66.7	Y	Y	3	9
L291	96	23.13	68.28	N	Y	-	10
L327	84	65.6	73.2	Y	Y	10	7
L381	96	54.91	70.82	Y	Y	9	12
W1062	97	1.4	31.43	N	Y	-	3
L167	93	70.5	69.9	Y	Y	11	7
L181	86	50.9	65.5	N	Y	-	11
W7251	81	82.96	83.43	Y	Y	5	11
D38-7	89	41	65	Y	Y	9	11
L181	90	65	70	Y	Y	12	8
W24-10	90	0	5	N	N	-	-
W7251-1	85	10	55	N	Y	-	8

人工授精は雌ブタの発情発見直後, その12および24時間後の3
回行った. 精子数 50×10^8 sperm/50ml注入した.

P; Penicillin G, P+PMB; Penicillin G+Polymyxin B

Y; 受胎, N; 不受胎

L;ランドレース, W;大ヨークシャー, D;デュロック

表2. PMB処理して凍結した精子を用いた人工授精による繁殖成績

ブタ No.	採精時	精子運動率 (%)		受胎		一腹産子数 (頭)	
		凍結融解後		P	P+PMB	P	P+PMB
		P	P+PMB				
D754	93	50	80	N	N	-	-
L167	89	41	48	N	Y	-	8
L947	91	45	60	Y	Y	12	14
L181	88	41	73	N	Y	-	10
L291	91	59	83	Y	Y	3	12
D327	89	25	78	N	Y	-	5
D621	93	84	87	Y	Y	11	9
D247	89	59	88	Y	Y	9	10
L381	90	25	55	N	Y	-	5
W7418	90	43	69	Y	Y	7	9

人工授精は雌ブタの発情発見直後, その12および24時間後の3回行った. 精子数 50×10^8 sperm/50ml注入した.

P; Penicillin G, P+PMB; Penicillin G+Polymyxin B

Y; 受胎, N; 不受胎

L;ランドレース, W;大ヨークシャー, D;デュロック

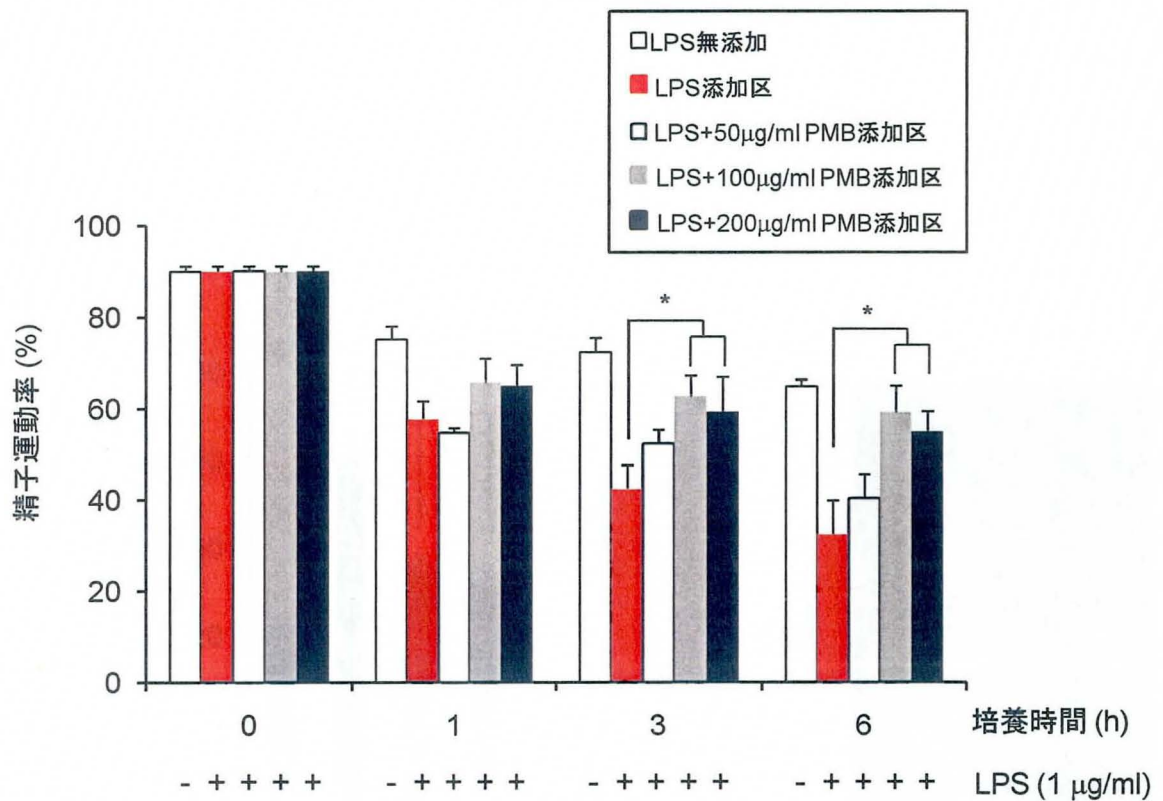


図1. 1µg/mlLPS存在下におけるLPS不活化剤(PMB)が精子運動率に及ぼす影響

LPS 1 µg/mlに各濃度のPMBを添加したmTBMで精子を培養し, 経時的に精子運動率を測定した.

* (P<0.05)

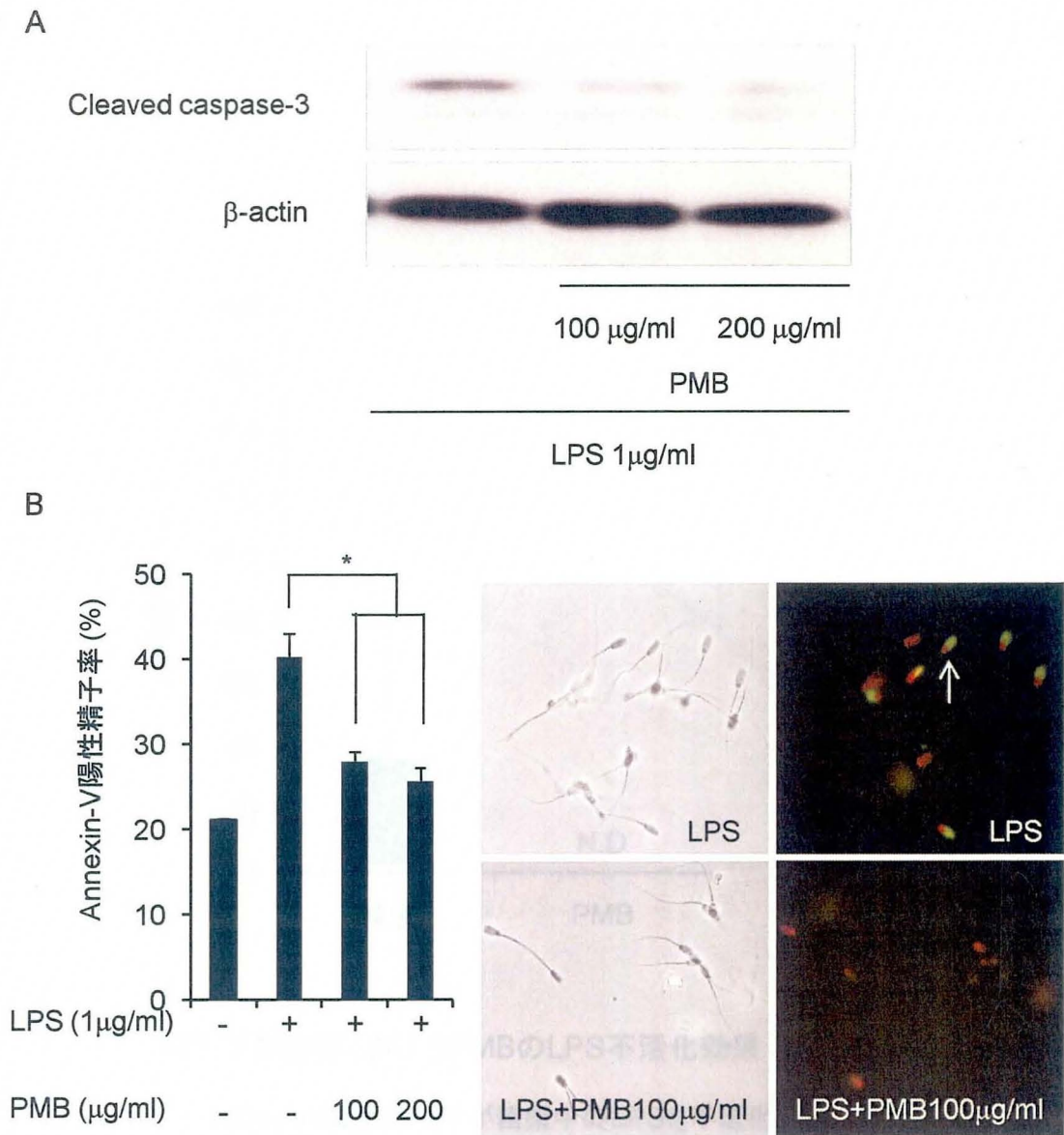


図2. LPS存在下におけるPMB添加が精子Cleaved caspase-3活性化およびアポトーシス誘起に及ぼす影響

LPS 1 μg/mlに各濃度のPMBを添加したmTBMで精子を培養し、Cleaved-caspase-3およびアポトーシスを検出した。

B; 矢印はAnnexin-V陽性精子を示す。

* (P<0.05)

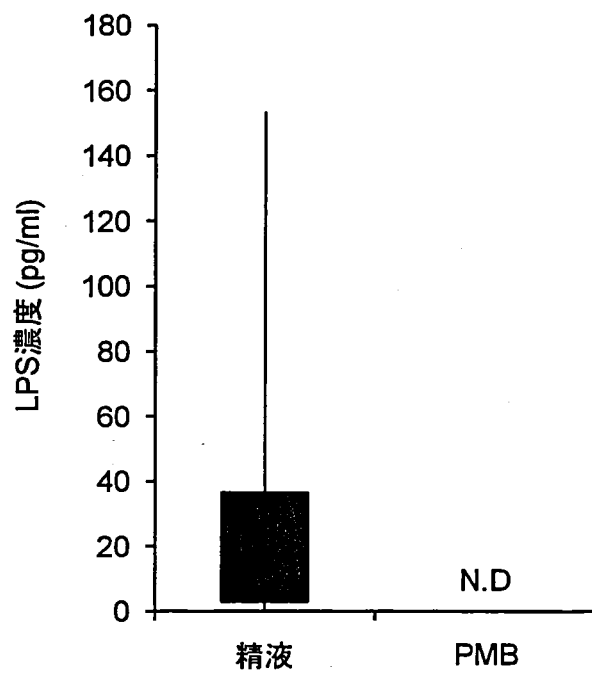


図3. ブタ精液におけるPMBのLPS不活化効果

100 μ g/ml濃度のPMBが精漿中のLPSを不活化するか否かを検討するため、10頭の雄ブタから精液を回収し、源精液へPMBを添加5時間後にリムルテストを用いてLPSを測定した。

PMB; 100 μ g/ml

N.D; 未検出

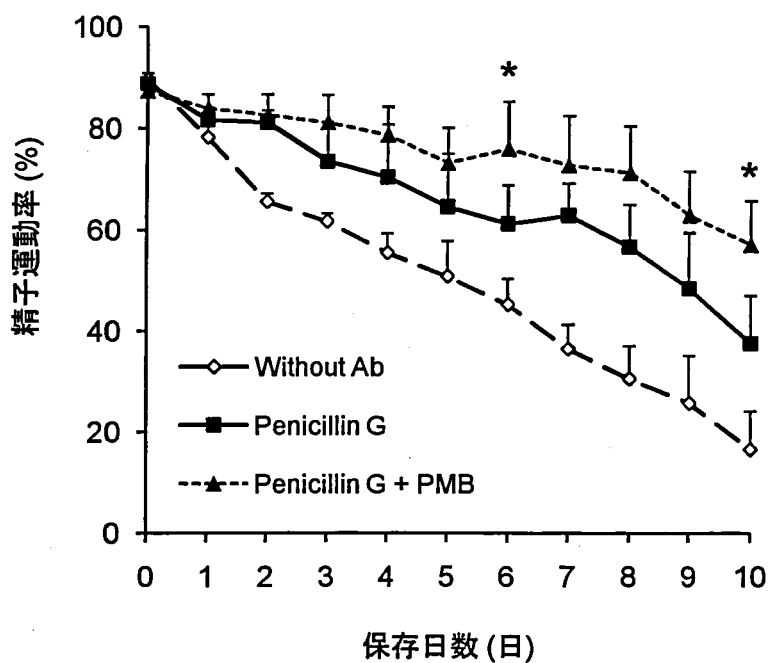


図4. 液状精液へのPMB添加が精子保存性に及ぼす影響

15個体の雄ブタから精液を回収し、各個体の精液を用いて抗生物質無添加 (Without Ab), Penicillin G単独処理区 (Penicillin G), Penicillin G+PMBの複合処理区の3処理区を作製し、精液を液状保存した。

* 同一保存日数において抗生物質無添加区および Penicillin G単独処理区に対して有意差有り(P<0.05)

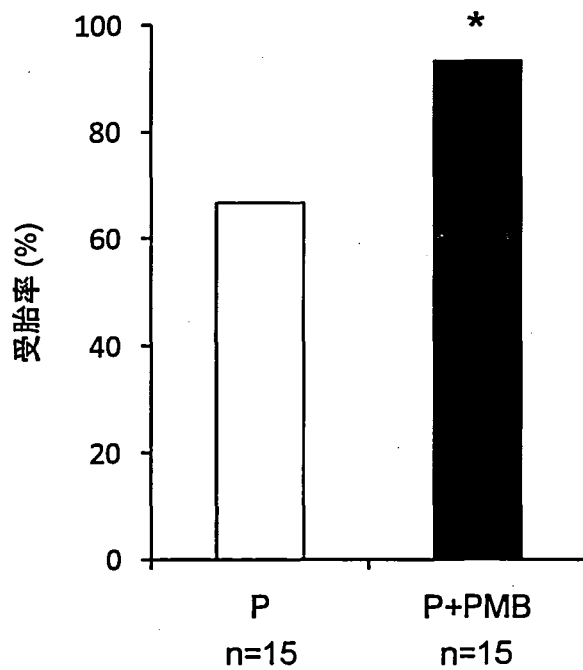


図5. Penicillin GとPMBを複合添加して保存した液状精液による人工授精の受胎成績

人工授精は雌ブタの発情発見直後、その12および24時間後の3回行った。精子数 50×10^8 sperm/50ml 注入した。

P; Penicillin G, P+PMB; Penicillin G+Polymyxin B

* ($P < 0.05$)

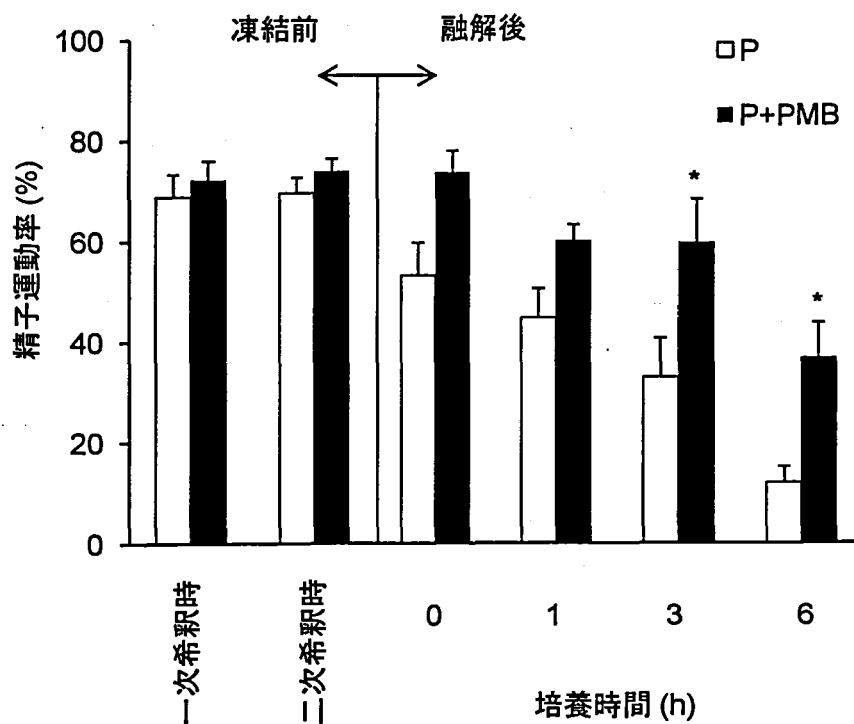


図6. PMB処理が凍結前および融解後の精子運動率に及ぼす影響

Penicillin G 200000 U/mlとPolymyxin B 100 µg/mlを前処理液および凍結希釈液へ添加して凍結した。Penicillin Gのみを添加した区 (P) を対照区とした。

P; Penicillin Gを凍結前処理液及び凍結希釈液に200000 U/ml添加し、凍結した。

P+PMB; Penicillin G 200000 U/ml, Polymyxin B 100 µg/ml添加し、同様に凍結した。

* (P<0.05)

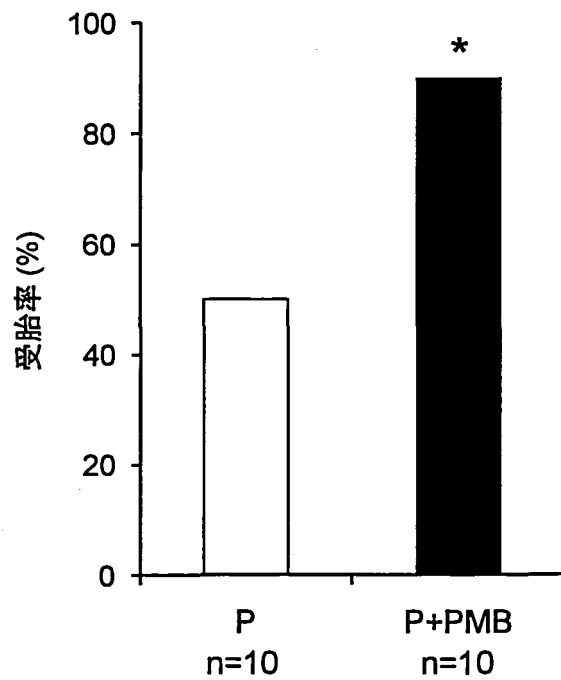


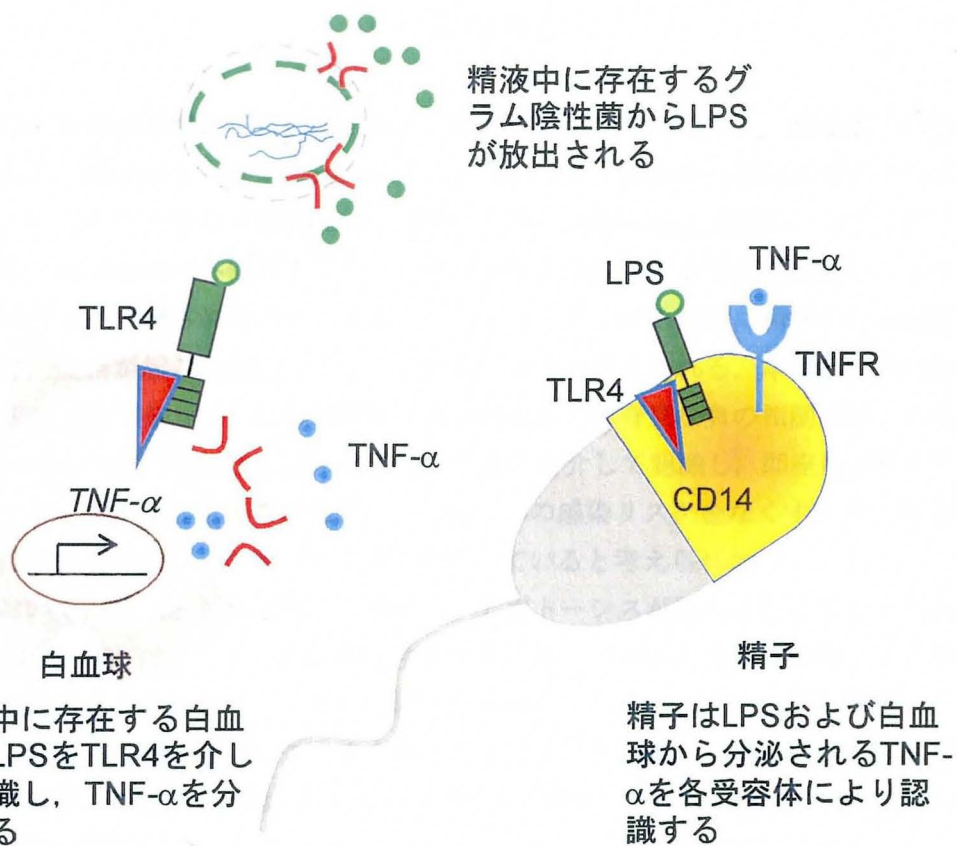
図7. PMB処理して凍結した精子を用いた人工授精による受胎率

人工授精は雌ブタの発情発見直後, その12および24時間後の3回行った. 精子数 50×10^8 sperm/50ml注入した.

P; Penicillin Gを凍結前処理液及び凍結希釈液に200000 U/ml添加し, 凍結した.

P+PMB; Penicillin G 200000 U/ml, Polymyxin B 100 μ g/ml添加し, 同様に凍結した.

* ($P < 0.05$)



Penicillin G添加凍結希釈液を用いた凍結処理法 (既存法)

Penicillin G+PMB添加凍結希釈液を用いた新規凍結処理法

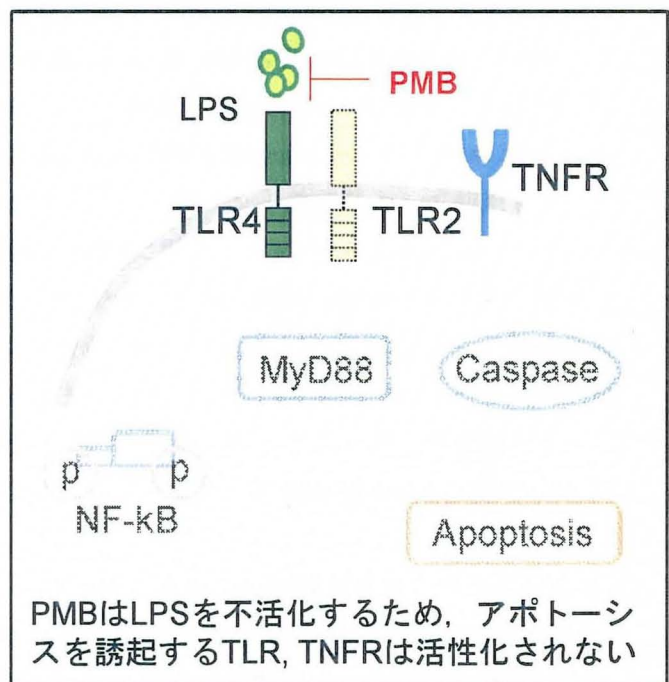
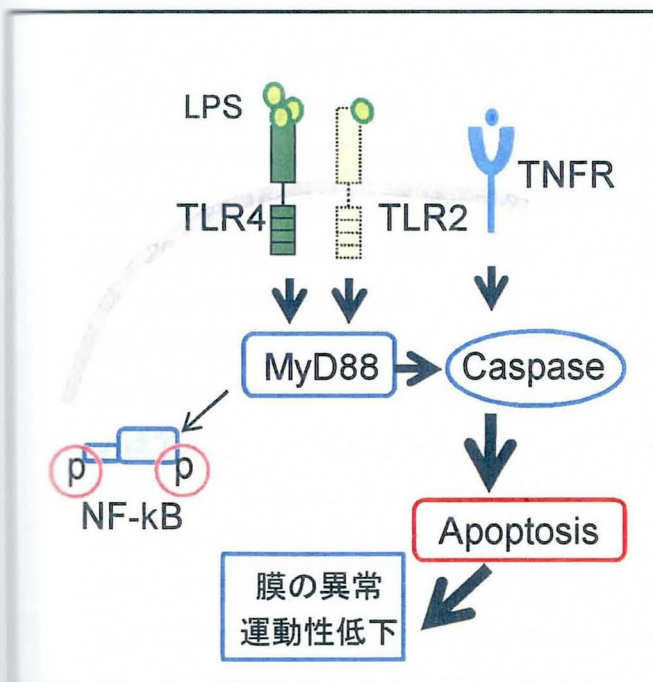


図8. 精子のLPSに対する自然免疫能を考慮した新しい精子凍結処理法

総合考察

細菌感染した精液が雌の子宮内へ入ると、雌生殖器道内のみでなく、胚あるいは胎子への感染が懸念される (Philpott, 1993; Rank et al., 2003). また、排卵から着床が起こる時期までは子宮内の免疫力は低いことから (Wira et al., 2005; Wira and Fahey, 2008), 自然交配時に細菌が感染した精液が雌の子宮内へ侵入すると、子宮内で細菌が繁殖する可能性が高い。したがって、初期胚が感染リスクに曝されることとなる。このリスクを下げるには、精液中に細菌感染が起こっている場合、受精が起こらないシステムが必要であると考えられる。本章第一節において、精液中には細菌が多数存在し、これら細菌数と精子運動率には有意な負の相関関係があること、精子はこれら細菌の病原性破片を TLR4 あるいは TLR2 を介して認識し、即座に運動率を著しく低下させることを明らかとした。この結果から、胎子への感染リスクをなくすため、精子は TLRs による自然免疫能を保持し、体内での受精を制御していると考えられた。

本章において、TLRs が活性化した精子は、アポトーシスが誘起されることを明らかとした。Borini et al. (2006) は、アポトーシス陽性率の高い精子 (>10%) を体外受精により受精させると、正常な胚発生が阻害されること、これらの胚を移植しても妊娠しないことを報告した。さらに、Lewis and Aitken (2005) は、このようなアポトーシスを誘起した精子により作出した胚の発生停止や胚移植後の妊娠率低下は、アポトーシスに起因する父性ゲノムの異常が原因であることを、DNA が損傷した精子を ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) する手法を用いて主張している。これらの報告と本章の結果(細菌感染した精液中の精子はアポトーシスを誘起していること)から、父性ゲノムの異常による胚発生への悪影響が起こると考えられた。父性(精子)ゲノムは、DNA のメチル化やヒストンのアセチル化により遺伝子発現の制御を受け、胚発生に必要な遺伝子発現パターンを整えている (Mayer et al., 2000; Oswald et al., 2000; Bourc'his et al., 2001)。個体の発生に必須な父性側のインプリント遺伝子として、insulin-like growth factor 2 (*Igf2*) や delta-like protein 1 (*Dlk1*) があり (Surani and Barton, 1983; Barton et al., 1984; McGrath and Solter, 1984), これらは、ブタ個体の発生においてもインプリント遺伝子として作用し (Li et al., 2008; Park et al., 2009), 胎盤形成や胎子発育に密接に関与している (Latham et al., 1994; Constância et al., 2002)。以上のことから、自然交配や人工授精において、細菌感染した精液が体内で非常に低い妊娠率を示す原因は以下のように考えられる。①精子は TLR を介して運動率を低下させることで、受精する確率は低い。②このような環境で受精した場合でも、その父性ゲノムはアポトーシスに起因する DNA の断片化が生じているため、胚の発生が停止する、もしくは着床できずに個体の発生が阻害される。という二重のシステムにより細菌感染に起因する異常胎子の出現を防御していると考えられた。

このように、体内においては精子の TLR 系は、生物学的に重要な役割を果たすと考えられるが、生殖工学では人工的に体外で精子を保存あるいは利用するため、TLR 系が精子の機能性を抑制し、その利用効率を低下させる要因となりうる。すなわち、凍結精液作製過程において、体外で数時間精子を培養するため、細菌感染した精液においては凍結前に精子が機能性を失っていると考えられ、細菌を死滅させるだけでなく、精子の TLR を活性化させない処理が精子を正常に凍結する

ために必要であると考えた。本章第二節において、LPS 阻害剤である PMB は LPS による精子アポトーシスおよび運動率低下を抑制可能とすること、100 $\mu\text{g/ml}$ の PMB は精漿中 LPS を完全に不活化すること、液状精液保存、あるいは凍結前処理液および凍結希釈液へ PMB を添加することで、長期保存後、あるいは融解後の精子運動率を向上できることを示した。ブタ凍結精子において、多くの融解精子はアポトーシスを誘起していることが Silva and Gadella (2006) により報告されていることから、既存の凍結処理過程 (penicillin G 単独処理) では、LPS による caspase-3 依存性のアポトーシスと LPS による細胞膜の異常が同時に生じているため融解後の運動率が低下し、PMB 処理はこれらを回復させたと考えられた。さらに、精子凍結過程の PMB 処理による精子アポトーシスの抑制は、前述したとおり、父性ゲノムの正常性を保ち、受精後の正常な胚発生や着床を可能とすると考えられ、第二節で行った人工授精による受胎率および一腹産子数の改善は、融解後の運動率向上と共にこれらの要因による結果であると考察された。

以上の本章の結果から、精子は TLR を介して病原体に対する自然免疫能を保持していることから、精液中の細菌およびその病原性破片がブタ精子の機能性を制御していることが明らかとなった。この成果から、精子凍結処理過程で LPS 活性を阻害する PMB を凍結前処理液および凍結希釈液へ添加すると、精子の TLR2/4 の活性化が抑制され、融解後の精子機能性と受精能が高まるという新しい精子凍結手法を確立するに至った (図 8)。

要約

精液中の細菌感染は雄個体の精子機能性低下を起し、妊娠率の低下を招く。マクロファージなどの免疫細胞は、その細胞膜に発現するTLRs (toll-like receptors) を介してLPS (lipopolisaccharide) など、細菌の病原性破片を認識することが知られている。近年、免疫細胞だけでなく、体細胞においてもTLRsによる免疫能を保持していることが示された。そこで、精子においても細菌が放出するLPSなどの病原性破片を、TLRsを介して直接的に認識していると推察した。本章第一節では、精子におけるTLRsの発現および機能を解明するため、実験1では、22個体の精液を回収し、細菌検査を行い、その細菌数と種を同定した。また、それぞれの個体についての細菌数と精子運動率との相関関係を求めた。その結果、精液中の細菌数は、0~12,000 CFU/mlの範囲で検出され、その多くは*Pseudomonas aeruginosa*, *E. Coli*などグラム陰性菌であった。この細菌数と精子運動率には、精子培養3時間で有意な負の相関関係が認められた ($R^2=0.279$)。精液中の細菌の多くがグラム陰性菌であることから、精漿中のLPS濃度をリムルス試験にて検出した。精漿中には血漿の10倍以上の濃度のLPSが検出され、その値はブタ個体間で大きな差が認められた。そこで、精子におけるTLRsの発現と機能解析を行うため、実験3として、RT-PCR, Western BlottingおよびImmunofluorescence法を用いて、LPS受容体であるTLR4 (*Tlr4*) とそのco-receptorである*Cd14*, およびグラム陽性菌の病原性破片であるポリペプチドの受容体であるTLR2 (*Tlr2*) の精子における発現と局在を検出した。実験4では、精子培養液にLPSあるいはTLR2のリガンドであるPam3Cysを添加し、精子の運動率、生存率、先体膜損傷率、cleaved-caspase-3の活性およびアポトーシスについて検討した。TLRsの発現と局在の解析結果から、精子にはTLR4 (*Tlr4*), *Cd14*, およびTLR2 (*Tlr2*) が遺伝子またはタンパク質レベルで発現し、これらは、精子先体部および中片部に強く局在していることが明らかとなった。また、LPSあるいはPam3Cys添加培地で精子を培養すると、その濃度依存的に運動率、生存率および先体膜正常率が著しく低下した。これらの精子では、cleaved-caspase-3を介したアポトーシスを誘起していた。LPS添加培地で培養した精子は、TLR4シグナルの下流に存在するタンパク質であるNF- κ Bをリン酸化することから、これらのLPSによる反応はTLR4を介した特異的な反応であることが示された。

以上の第一節の結果から、精子はLPSにより機能性が失われることが明らかとなったことから、第二節では、LPS不活化剤であるpolymyxin B (PMB) の影響について検討した。さらに、それが凍結精液作製に応用可能か否かについても検討した。実験1では、LPS存在下において至適PMB濃度を検討するため、50, 100および200 μ g/mlのPMBを培地へ添加し、精子運動率およびcaspase-3の活性化およびannexin-V assayを用いたアポトーシスの検出を行った。その結果、100 μ g/mlのPMBは、LPSによるcaspase-3活性化およびアポトーシスを有意に抑制し、長時間の運動率維持を可能とした。このPMB濃度を用いて液状精液を作製し、その運動率を経時的に測定した(実験2)。抗生物質無添加およびpenicillin G単独添加した液状精液の精子と比較して、PMB+penicillin Gの複合処理した区の運動率は、有意に高い値を維持した。この精液を用いた人工授精においても、PMBとの複合処理で、penicillin G単独処理と比較して高い受胎率と一腹産子数が得られた。そこで、実験3として、100 μ g/mlのPMBを凍結前処理液および凍結希釈

液へ添加し、精子凍結処理に有効か否かを検討した。その結果、PMB+penicillin G 複合処理は、凍結融解後の精子運動率を有意に向上させ、人工授精による受胎試験においても、受胎率は90%、平均一腹産子数は9.1頭と高い繁殖成績を示した。

以上本章の結果をまとめると、

1. 精液にはグラム陰性菌および陽性菌がともに存在するが、その多くはグラム陰性菌であること
2. 精漿中から LPS が検出されること
3. LPS・TLR4 および Pam3Cys・TLR2 系は精子膜の異常および caspase-3 依存的にアポトーシスを誘起し、その結果、精子の運動率を著しく低下させること
4. 精液への PMB 添加は、LPS 活性を阻害し、精子の caspase-3 依存的なアポトーシスを抑制し、その結果、精子は高い運動率を保持すること
5. 以上の基礎的な知見から、凍結前処理液および凍結希釈液へ PMB を添加することは、融解後の精子機能性を改善し、これらの凍結融解精子を用いた人工授精において高い繁殖成績が得られる

という個体の耐凍能を考慮した新しい凍結処理法の開発に成功した。

第四章：耐凍能の低い個体の精子を凍結可能にする

新規凍結融解処理法の開発

序論

本研究の第三章で、多くのブタ個体において、精漿中にグラム陰性菌が存在し、それが放出する LPS が精子の機能性に負の影響を与えていることを明らかとした。この知見から、採精直後に精子を LPS 阻害剤である PMB 添加液で処理することにより、融解後の精子運動率と人工授精における受胎率向上に成功した。しかし、この LPS を抑制する方法においても融解後の運動率や人工授精の成績が改善されない個体も存在した。細菌検査した 22 頭の内、3 頭の雄ブタにおいて 3000 CFU/ml のグラム陽性菌が精漿中から検出されたこと、グラム陽性菌はポリペプチドあるいはペプチドグルカン等の病原性破片を分泌すること、実際、TLR2 のリガンドである Pam3Cys は LPS と同様に精子の膜の異常やアポトーシスを誘起し、運動率を著しく低下させたことから、PMB 処理でも精子の運動率あるいは人工授精後の受胎率が改善されない上記の問題は、グラム陽性菌の病原性破片であると推察された。しかし、グラム陽性菌の病原性破片を不活化する抗生物質は現在のところ存在しない。さらには、重度の感染個体では、精液中に蓄積した白血球が分泌する TNF- α が精子の運動率を低下させることも考えられる。この TNF- α を抑制する処理には、中和抗体を用いる必要があり、ブタの精液処理では低コストで実施することは困難である。

また、Zeng and Terada (2001) は精漿中コレステロールを methyl- β -cyclodextrin (M β -CD) によって除去後に精子を凍結すると、融解後の運動率および先体膜正常率が向上することを報告している。また、精漿と精子処理液との混合は、溶液中の pH を酸性に傾ける、あるいは、精子間の頭部間凝集を促進させることで精子の機能性を低下させることも知られている (Althouse et al., 2000; Bollwein et al., 2004)。さらに、Kawano et al. (2004) は、ミニブタにおいて、採精後に精漿を直ちに除去し、精漿に長時間暴露されていない精子を凍結すると、体外受精の卵子内精子侵入率が向上することを示している。このことから、採精直後に精漿を除去することは、精子を精漿中のグラム陽性菌の病原性破片およびその他の精子に対して負に作用する因子の影響から回避して、凍結することを可能にする有効な手法であると考えられる。

一方、Robertson (2007) は、ラットおよびブタにおいて、雌子宮内への精漿注入は、コントロールとして PBS を注入した個体と比較して、子宮粘膜細胞におけるサイトカインおよびケモカイン遺伝子の発現量を増加させ、その結果、着床が促進されると主張している。また、O'Lealy et al. (2004) も、ブタの人工授精時に子宮内へ精漿を注入することが、人工授精後 7 日目の胚の発達を正常に保つと報告している。このように、精漿には人工授精後の着床を促進する作用も有すると考えられる。

既存のブタ凍結精液作製過程においては、冷却時に精子は数時間精漿の存在下で凍結されるのが一般的であるが、以上のような精漿の相反する機能を考慮すると、

① 個体間の耐凍能の差を最小限とするため、採精直後に精漿除去して凍結する

② 融解時に精漿を精子に曝した後、人工授精を行う

という精漿に着目した2ステップ凍結融解処理法が、凍結精液を用いたブタの人工授精において、より高い成功率をもたらすと推察したが、これまで精漿の相反する作用を考慮した凍結精液の作製とそれを用いた人工授精法に関する報告はない。

そこで本章では、考案したプロトコールが個体間の耐凍能の差を少なくすることで、凍結精液を用いた人工授精を実用化技術とすることができるか否かを明らかとするため、実験1では、20頭の雄ブタを人工授精後の受胎率を指標に耐凍能の高い個体と低い個体に分類し、それぞれにおいて採精直後の精漿除去が凍結融解後の精子運動率および体外・体内受精能に及ぼす影響を検討した。次に、精液の融解液への精漿添加が融解後の精子機能性に及ぼす影響を解析し、さらには、人工授精による受胎試験を行い、着床率および一腹産子数に及ぼす影響についても検討した。

材料および方法

精子の運動率測定, 体外受精, 先体膜損傷率, 人工授精, 受胎の確認と着床率の算出, および統計処理は第二章と同様に行った.

ブタ

大分県農林水産研究センターにて飼養しているランドレース, 大ヨークシャーおよびデュロックの雄ブタ (12~36 ヶ月齢) 20頭を用いた. 人工授精を行うための雌ブタはランドレース種 (12~36 ヶ月齢) を使用した. ワクチンプログラムは第二章と同様に行った.

精子の凍結融解方法

基本的な凍結方法は第二章に準じて行ったが, 本章においては, 本研究第二章と第三章までに得られた方法を適応した. 概要は以下のとおりである.

- ① 濃厚部精液採取直後に希釈する前処理液に 100 $\mu\text{g/ml}$ の PMB を添加した.
- ② 凍結用第一希釈液 mNSF-1 は浸透圧 400 mOsm/kg の高張条件にした.
- ③ 凍結用第一希釈液 mNSF-1 に 100 $\mu\text{g/ml}$ の PMB を添加した.
- ④ 凍結用第二希釈液 mNSF-2 の最終 glycerol 濃度は 2% として, 精子を凍結した.

融解方法は第二章と同様に行った.

精子の培養

凍結融解精子の運動率および先体膜損傷率を測定するため, 融解した精液 0.5 ml を 4.5 ml の Modena solution と混合し, 6 時間まで培養した. 融解後の精子の capacitation (タンパク質のチロシン残基のリン酸化) の検出は, Modena solution から capacitation を阻害する EDTA-2Na を除去し, HCl にて pH 7.1 に調整した融解液で培養した.

精子 Capacitation (タンパク質のチロシン残基のリン酸化) の検出

EDTA-2Na を除去した Modena solution で培養した精子をエッペンドルフチューブに回収し, Laemmli sample buffer を精子ペレットに 20 μl 添加した後, 超音波処理により精子を溶解した. サンプルを 100°C, 5 分間サーモブロックで加熱し, 10% SDS-polyacrylamide gel の各レーンそれぞれに 20 μl (1×10^6 sperm/lane) アプライした. タンパク質チロシン残基のリン酸化は anti-phosphotyrosine antibody (P-Tyr-100, 9411, Cell Signaling, 1:5000) を用いて検出した. Western Blotting 法の方法は第三章に準じて行った.

精漿の準備

精液を回収後, 800 x g, 10 分間遠心分離を行い, 精子を除去した. 分離した精漿に 200,000 U/l penicillin G および 100 $\mu\text{g/ml}$ PMB を添加した. 精漿は膠様物と細菌を除去するため, 5°C で 2 時間放置し, その後, 8,000 x g, 30 分間遠心分離した. 得られた上清みは融解液に添加するまで, -20°C

で保存した。

精漿回収用の精液は、液状精液による人工授精で受胎率80%以上、産子数10頭以上の繁殖成績を示す雄ブタから回収した。

実験計画

【実験 1】耐凍能の分類 (Good または Poor) とそれぞれの融解後運動率との関係

実験 1 では、雄ブタ 20 頭を耐凍能の高い個体 (Good freezability; GF) と低い個体 (Poor freezability; PF) に分類した。第二章で用いた凍結手法 (冷却時に精漿と共培養) を用いて 20 頭の雄ブタ精液を凍結し、各雄ブタ精液を 3 頭の雌ブタに人工授精した。3 頭の雌ブタの内 1 頭でも受胎した精液の雄ブタを GF とし、全く受胎が認められなかった精液の雄ブタを PF と定義した。個体の耐凍能を分類後、GF および PF 個体それぞれにおける融解後運動率を比較した。

【実験 2】採精直後の精漿除去が凍結融解後の精子運動率、体外および体内における受精能に与える影響

実験 1 で分類した GF および PF 個体それぞれについて、採精直後の精漿除去が融解後の精子の運動率および受精能を改善可能か否かについて検討した。精子濃厚部を採取後 15 分以内に遠心分離 (800 x g, 10 分間) にて精漿を除去し、自己の精漿と前処理液を添加したものを対照区 (C; Control) とし、前処理液のみ添加したものを精漿除去区 (rSP; removal seminal plasma) とした。両処理区における融解精子の運動率を経時的に測定し、また、体外受精を行った。

精漿を除去して凍結した精子の体内における受精能を確認するため、44 頭の雌ブタに PMSG-hCG 処理を施し、人工授精を実施した (C; 21 頭, rSP; 23 頭)。同様に液状精液による人工授精による受胎率も確認した。

【実験 3】融解液への精漿添加が融解後の精子機能性および人工授精後の着床および妊娠成立に及ぼす効果

実験3では、融解液へ精漿を0, 5, 10および20% (v/v) 添加し、その融解後の精子運動率、先体損傷率を測定した。また、至適精漿濃度を添加した融解液を用いて融解精子を人工授精し、その後の着床部位数および受胎率、さらには一腹産子数、生存産子数などの繁殖性を検討した。

結果

【実験1】雄ブタ20頭をGFおよびPF個体に分類する目的で、従来法を用いて20頭の雄ブタ精液を凍結し、各雄ブタ精液を3頭の雌ブタに人工授精した。3頭の雌ブタの内1頭でも受胎した精液の雄ブタをGFとし、全く受胎が認められなかった精液の雄ブタをPFと定義した。その結果、GF個体が13頭、PF個体が7頭に分類された。GFおよびPF個体それぞれから3回精液を採取し、精子を凍結保存した。それぞれの融解後の精子運動率はGF個体の精子において、全ての培養時間で有意に高い値を示した(表1, 1h; $P < 0.01$, 3h; $P < 0.01$, 6h; $P < 0.05$)。PF個体の精子では、融解後1時間でその運動率はわずか31%であった。したがって、GFおよびPF個体の精子間では、融解後の運動率に有意な差があることが示された。

【実験2】GFおよびPF個体それぞれについて、採精直後の精漿除去が融解後の精子の運動率および体外受精率に及ぼす影響について検討した。GF個体においては、精漿除去法はわずかに融解後の精子運動率およびそれをを用いた体外受精率を増加させたが、いずれも対照区と比較して有意な差は認められなかった(表2)。しかし、PF個体においては、精漿除去することにより、融解後の精子運動率を有意に改善した($P < 0.01$)。さらに、対照区の精子を用いた体外受精率は26%と低いものであったが、精漿除去法により作製した精子においては75%へと著しく向上した($P < 0.01$)。この結果から、採精直後の精漿除去はPF個体において、融解後の精子の運動率を向上させるために必須であることが明らかとなった。

しかし、PMSG-hCG処理を施した雌ブタ23頭に精漿を除去して凍結した精子を人工授精した結果、3頭しか受胎せず、受胎率はわずか9%であった(表3)。雌ブタに注入したこれらの精子の運動率はGF個体の融解精子のそれと同程度の高いものであったことから、運動性以外の精子機能が精漿除去することによって変化したと推察した。

そこで、精子capacitationの指標であるタンパク質のチロシン残基リン酸化をanti-tyrosine antibodyを用いてWestern Blottingにより検出した。さらに、FITC-PNAを用いた免疫蛍光染色法にて先体の損傷を判別した。リン酸化チロシンのバンドはおおよそ40 kDa付近と15 kDaに検出された(図1A)。40 kDaのリン酸化チロシンバンドは処理区間で差が認められず、15 kDaに検出されたバンドは、精漿除去法にて作出した精子において陰性コントロールの射出精子および対照区と比較して強く検出された。このことから、15 kDaのバンド(p15)をcapacitationの指標となるリン酸化チロシンバンドであると判定した。このバンドが精漿除去法で作出した精子においてのみ融解直後から検出されたこと、先体損傷率が融解後の培養1時間で有意に増加した(図1B)ことから、精漿を除去して凍結する手法は、融解精子において、融解過程で自発的にcapacitationと先体反応(acrosome reaction)が生じ、先体が損傷しているため、体内での受精能を失っていると考えられた。

【実験3】精漿除去法にて作出したPF個体の精子を用いた人工授精の低受胎の原因が、融解後の精子で起こるcapacitationであると考えられたため、これを抑制することを試みた。精漿は精子

のcapacitationを抑制する役割があることから、融解液へ精漿を0, 5, 10および20% (v/v) 添加してリン酸化チロシンおよび先体の損傷を検出した。15kDaに認められたバンドの濃さは、精漿濃度依存的に低下し、10% (v/v) の精漿を融解液へ添加することで精子融解後の培養3時間においてもほとんど検出されなかった(図2A)。また、先体反応誘起率においても、精漿を10および20% (v/v) 添加した融解液で全ての培養時間で有意に低下した(図2B, $P < 0.01$)。精漿を添加した融解液を用いて凍結精子を培養した結果、精子運動率は精漿の有無に影響されなかった(図2C)。

これらの結果から、PF個体の精子を凍結可能にするため採精直後に精漿を除去して凍結すること、融解後の精子capacitationを抑制するため融解液へ精漿を10% (v/v) 添加するという新規凍結融解処理法(2ステップ凍結融解処理法)を考案した。この考案した手法がPF個体における凍結融解精子の人工授精後の繁殖性を向上するか否かを検討した。

PMSG-hCG処理を施した雌ブタ47頭に、本手法にて凍結融解したPF個体の精子を注入した結果、受胎率が9%から70%へと向上し、着床部位数が12.3個(精漿無添加融解液にて人工授精した場合; 9.5個)と液状精液のそれと同等の値であった(表4)。さらに、自然発情の雌ブタ129頭を用いた大規模な人工授精試験を実施し、2ステップ凍結融解処理法による人工授精と従来法(精漿と共培養して精子を凍結し、精漿無添加融解液を用いた人工授精)の比較を行った。本実験では、自然発情の雌ブタを使用したため、液状精液の人工授精と同様人工授精は1発情あたり3回の人工授精を実施した。従来法では受胎率42%、総産子数8.3頭、生存産子数7.3頭と非常に低い繁殖性であったが、2ステップ凍結融解処理法による人工授精では、受胎率81%、総産子数10.4頭、生存産子数9.7頭と良好な液状精液を用いた場合と遜色ない繁殖性を示した(表5)。

以上の本章の結果から、採精直後に精漿を除去して凍結し、精漿含有融解液を用いて凍結精子を融解し、人工授精することは、個体間の耐凍能の差を最小限にでき、いずれの個体においても高い繁殖性が期待できる有効な手法であることが立証された。

考察

Pursel et al. (1972, 1973) は、ブタ精子の凍結において、採取した射出精子を凍結前に数時間、室温で精漿にさらすと、温度障害に対する抵抗性が上昇し、 -5°C に冷却後の精子運動率および先体膜正常率が高まることを見いだした。精子を $15^{\circ}\text{C}\sim 0^{\circ}\text{C}$ へと冷却する過程で、精子膜の構造変化が起こることが知られている (Hinkovska Galcheva et al., 1989; Buhr et al., 1994)。精子膜を構成するリン脂質の崩壊、乖離あるいはコレステロール：リン脂質比の変動が冷却により誘起され (Plummer and Watson 1985; Muller et al., 1999; Parks and Lynch, 1992)、その結果、融解後の精子膜の機能性や運動率の低下が起こると考えられている (Parks and Graham 1992; Bailey et al., 2000)。したがって、精漿の役割として、精子膜の流動性を抑制し、細胞膜の安定化を担っているという仮説がある (Carlini et al., 1997; Arienti, et al., 1998)。これらの報告から、ブタ精子の凍結前処理には精漿と前培養する方法が一般化されている (Barbas and Mascarenhas 2009)。

しかし、Eriksson et al. (2001) は、凍結過程で精子を精漿と20時間共培養すると融解後の精子運動率が低下するという、上記の仮説に反する結果を報告した。本章の実験2において、GF個体の精子においては、採精直後の精漿除去は、融解後の精子運動率を低下させず、体外受精における受精能にも影響を及ぼさなかった。さらに、PF個体においては、精漿除去により凍結融解後の精子運動率が有意に向上し、これらの精子はGF個体のそれと同等の体外受精能を有していた。精漿成分は個体間で異なること (Borg et al., 1993)、精漿を除去して異なる個体の精漿と置換して精子を培養すると精子の運動率は変動することから (Caballero et al., 2004)、PF個体の精漿が精子の正常な凍結を阻害していると考察される。第三章における細菌の病原性破片は原因の一つと考えられるが、グラム陽性菌のそれを不活化する抗生剤はない。これらの報告と本章の結果から、ブタ精子の凍結過程において、精漿は必要なく、採精直後に精漿を除去して凍結することは、PF個体の精子を安全にかつ正常に凍結するために必須なプロトコールであると結論づけられた。

しかし、精漿除去して凍結したPF個体の精子を人工授精に用いた時、受胎率は9%と著しく低い結果であった。融解過程における急激な温度変化 ($-196\rightarrow 37^{\circ}\text{C}$) は精子膜の構造変化や流動性を亢進し、融解後に大多数の精子に自発的なcapacitationを誘起させる (Bailey et al., 2000; Watson., 2000)。この自発的なcapacitationは、冷却や凍結刺激によって起こることから、受精能獲得様現象 (capacitation-like change; cryo-capacitation) と呼ばれている。自発的capacitationを誘起した精子は、その後、先体反応と呼ばれる精子膜と先体膜の膜融合により、先体内の内容物を分泌させる現象を起こし、卵子と結合する以前に、受精に必要な因子を失っていると考えられる (Florman and First 1988)。本章における精漿を除去して凍結した精子は、融解直後からcryo-capacitationを誘起しており、さらに、培養初期で先体反応に起因する精子先体の欠損が起こっていた。これが原因で融解後の運動率は高いが、子宮から卵管へ移行する過程で受精能を失ってしまうため、人工授精による受胎率が低かったと推察された。

精漿に曝されている精子は、capacitationが抑制されること (Davis and Niwa, 1974; Kanwar et al., 1979)、精漿にはヒト精子の先体反応を阻害する作用もあること (Cross., 1993) から、融解液へ精漿を添加することが、凍結融解刺激に起因するcapacitationと先体の損傷を抑制できると仮

説を立てた。

本章において、融解後に起こるチロシン残基のリン酸化および先体反応に起因する先体の欠損は、融解液に10% (v/v) の精漿を添加することで効果的に抑制することに成功した。これにより、PF個体の精子を、融解後の運動率を低下させることなく、かつ、受精能を保持した状態で融解可能となった。考案した2ステップ凍結融解処理法により凍結・融解した精子を用いた人工授精では、精漿無添加融解液による人工授精と比較して胎子の着床が促進され、受胎率や繁殖性も大きく改善された。

Larsson et al., (1976) は融解液に精漿を添加してブタ精子を人工授精すると、精漿無添加融解液にて人工授精した場合と比較して、卵管内での受精率には影響しなかったが、受胎率が向上することを示した。また、O'Leary et al. (2004) は精漿中に存在するtransforming growth factor- β (TGF- β) が子宮粘膜に作用し、胚の発生に必要なサイトカインおよびケモカインmRNAの発現を上昇させると報告した。したがって、融解液への精漿添加は凍結融解精子の体内での受精能を保持させる以外に子宮にも作用し、妊娠成立を促していると考えられる。

2ステップ凍結融解処理法はPF個体の凍結融解に有効であることが示されたが、精漿成分は個体間のみでなく、同一個体の射出間あるいは季節でも異なる (Bollwein et al., 2004)。そのため、凍結前にGFとPFに分類することができない。したがって、2ステップ凍結融解処理法をPF個体のみでなくGF個体にも適応する必要がある。採精直後の精漿除去はGF個体の融解後精子運動率に悪影響を及ぼさなかったことから、GF個体においても本手法は実施可能である。実際、全ての雄個体の精液を2ステップ凍結融解処理法により人工授精した結果、受胎率は81%と非常に高い成績が得られている。

以上の本章の結果から、採精直後に精漿を除去して凍結し、10% (v/v) 精漿含有融解液で精子を融解することは、PF個体の精子の体内での受精能を高く保持させる有効な手法であることが示された (図3)。

要約

ブタ個体間で精子凍結に対する耐凍能の違いが存在し、このことが凍結精液による人工授精の実用化を妨げている。ブタ精子の凍結過程において、採精後の精子は精漿と数時間共存し、冷却することにより、精子膜が安定化する結果、融解後の精子の機能性が向上することが知られている。これらの知見から、ブタ精子を凍結する際には、精漿の混在下で凍結する手法が一般化されている。しかし、精漿にはコレステロール、精子凝集因子 (agglutinin)、pH 変動因子など精子機能性やその凍結を負に制御する様々な因子が含まれている。本研究、第三章においても、精液中の細菌数は個体毎に差異があること、細菌数が多い個体の精漿にはグラム陰性菌から放出される LPS (エンドトキシン) が含有していること、精子には LPS を認識する TLR4 (toll-like receptor 4) のみでなくグラム陽性菌の病原性破片も認識しうる TLR2 も発現し、精子のアポトーシスや運動率低下を誘起することを明らかとした。すなわち、これら精漿中の精子機能性を低下させる因子群が、凍結前の精子に作用し、ブタ個体間の耐凍能を左右していると考えられる。

そこで、耐凍能の低い個体において、精子の融解後運動率を向上させるには、採精後、直ちに精漿を除去し、精子を凍結することが必要であると推察し、本章では精子凍結過程における精漿の有無が融解後の精子運動率および体外受精率に及ぼす影響を検討した。実験 1 では、精子を精漿と共培養して凍結する従来法により凍結し、その融解精子を用いた人工授精の受胎率により 20 頭の雄ブタを GF (Good freezability) および PF (Poor freezability) に分類した。GF および PF 個体間で融解後精子運動率に有意な差が認められたことから、PF 個体の凍結融解後の精子運動率を改善する方策の重要性が示された。実験 2 において、採精直後の精漿除去は、GF 個体の融解後精子の運動率および体外受精率に影響を及ぼさなかったが、PF 個体においては、これらの改善が見られた (精子運動率; 30.9% vs 64.5%, 体外受精率; 26.0% vs 74.6%)。しかし、精漿除去法にて作製した PF 個体の精子を用いて人工授精した結果、受胎率はわずか 9% に向上したにすぎなかった。

ブタ精子を凍結融解すると、その急激な温度変化により受精能獲得様現象 (cryo-capacitation) が誘起されることが知られている。一般的に、射出精子において、精漿はその自発的な capacitation, およびその後誘起される先体反応 (acrosome reaction) を抑制し、体内での受精を制御している。本章における精漿除去法により作出した精子を用いた人工授精の低い受胎率の原因は、採精直後に精漿を除去して凍結したことで、融解時に精子の cryo-capacitation が過剰に誘起されたためであると推察された。そこで、実験 3 では、凍結融解過程において精漿と capacitation の指標となる精子タンパク質のチロシン残基リン酸との関係について探求した。その結果、精漿除去法により凍結した PF 個体の精子は、対照区のそれと比較して融解直後から強いチロシン残基リン酸化の濃いバンド (15kDa) が検出された。またこれらの精子の先体損傷率は融解直後では対照区と有意な差は認められなかったが、培養 1 時間で精漿除去法により作製した精子において有意に増加した ($P < 0.05$)。これらの結果から、精漿除去法にて作出した凍結精子は、融解後に高い運動率を示すが、自発的な capacitation と AR に起因する先体の欠損が誘起されることが明らかとなり、これらが人工授精後の低い受胎の原因であることが示唆された。

そこで、これら融解時に起こる現象を抑制するため、融解液へ精漿を添加することを試みた。融解液へ精漿を 10% (v/v) 添加し、精子を融解することで、タンパク質のチロシン残基のリン酸化および AR に起因する先体の欠損が効果的に抑制可能となった。さらに融解液への精漿添加は融解後の精子運動率に影響せず、高い値を維持した。以上の結果から、PF 個体の精子を凍結するには、採精直後に精漿を除去して凍結し、融解液へ精漿を 10% (v/v) 添加して融解する「2 ステップ凍結融解処理法」を行う必要があると考えた。

過排卵処理を施した雌ブタを用いて、本手法により凍結・融解した精子を用いた人工授精を行った。2 ステップ凍結融解処理法により作出した PF 個体の凍結融解精子を用いることで、人工授精後の胚の着床が促進され、受胎率は 70% へと向上した。養豚の生産現場においては、人工授精を行う雌ブタは、自然発情のものを一般的に使用するため、過排卵未処理の雌ブタに本手法で作出した精子を人工授精した。その結果、従来法で作製した精子を用いた人工授精では、受胎率が 42%、産子数 8.3 頭と著しく低かったが、2 ステップ凍結融解処理法で作製したそれは、雌ブタ 64 頭と大規模な人工授精試験であるにも関わらず、受胎率 81%、産子数 10.4 頭と液状精液による人工授精のそれとほぼ同等の高い繁殖性を示した。

以上の本章の結果から、採精直後に精漿を除去して凍結し、10% (v/v) 精漿含有融解液で精子を融解することは、ブタ個体間の耐凍能の差異を解消し、PF 個体の凍結融解精子を用いた人工授精でも十分な繁殖成績が得られる画期的な手法であることが実証された。

表1. Good freezabilityおよびPoor freezability個体における凍結融解後精子運動率

分類	融解後精子運動率 (%)		
	培養時間 (h)		
	1	3	6
GF	69.1±2.0**	48.4±3.8**	17.9±3.4*
PF	30.9±3.1	16.5±3.1	3.0±1.8

各ブタから3回の繰り返し実験を行い, 数値は平均値±SEMで示す

GF; n=13, PF; n=7

* (P<0.05), ** (P<0.01)

表2. 採精直後の精漿除去が融解後の精子運動率および体外受精率に及ぼす影響

処理区	融解後精子運動率 (%)			体外受精率 (%)
	培養時間 (h)			
	1	3	6	
PFC	30.9±3.1 ^a	16.5±3.1 ^a	3.0±1.8	26.0±7.9 ^a
PF rSP	64.5±3.4 ^b	47.1±3.5 ^b	9.6±4.1	74.6±6.5 ^b
GF C	69.1±2.0	48.4±3.8	17.9±3.4	73.9±2.6
GF rSP	73.3±5.8	54.5±4.7	24.1±5.5	78.9±3.5

各ブタから3回の繰り返し実験を行い、数値は平均値±SEMで示す

GF; Good Freezability (耐凍能の高い個体), PF; Poor Freezability (耐凍能の低い個体)

C; Control, rSP; Removal Seminal Plasma (精漿除去法)

GF; n=13, PF; n=7

^{a, b}; 同一欄内の異なる文字間に有意差有り (P<0.01)

表3. 耐凍能の低い個体における精漿除去法の受胎率への影響

処理区	人工授精に用いた 雌ブタの頭数	受胎率 % (受胎頭数/人工授精頭数)
液状精液	15	80(12/15)
PF C	21	0(0/21)
PF rSP	23	9(2/23)

人工授精はeCG-hCG処理した雌ブタに1回行った

人工授精は頸管注入用のカテーテルで行った

PF; Poor Freezability (耐凍能の低い個体)

C; 従来法, rSP; 精漿除去法

表4. 精漿含有融解液を用いた人工授精の受胎成績

処理区	人工授精に 用いた雌ブ タの頭数	受胎率 % (受胎頭数/人工授精頭数)	着床部位数 ¹
液状精液	15	80(12/15)	12.3+/-0.6
PF rSP	23	9(2/23)	9.5+/-1.8
PF 2ステップ 凍結融解処理法	47	70(33/47)*	12.3+/-0.6*

人工授精はeCG-hCG処理した雌ブタに1回のみ行った

人工授精は頸管注入用のカテーテルで行った

PF; Poor Freezability (耐凍能の低い個体) rSP; 精漿除去法

¹ 1頭あたりの雌ブタの子宮内着床部位数

* PFrSPとPF2ステップ凍結融解処理法の両区間で有意差有り (P<0.05)

表5. 2ステップ凍結融解処理法で作製した精子の人工授精における繁殖成績

処理区	人工授精に用いた雌ブタの頭数	受胎率 % (受胎頭数/人工授精頭数)	総産子数 ¹	生存産子数
液状精液	140	81(114/140)	10.9+/-3.1	9.8+/-3.0
従来法	65	42(27/65)	8.3+/-3.3	7.3+/-3.3
2ステップ凍結融解処理法	64	81(52/64)*	10.4+/-3.3	9.7+/-3.3

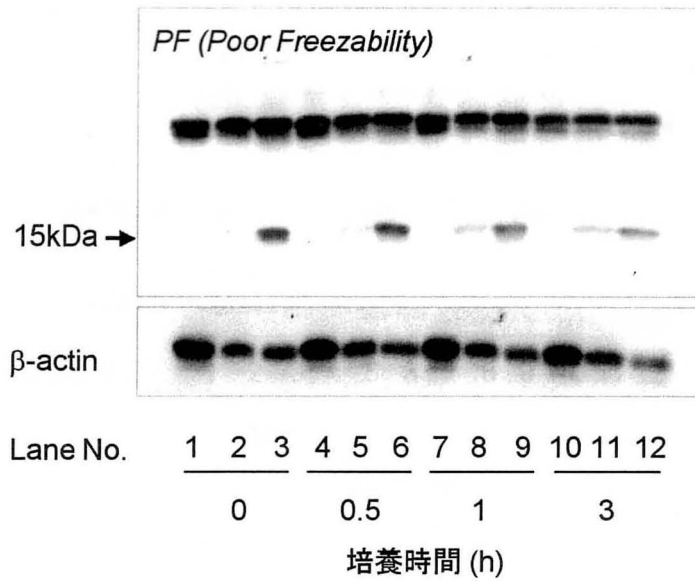
人工授精は自然発情の雌ブタに3回行った

人工授精は頸管注入用のカテーテルで行った

¹ 死産または白子を含め、ミイラおよび黒子は除いて算出した

* 従来法と2ステップ凍結融解処理法の両区間で有意差有り (P<0.05)

A



B

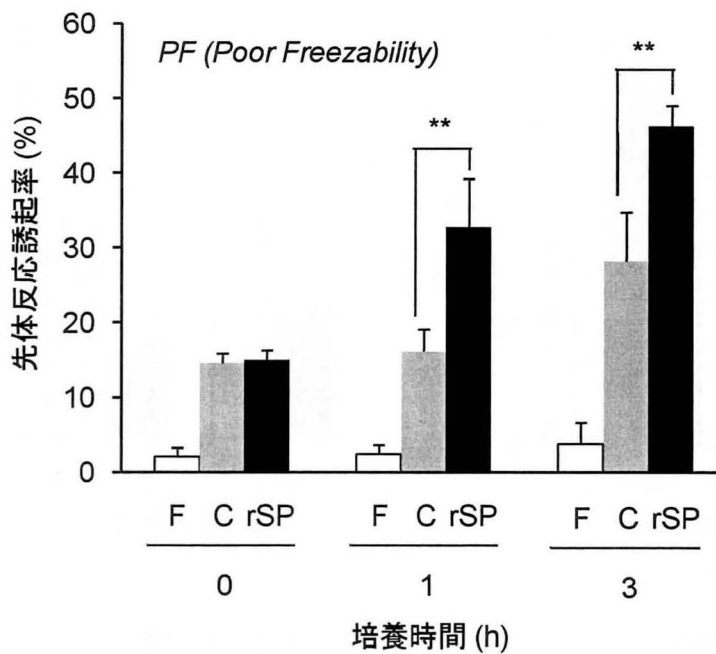


図1. 凍結過程の精漿の存在が融解後精子のタンパク質チロシン残基リン酸化および先体反応に及ぼす影響

A; 既存法 (lane; 2, 5, 8, 11), 精漿除去法 (lane; 3, 6, 9, 12), 陰性コントロールとして射出直後の精子 (lane; 1, 4, 7, 10)

F; 射出精子(陰性コントロール), C; 従来法, rSP; 精漿除去法

** (P<0.01)

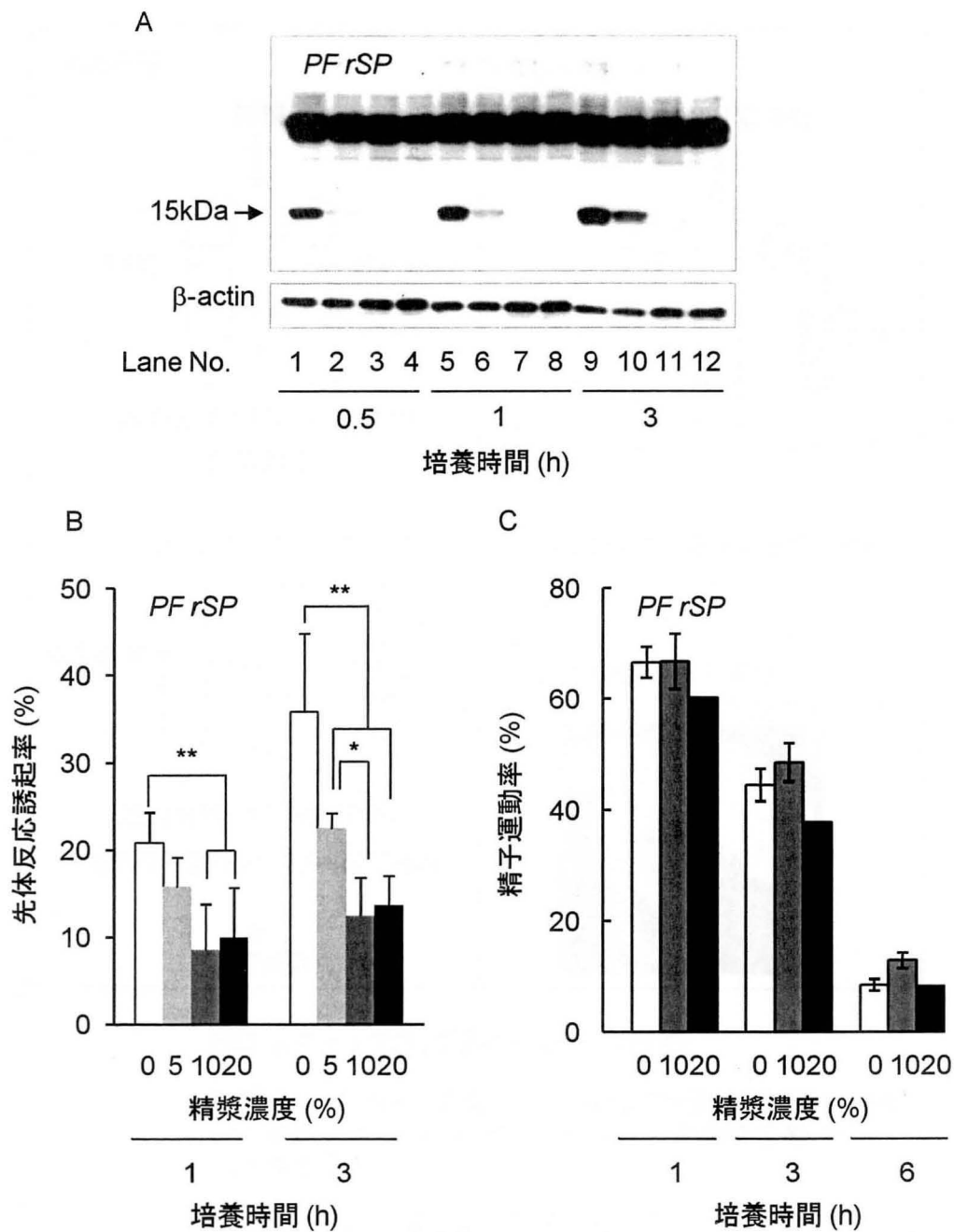


図2. 融解液への精漿添加が凍結融解精子のタンパク質チロシン残基リン酸化, 先体反応および運動率に与える影響

A; 精漿0% (lane; 1, 5, 9), 5% (lane; 2, 6, 10), 10% (lane; 3, 7, 11), 20% (lane; 4, 8, 12)

PF; Poor Freezability (耐凍能の低い個体) rSP; 精漿除去法

* ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$)

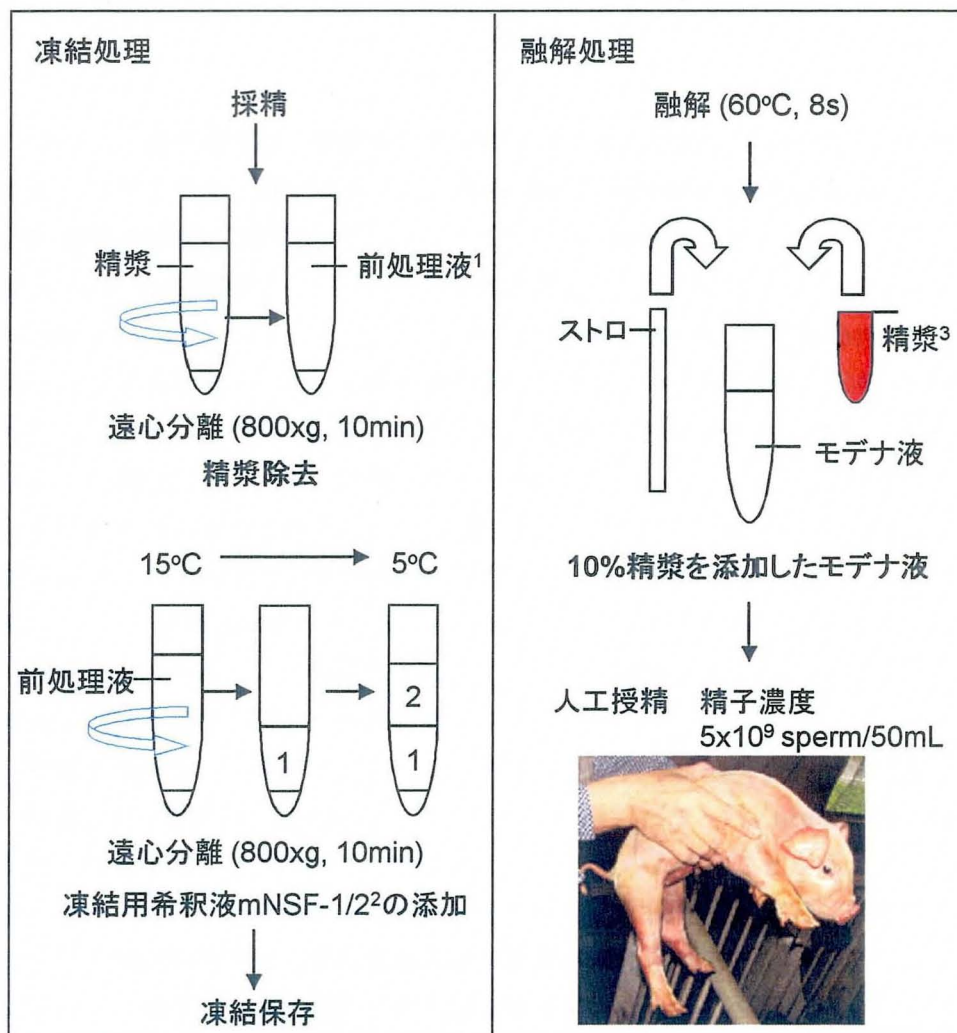


図3. 2ステップ凍結融解処理法の概要

採精後15分以内に精漿除去し、凍結用希釈液mNSF1/2を用いて凍結する。10% (v/v)精漿を添加した融解液を用いて人工授精を行う。

¹ 100 μ g/mlPMB添加前処理液を用いる

²mNSF-1; NSF-1希釈液の浸透圧を400mOsm/kgに調整し、100 μ g/mlのPMBを添加したもの。mNSF-2はmNSF-1に1.5%のOEP及び4%のglycerol(最終glycerol濃度2%)を添加したもの

³ 液状精液による人工授精で80%以上の受胎率を示す雄ブタから採取した

第五章：動物由来物質を含有しない完全合成融解液の開発

序論

現在、我が国の養豚業では、自農場の生産性を改善するため、あるいは、消費者へ安心・安全な畜産物を供給するため、特定疾病フリー農場 (SPF; Specific pathogen-free) が急増している (日本 SPF 豚協会規則). SPF とは、トキソプラズマ、豚赤痢、オーエスキー、マイコプラズマ、萎縮性鼻炎の 5 つの細菌性・ウイルス性疾病に感染していないことをいう (日本 SPF 豚協会; <http://www.j-spf.com/>). さらには SPF に定められてはいないが、近年感染が拡大し、流産、異常出産および子豚発育異常などによる経済損失を増加させている豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRSV)、サーコウイルス II 型 (PCV2) あるいはパルボ (PPV) などのウイルス感染も重篤な問題である (山根ら, 2009; PRRS コントロール事例集, 2007). これらのウイルスが感染したブタにおいて、精液中にもウイルスが検出されることから (Kim et al., 2003; Guérin and Pozzi, 2005), SPF 農家は非感染農場のみからブタ個体や精液を導入するという制約が生じている.

第四章において、融解後に誘起される自発的な capacitation と先体反応 (AR) を抑制するため、融解液へ精漿を添加することの有効性を示したが、この開発技術は SPF 農家をはじめ、高い衛生環境を維持している農場において疾病を蔓延させる恐れがある.

また、精漿を融解液へ添加するためには、精漿を得るために多くの雄ブタを繁殖させる必要があること、精漿成分は季節毎、個体毎によって大きく変動すること (Murase et al., 2007) から精漿含有融解液の性質を安定化させることが困難である. このようなことから、全ての農場で安定的かつ安全に使用可能にするためには精漿の正の作用を示す因子を同定し、融解液に精漿を添加せずとも、同等の機能を有する完全合成融解液の開発が求められる.

前章において、精漿には凍結融解直後に起こる自発的な capacitation と AR に伴う先体損傷を抑制する役割があることを明らかとした. capacitation は精子細胞内の Ca^{2+} の急激な増加によって誘起される (Arnoult et al., 1999; Baldi et al., 2000). この細胞内 Ca^{2+} の上昇は、細胞外からの Ca^{2+} 流入が初期の引き金となると考えられている (Trevino et al., 2004; Wennemuth et al., 2000). この流入した Ca^{2+} は、phospholipase C (PLC) を活性化し、phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) を加水分解し、inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) と diacylglycerol (DAG) を産生し、精子細胞内の Ca^{2+} ストア (貯蔵庫) から Ca^{2+} を放出させ、精子内の Ca^{2+} はさらに増加する (Domino and Garbers, 1988). したがって、精子の凍結融解過程において、精子細胞膜が損傷し、 Ca^{2+} チャンネル非依存的に過剰量の Ca^{2+} が細胞内へ流入し、その結果、capacitation が誘起されていると推察される. しかし、ブタ凍結融解精子の細胞内 Ca^{2+} と capacitation に関する知見は非常に乏しい. したがって、これらの関係を明らかとし、それを抑制する方法を考案することが完全合成融解液の開発に必要であると考えた.

そこで、第五章では、融解後の精子 capacitation および AR による先体損傷を完全に抑制し、人工授精においても高い繁殖成績を示す完全合成融解液の開発を目的とした. 実験 1 では、 Ca^{2+}

含有培地あるいは Ca^{2+} および精漿含有培地で凍結融解精子を培養し、融解時における capacitation および先体損傷が Ca^{2+} に起因するものか否かを検討した。また、実験 2 は、 Ca^{2+} に高い親和性を示す 2 価イオンキレート剤であるグリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA; *O,O*-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-*N,N,N,N*-tetraacetic acid) が細胞内 Ca^{2+} 上昇を抑制するか、さらには、capacitation を抑制しうるかを探求し、融解液へ添加する至適 EGTA 濃度について検証した。実験 3 では、精漿含有融解液と精漿無添加 EGTA 含有融解液をそれぞれ用いて人工授精を行い、卵管内受精率および人工授精後 30 日齢の着床率を比較検討した。

材料および方法

精子の運動率および先体膜損傷率の測定、体外受精、人工授精および受胎率と着床率の算出および統計処理は第二章と同様に行った。精子のタンパク質チロシン残基リン酸化の検出と培地に添加する精漿の準備は第四章に準じて行った。

ブタ

大分県農林水産研究センターにて飼養しているランドレース、大ヨークシャーおよびデュロックの雄ブタ（12～36ヶ月齢）10頭を用いた。人工授精を行うための雌ブタはランドレース種（12～36ヶ月齢）を使用した。種ブタのワクチンプログラムは第二章に従って実施した。

精子の培養

本章実験1の精子 capacitation および先体膜損傷に及ぼす Ca^{2+} の影響の検討は、凍結精液を精子濃度 1×10^8 sperm/ml となるように CaCl_2 を含有あるいは不含 mTBM で希釈し、精子をインキュベーター内で培養した。

Ca^{2+} キレート剤 EGTA の精子 capacitation および機能性に及ぼす影響の検討は、基礎融解液として Modena solution を用いた。Modena solution に各濃度の EGTA (WAKO) を加え、1N の NaOH (WAKO) で pH 7.0～7.2 に調整した。

精子の凍結融解方法

精子の凍結方法には、第四章までに得られた手法を総括し、以下の方法を用いた。

- ① 採精直後に精漿を除去した。
- ② 100 $\mu\text{g/ml}$ の PMB を添加した前処理液で精子を処理し、15°C に冷却した。
- ③ 凍結用第一希釈液 mNSF-1 は浸透圧 400 mOsm/kg の高張条件にした。
- ④ 凍結用第一希釈液 mNSF-1 に 100 $\mu\text{g/ml}$ の PMB を添加し、精子を 5°C まで冷却した。
- ⑤ 凍結用第二希釈液 mNSF-2 の最終 glycerol 濃度を 2% にし、精子を凍結した。

凍結精液の融解方法は第二章と同様に行った。

精子細胞内 Ca^{2+} の検出

凍結精子を最終濃度 1×10^8 sperm/ml となるように Modena solution で融解し、細胞内 Ca^{2+} 検出の30分前に、DMSO で希釈した細胞内 Ca^{2+} 指示薬である Fluo-3/AM (CALBIOCHEM, Los Angeles, CA) を最終濃度 5 μM となるように精液へ添加し、さらに、Pluronic F-127 (Invitrogen) を 1 μl 加えた融解精液を30分間暗室でインキュベート (38°C) した。培養後、800 x g, 1分間条件で遠心分離し、Modena solution で再懸濁し、精子に付着した過剰な Fluo-3/AM を洗浄除去した。精子の洗浄を2回行った後、以下のとおり蛍光顕微鏡あるいはマイクロプレートリーダーで細胞内 Ca^{2+} を検出した。

- ・ 蛍光顕微鏡を用いた精子細胞内 Ca^{2+} の局在観察

Modena solutionで再懸濁した精液をスライドガラスに5 μ l滴下し、その上からカバーガラスを乗せ、G2-Aフィルターを選択した蛍光顕微鏡で観察した。

- ・ マイクロプレートリーダーを用いた精子細胞内Ca²⁺レベルの測定

Modena solutionで再懸濁した精液を、96穴マイクロプレートの各ウェルに200 μ lずつ分注し、488 nmの蛍光波長に設定したオートリーダー (Sanko Junyaku; MR-580, Ibaraki, Japan) を用いて精子細胞内Ca²⁺レベルを測定した。

卵管内受精率の算出

50×10⁸ sperm/50mlの精液を第二章と同様に、PMSG-hCG処理を施した雌ブタへ人工授精で子宮内へ注入後、7日目で雌ブタを食肉公社へ出荷し、生殖器 (卵巣・卵管・子宮) を回収した。子宮内液が漏れ出ないように卵管子宮接合部と子宮頸管を鉗子で止めた生殖器を、30分以内に実験室に持ち帰った。バルーンカテーテル (Fujihira) を卵管子宮接合部から挿入し、滅菌したPBSを子宮内へ注入した。注入したPBSを子宮頸管接合部側から全量回収した。回収したPBSを800 x g, 20分間条件で遠心分離し、上澄みを除去後、胚数をカウントした。また、同一個体の卵巣の黄体数もカウントし、卵管内受精率=子宮内胚数/黄体数×100で算出した。

精漿中サイトカイン・ケモカインの網羅的解析 (Membrane cytokine array)

ブタ血漿と精漿中のサイトカイン・ケモカインの分泌パターンを比較するため、血漿と精漿を回収した。血液の採取および血漿、精漿の回収は第三章第一節に従って行った。サイトカイン・ケモカインの検出は、Proteome Profiler™ Array Human Cytokine Array Panel A (R&D Systems; ARY005, Minneapolis, MN) を使用した。以下にその手順を示す。

1. 2 mlのblocking buffer (buffer 4) が入った4ウェルに各種抗体がコーティングされたメンブランを1時間浸した。
2. 0.5 mlのbuffer 4に0.5 mlの血漿または精漿サンプルを添加した後、0.5 mlのbuffer 5を加え、合計1.5 mlのサンプル混合液を調整した。
3. 15 μ lのantibody detection cocktailをサンプル混合液へ添加し、1時間室温で反応させた。
4. メンブランからbuffer 4を除去後、サンプル混合液を浸し、5°Cで12時間反応させた。
5. Wash bufferにて、メンブランを30分間洗浄し、buffer 5で希釈したStreptavidin-HRPを1.5 mlメンブランに滴下し、30分間室温で放置した。
6. 行程5と同様に洗浄後、ECLを用いて第三章第一節のWestern Blotting法に準じて検出した。

精漿中コルチゾールの検出 (Enzyme Immunoassay; EIA)

EIAを用いたコルチゾール濃度はYoshida et al. (2005) に従って測定した。試験管に50 μ lの超純水、50 μ lの精漿、および3 mlのジクロロメタンを入れ、30分間ボルテックスミキサーで混和した。エバポレーターにて乾燥させた後、assay buffer (0.05 Mホウ酸溶液に0.2% (w/v) BSA (Sigma) と0.1 mg/mlのthimerosal (Sigma) を添加し、1N NaOHでpH 7.8に調整した) にて溶解した。cortisol (Sigma) のスタンダード溶液は0, 0.4, 1.2, 3.7, 11.0, 33.0, 100, 10000 ng/mlの濃度

となるようにassay buffer を用いて調整した。50 μ lのスタンダードあるいは精漿サンプルをanti-rabbit goat antibody (ICN Biomedicals Inc) をコーティングした96穴プレートに分注し、さらに、assay bufferで40,000倍希釈したanti-cortisol-3CMO-BSA IgG (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) および100,000倍希釈したHRP-cortisol conjugate (Cosmo Bio) をそれぞれ50 μ lずつ分注し、2時間室温で反応させた。反応後、PBSで2回洗浄し、発光液 (0.5 mg/ml O-phenylenediamine, 0.2 M citric acid, 0.01% H₂O₂) を1ウェルあたり150 μ lずつ注入し、30分間室温でインキュベートした。50 μ lの6N sulfuric acid (H₂SO₄) により、反応を停止させた。マイクロプレートリーダー (Tosho, MPR-A4i, Tokyo, Japan) の波長を492 nmに設定し、吸光度を測定した。

子宮腔内白血球数の測定とその種の同定

PMSG-hCG処理を施した雌ブタに人工授精を実施した後、雌ブタを食肉公社へ出荷し、屠殺直後の生殖器 (卵巣・卵管・子宮) を回収した。子宮内の白血球をPBSで還流した。子宮内液が漏れ出ないように卵管子宮接合部と子宮頸管を鉗子で止め、卵管側からバルーンカテーテルを挿入し、片側子宮角へ50 mlずつPBSを注入した。十分に子宮内液を攪拌した後、PBSを全量回収した。回収した白血球含有PBSを実験室に持ち帰り、血球計算版 (Fujihira) にて白血球数をカウントした。

また、白血球の種類を同定するため、ギムザ染色を行った。回収した白血球をスライドグラスに塗抹し、風乾させた後、99%メタノール (WAKO) で1分間固定後、蒸留水で20倍希釈したギムザ染色液 (WAKO) を滴下して20分間放置した。その後、水で洗浄後、風乾させ、倒立顕微鏡 (OLYMPUS, Tokyo, Japan) で観察した。白血球の分類はスタンダード検査血液学 (奈良ら, 2003) に従って行った。

子宮粘膜中白血球数の測定とその種の同定

PMSG-hCG処理を施した雌ブタに人工授精を実施した後、雌ブタを食肉公社へ出荷し、屠殺直後の生殖器 (卵巣・卵管・子宮) を回収した。黄体が形成されていることを確認した子宮のみを供試サンプルとした。子宮間膜側を切開し、子宮間膜と反対側の着床部位を切り出し、10%中性緩衝ホルマリン (WAKO) に浸漬・固定した。常法に従い、固定液の除去、脱水、脱アルコール、パラフィン浸透、パラフィン包埋後、マイクロトームを使用して約3 μ mの薄切片を作製した。その後、脱パラフィン、染色、脱水・封入の手順でHE染色 (ヘマトキシリン・エオシン染色) を行った。

子宮 (検体) を粘膜内、固有層内、筋層内に分類し、各検体のそれぞれの部位を無作為に写真撮影した (5視野)。それぞれ1視野ごとの好中球、好酸球、リンパ球をLumina Vision (MITANI CORPORATION, Tokyo, Japan) を使用してカウント (血管内および子宮腺内は除外した) し、5視野の平均をとり、1 mm²あたりの細胞数を算出した。

実験2では、精漿含有融解液と精漿無添加EGTA融解液を用いて人工授精を行い、卵管内受精率および人工授精後30日齢の着床率を算出した。

実験計画

【実験 1】精子融解後に起こる capacitation に及ぼす Ca^{2+} と精漿の影響

溶液中の Ca^{2+} が精子融解後の capacitation に与える影響を検討するため、融解精子を Ca^{2+} 添加あるいは無添加培地で培養し、融解後の精子のタンパク質チロシン残基のリン酸化および先体の損傷を検出した。また、 Ca^{2+} 含有培地に精漿を 10% (v/v) 添加し、融解後の精子に起こる capacitation, Ca^{2+} と精漿の関係を追求した。

【実験 2】細胞外 Ca^{2+} キレート剤 EGTA が融解後の精子細胞内 Ca^{2+} および精子機能性に及ぼす影響

Ca^{2+} キレート剤である EGTA と細胞内 Ca^{2+} レベルおよび, capacitation への影響について検討すると共に、融解後の精子運動率、先体膜損傷率および体外受精能を指標に融解液へ添加する至適 EGTA 濃度について検討した。

【実験 3】EGTA 含有融解液を用いた人工授精試験

実験 3 では、実験 1 で得られた至適濃度の EGTA 添加あるいは無添加融解液を用いて凍結精液を人工授精し、体内における受精能を卵管内受精率および着床率を算出することで比較評価した。さらに、第四章で開発した、2 ステップ凍結融解処理法を利用した人工授精も実施し、その受精能と比較検討した。

結果

【実験 1】凍結精液を Ca^{2+} が含有した mTBM 培地で融解すると、培養 1 時間で capacitation の指標となるタンパク質のチロシン残基のリン酸化バンドが分子量 15 kDa 付近に強く検出されたが、 Ca^{2+} 無添加 mTBM 培地で融解した凍結精液のそれは弱い傾向であった (図 1A)。また、この Ca^{2+} によって促進されたリン酸化は、培養液へ 10% (v/v) の精漿を添加することで完全に抑制されたことから、融解時の精子に起こる capacitation (cryo-capacitation) は Ca^{2+} により制御され、かつ精漿が何らかの作用により Ca^{2+} の流入を抑制している可能性が示された。融解後の精子先体膜損傷率は、 Ca^{2+} 添加培地で培養した精子において、全ての培養時間で有意に増加した ($P < 0.01$, 図 1B)。

【実験 2】細胞外 Ca^{2+} キレート剤 EGTA を 0, 3, 6 および 9 mM 添加した融解液を作製し、それぞれの融解液で培養した精子のタンパク質のチロシン残基のリン酸化を検出した結果、6 mM の EGTA を添加して培養した時、バンドの濃さは著しく低下した (図 2)。また、これらの融解精子の細胞内 Ca^{2+} レベルは、EGTA 無添加融解液で培養した精子のそれと比較して有意に低下していた (図 3B)。EGTA 無添加融解液で培養したコントロール精子においては、融解直後から中片部および頭部に強い細胞内 Ca^{2+} シグナルが検出されることが細胞内 Ca^{2+} 指示薬である Fluo-3/AM を用いた実験により明らかとなったが、6 mM の EGTA を融解液へ添加して培養した精子においては、これらのシグナルが培養 6 時間においてもほとんど検出されなかった (図 3A)。

融解液への EGTA 添加が、融解後精子の運動率、精子膜損傷率および体外受精能に及ぼす影響を明らかとするため、各濃度の EGTA 添加融解液で精子を培養した。その結果、融解後精子運動率および先体膜正常率は 6 mM の EGTA を添加して培養した時、他の処理区と比較して有意に上昇し (図 4)、体外受精における受精率も有意に高い値を示した (EGTA 0 mM; 58.6%, EGTA 6 mM; 72.0%, $P < 0.05$, 図 5)。これらの結果から、融解後の精子 capacitation を抑制し、精子機能性を高く維持するため、融解液へ添加する至適 EGTA 濃度は 6 mM であることが明らかとなった。

【実験 3】過排卵処理した雌ブタに 1 回の人工授精を実施し、6 mM EGTA 含有融解液を用いた人工授精の体内における受精能を検討した結果、EGTA 無添加融解液を用いた人工授精と比較して卵管内受精率は有意に上昇し (33% vs 82%)、その値は 10% (v/v) 精漿が含有した融解液を用いた人工授精 (2 ステップ凍結融解処理法) のそれと同等の値であった (表 1)。また、その受胎率も 2 ステップ凍結融解処理法を利用した時の値を上回り、90% と高い受精能を保持していることが明らかとなったが、胎齢 30 日目の胎子の着床率が 51% と 2 ステップ凍結融解処理法による人工授精の胎子着床率と比較して有意に低かった。さらに、着床した胎子においても、退行あるいは白血球による貪食が見られ、多くが死滅していた (図 6)。これらの結果から、精漿を注入しない EGTA 融解液による人工授精では、子宮内の細胞性免疫機能が高まり、その結果、胚や胎子が貪食作用を受けると考えられた。すなわち、精漿には細胞性免疫を抑制する作用があり、子宮内の免疫系を制御していると推察された。

そこで、精漿中の免疫抑制因子を同定するため、細胞の免疫機能調節因子であるサイトカイン・ケモカインおよびステロイドホルモンの一種である cortisol に着目して検出を試みた。Membrane cytokine array を用いた網羅的解析の結果、精漿中から免疫機能に関係する因子として、MIF (macrophage migration inhibitory factor) および interleukin-13 (IL-13), IL-17 が検出された (図 7)。また cortisol においても、精漿中に 0.92 ng/ml 濃度で存在することが EIA により明らかとなった (表 2)。凍結精液の実用化にあたって、サイトカインは高価で不向きなため、本章では安価な cortisol の免疫抑制作用に着目した。

次に、融解液への cortisol 添加 (総注入量 5 µg) が子宮内の免疫能を抑制可能か否かを検討する目的で、人工授精後の子宮内腔白血球数を指標に測定した。人工授精後 6 時間の子宮内白血球数は、液状精液、cortisol 無添加および添加凍結融解精液いずれを注入した処理区間でも有意な差は認められなかったが、人工授精後 24 および 48 時間後において、cortisol 無添加凍結融解精液を注入したそれは有意に高い値を示し、子宮内へ cortisol を注入することでこれらは液状精液と同水準まで低下した (図 8A)。また、その白血球は、多核白血球 (PMN; polymorphonuclear leukocyte) が子宮腔内白血球の 9 割を占めていた (図 8B, C)。さらに、子宮粘膜層および固有層に出現するリンパ球の単位面積あたりの数は、人工授精処理区間で有意な差はなかった。しかし、凍結精液 (cortisol 添加, 無添加両区) を人工授精した時の子宮粘膜固有層の好酸球は、液状精液を人工授精した時のそれと比較して、人工授精後 48 時間および 7 日目共に有意に高く、融解液中の有る cortisol の有無はこれらに影響を及ぼさなかった (図 9)。

融解液への cortisol 添加は、子宮腔内の白血球数を減少させ、細胞性免疫能を抑制させることが明らかとなったことから、自然発情中の雌ブタへ EGTA+cortisol 含有合成融解液を用いて凍結融解精液の人工授精を行い、その繁殖成績を算出した。その結果、着床率は 83%へと改善され、受胎率および一腹産子数もそれぞれ 91%, 8.5 頭と精漿を添加した 2 ステップ凍結融解処理法により凍結融解した精液を人工授精した時のそれと遜色ない結果であった (表 3)。また、ステロイドホルモンを使用することから、胎子への安全面が懸念されるが、分娩した子豚の 1 週齢平均体重は両処理区間で有意な差はなく、子豚の発育・形態共に異常は認められなかった (図 10)。

考察

精子は凍結刺激のみでなく、融解時の急激な温度上昇においても、その膜の構造変化が起こることが知られている (Henry et al., 1993; De Leeuw et al., 1990). それらには、細胞膜リン脂質・コレステロールやタンパク質の損失 (Plummer and Watson, 1985; Muller et al., 1999; Parks and Lynch, 1992; Ollero et al., 1998), さらに、通常の体細胞膜の脂質二重層ではほとんど起こりえない細胞質側のリン脂質が細胞外側へと露出する現象などが報告されている (Pena et al., 2003). これらの細胞膜構造の崩壊が、精子細胞膜の損傷として電子顕微鏡で観察されている (Courstens et al., 1989; Bwanga et al., 1991). 本章において、融解液への EGTA 添加は、精子細胞内 Ca^{2+} 上昇、タンパク質のリン酸化および先体膜損傷を抑制したことから、細胞外 Ca^{2+} の細胞内への流入が cryo-capacitation および AR 誘起に密接に関与していることが示された. 上記の報告と本章における結果から、通常では、 Ca^{2+} チャンネルを介してのみ細胞内に流入する細胞外 Ca^{2+} が、凍結融解後の精子においては、精子融解刺激による膜の損傷により、細胞内へ流入し、cryo-capacitation および AR を誘起していると考えられた. 融解液への EGTA の添加は、第四章の融解液への精漿添加による作用を代替し、これらを抑制する有効な手法であることが明らかとなった.

本章において、EGTA 添加融解液で凍結精子を培養すると、融解後の先体膜正常性、高い運動率が維持された. ブタ凍結精子の融解液には、2 価イオンをキレートする EDTA が含まれている (Yamaguchi et al., 2009). しかし、EDTA は Ca^{2+} に対する親和性は EGTA と比べて低く、溶液中の Ca^{2+} を完全にキレートするためには、高濃度添加する必要がある. この高濃度の EDTA は、 Ca^{2+} をキレートすると共に、 Zn^{2+} , Mg^{2+} などの他の二価イオンも同時にキレートする. Zn^{2+} , Mg^{2+} は精子の運動能に関与している (Magnus et al., 1990) ことから、 Ca^{2+} への親和性の高い EGTA により Ca^{2+} のみをキレートすることが重要であると推察された.

本章における体外受精の結果から、凍結融解精子を EGTA 処理すると、その受精能は向上したことから、EGTA により抑制されていた capacitation は受精時に可逆的に誘起され、正常に受精できることが明らかとなった. また、人工授精においても、その体内における受精能は高かった. しかし、胚の着床が阻害され、着床した胎子は免疫細胞による食作用を受けていた.

人工授精後に子宮内に遊走される白血球は、子宮腔内に残留した死滅精子を貪食し、子宮環境を整える役割がある (Matthijs et al., 2000). 一方、Rozeboom et al. (1998, 2001) は、これらの白血球が精漿存在下では人工授精後 24 時間以内に消失することを報告した. また、マウスおよびヒト精漿には、種々のサイトカイン・ケモカインや抗炎症性ステロイドホルモンなどが含まれていることが示されている (Politch et al., 2007; Gopichandran et al., 2006; Tarter et al., 1986). したがって、精漿中の免疫抑制因子が、人工授精後の精子が抗原となって起こる細胞性免疫能を抑制し、胚が子宮へ到達した時にはその免疫力は低下し、白血球による胚への攻撃を抑制していると考えた. したがって、EGTA を添加した合成融解液による人工授精では、受精率は高いが、着床率が低いと推察された. しかし、ブタ精漿中の免疫抑制因子とその機能については明らかとされていない. 本章において、炎症性サイトカインとして、MIF および IL-17 が検出された. こ

れらは、異物である子宮内の精子を排除するために免疫細胞を子宮内へ誘引させると考えられた。一方、精漿中の免疫抑制因子としては、IL-13 と cortisol が同定され、人工授精時の精子と cortisol の同時注入は、子宮腔内に遊走される好中球数を有意に低下させた。また、これらの子宮腔内好中球の動態は、液状精液を人工授精した時と類似していた。cortisol は prostagrandin (PG), leukotriene などの炎症性物質を阻害する (Durham., 1998) 他、細胞質に局在する glucocorticoid receptor (GR) に結合し、核内へ移行後、NF- κ B responsive element を負に制御することで炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6 など) 遺伝子の転写を抑制する。さらには、抗炎症性サイトカイン遺伝子 (*Lipocortin*, *IL-1R antagonist*, *I κ - β*) を転写させることで、初期自然免疫の際に遊走される好中球などの白血球遊走を阻害する (De Bosscher and Haegeman, 2009)。しかし、本章において、cortisol の有無に関わらず、凍結精液を人工授精した子宮粘膜固有層においては、液状精液を人工授精した場合と比較して、好酸球が増加していた。好酸球は、histamine, prostagrandin (PG), leukotriene などを、細胞表面に存在するレセプターで感受し、特殊顆粒を分泌することで細胞障害性を示すことが知られている (Dumitraşcu, 1996; Lane and Lee, 1996; Katsanos et al., 2008)。また、子宮粘膜中には histamine を分泌するマスト細胞も存在する (Kaeoket et al., 2003) ことから、好酸球による胚への影響が懸念される。本章で同定された IL-13 は主にヘルパーT細胞 (Th2細胞) から分泌され、単球に作用することで、炎症性サイトカインの分泌を抑制することが報告されている (Terabe et al., 2004) ことから、精漿中の IL-13 が子宮粘膜中の好酸球遊走に関与していると推測される。本章では、ヒト抗体のサイトカインアレイにより検出しているため、これらの結果を基にブタ抗体を用いて精漿中 IL-13 を含めた免疫抑制サイトカインを同定し、それを子宮内へ注入する検討を今後行う必要がある。しかし、自然発情中の雌ブタへの EGTA+cortisol 含有合成融解液を用いた凍結精液の人工授精により、着床率は 83%、受胎率 91%へと高い繁殖性をもたらすことに成功したことから、cortisol が主に子宮環境を着床可能な状態へと変化させる精漿内因子であることが示された。

ステロイドホルモンである cortisol の注入は、胎子と母体へ副作用を及ぼす懸念があるが、子宮へ注入するコルチゾール量は、ブタの炎症の治療時に投与する量に比較して 1/10,000 程度であり、精漿に含有する量と注入量が同程度であること、かつ、cortisol は代謝分解が早いこと、産子の一週齢平均体重、その後の発達も正常であることから、本融解液を用いた人工授精は安全面においても影響はないと考えられる。

以上のことから、融解後精子の Ca²⁺に起因する cryo-capacitation および AR を抑制する EGTA と人工授精後の細胞性免疫を低下させ、胚の着床を促進させる cortisol を添加した完全合成融解液による凍結精液の人工授精は、高い繁殖成績を示し、産業上においても充分使用に耐えられる技術であることが示された。

要約

第四章において、凍結融解後の精子 cryo-capacitation および AR を抑制するため、融解液に精漿を添加する 2 ステップ凍結融解処理法を開発した。これは、液状精液による人工授精と同等の高い繁殖成績を示すが、精漿中には細菌あるいはウイルスが存在するため、伝染性疾病を招く危険がある。したがって、全ての農場で使用可能な凍結精液による人工授精技術とするためには、精漿を含まない完全合成融解液を開発することが望まれる。融解液へ添加する精漿は、融解後の精子 cryo-capacitation と AR を抑制することを第四章において明らかとした。精子 capacitation は、 HCO_3^- や Ca^{2+} などが細胞内へ流入し、精子細胞内 Ca^{2+} が増加することで起こると考えられている。しかし、凍結融解後に起こる capacitation 誘起と Ca^{2+} の関係は詳細には明らかとされていない。そこで、本章では、 Ca^{2+} が融解後精子の細胞内 Ca^{2+} と capacitation に及ぼす影響を解明し、それを抑制する完全合成融解液を開発することを目的とした。

培地中への Ca^{2+} 添加が cryo-capacitation に及ぼす影響を検討した実験 1 では、 Ca^{2+} は cryo-capacitation を促進し、これらの作用は精漿によって完全に抑制された。この結果から、cryo-capacitation に Ca^{2+} が関与している可能性が示唆されたため、実験 2 では、細胞外 Ca^{2+} キレート剤である EGTA の効果について検討した。融解液への EGTA 添加は、融解後の精子細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を抑制し、タンパク質チロシン残基のリン酸化も検出されなかった。これらの精子は、長時間の培養においても高い運動率、先体膜正常率を示し、体外および体内の受精能も高く保持していた。しかし、EGTA 合成融解液を用いた人工授精では、胎子の着床が阻害され（着床率 51%）、着床した胎子においても、白血球による食食を受けていた。第四章で、精漿は胚の着床を促進することが示されたことから、精漿には免疫抑制因子が存在し、これらが精子により遊走された白血球による胚の食食を防ぐと仮説を立てた。

精漿中のサイトカイン・ケモカインの網羅的解析およびステロイドホルモンの検出の結果、免疫抑制因子の候補として IL-13 と cortisol が同定された。本章では、強い免疫抑制作用を示し、かつ安価である cortisol に着目し、子宮内におけるその機能を解析した。融解液への cortisol 添加は、凍結精液を人工授精後 24 および 48 時間の子宮腔内白血球（多核好中球）数を有意に抑制し、液状精液を人工授精した時の子宮内白血球数の変化と類似していた。さらに、cortisol 含有融解液で人工授精した時の繁殖成績は、着床率が 83%、受胎率が 91%と実用化レベルへと改善された。

以上の結果から、融解後精子の Ca^{2+} に起因する cryo-capacitation を抑制する EGTA と子宮内の細胞性免疫を低下させ、胚の着床を促進させる cortisol を添加した完全合成融解液の開発に成功し、人工授精で高い繁殖成績が得られることが明らかとなった。

表1. EGTA含有融解液にて融解した精子を用いた人工授精における体内の受精能

処理区	人工授精に用いた雌ブタの頭数	卵管内受精率 (%)	着床率 (%)	受胎率 (%)
Control	23	33+/-8.3	-	9
EGTA	10	82+/-8.8*	51+/-12.0*	90*
SP	12	82+/-6.2*	78+/-11.4	83*

人工授精はeCG-hCG処理した雌ブタに1回のみ行った

人工授精は頸管注入用のカテーテルで行った

EGTA; 6mM EGTA, SP; Seminal plasma (精漿注入区)

着床率; 人工授精後30日齢の子宮内着床部位数/黄体数

受胎率; 受胎頭数/供試頭数

*着床率はEGTAとSP処理区間, 受胎率はControlと比較して有意差有り(P<0.05)

数値は平均値±SEM

表2. 血漿および精漿中のCortisol濃度

	Cortisol (ng/ml)
血漿	7.11+/-0.89
精漿	0.92+/-0.01

EIAにより血漿および精漿中Cortisol濃度を測定した

数値は平均値±SEM

表3. EGTA+Cortisol完全合成融解液を用いた人工授精の繁殖成績

処理区	人工授精に用いた雌ブタの頭数	着床率 ¹ (%)	受胎率 ² (%)	一腹産子数 ³ (頭)	1週齢平均体重 (kg)
SP	64	78+/-11.4	81	10.3+/-3.3	2.7+/-0.5
EGTA +Cortisol	22	83+/-14.3	91	8.5+/-2.7	3.0+/-0.5

人工授精は自然発情の雌ブタに3回行った

人工授精は頸管注入用のカテーテルで行った

¹人工授精後30日齢の子宮内着床部位数/黄体数

²受胎頭数/供試頭数

³死産または白子を含め、ミイラおよび黒子は除いて算出した
数値は平均値±SEMで示す

A

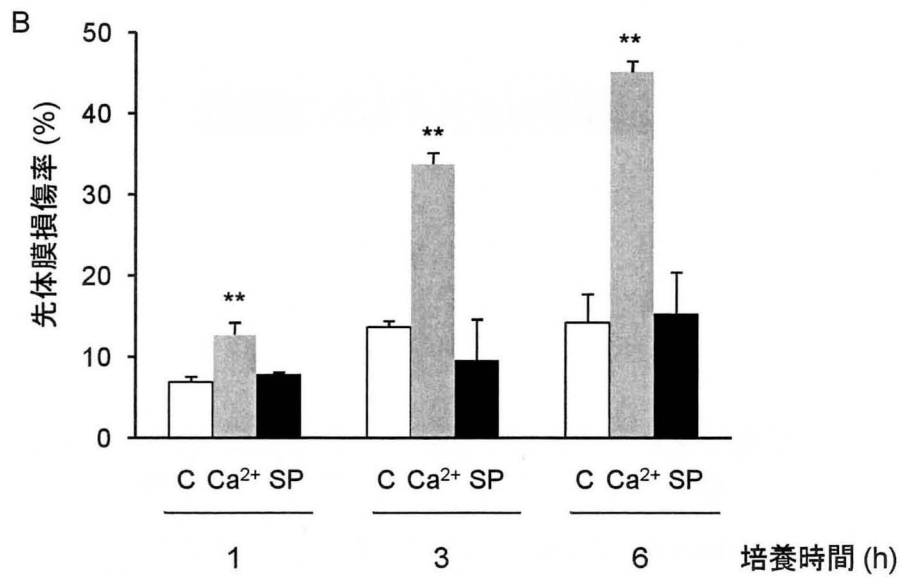
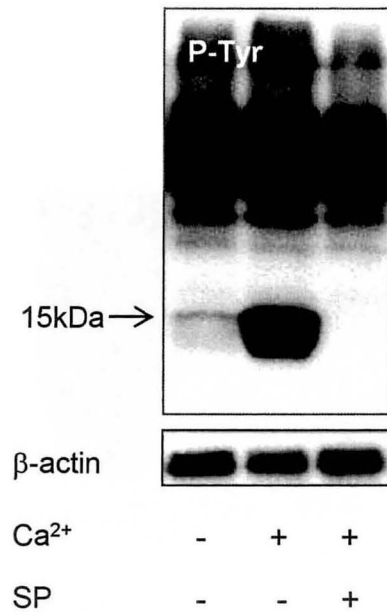


図1. Ca²⁺と凍結融解精子のタンパク質チロシン残基のリン酸化および先体膜損傷との関係

融解精子をCa²⁺含有あるいは無添加培地で培養し、精子タンパク質チロシン残基のリン酸化 (A) および先体膜損傷率 (B) を検出した。

SP; 10% (v/v) seminal plasma (精漿)

** (P<0.01)

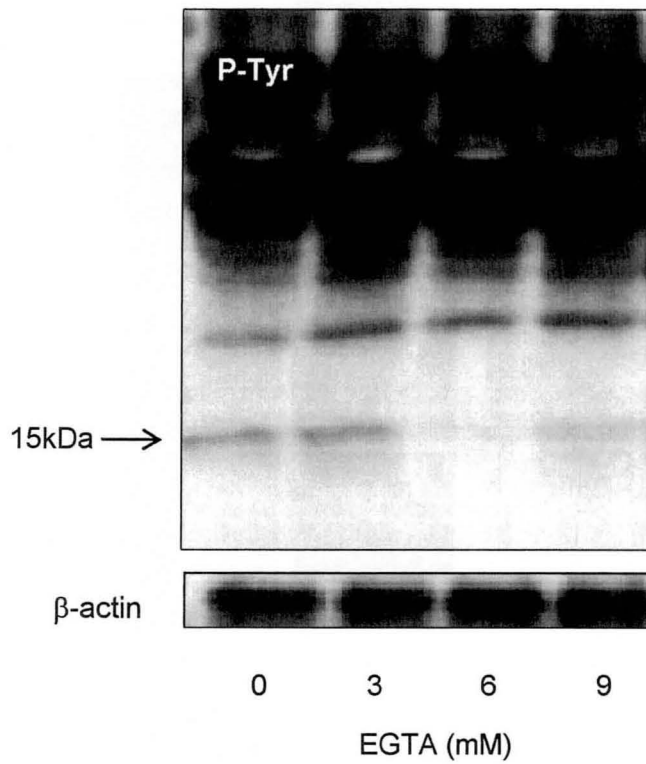
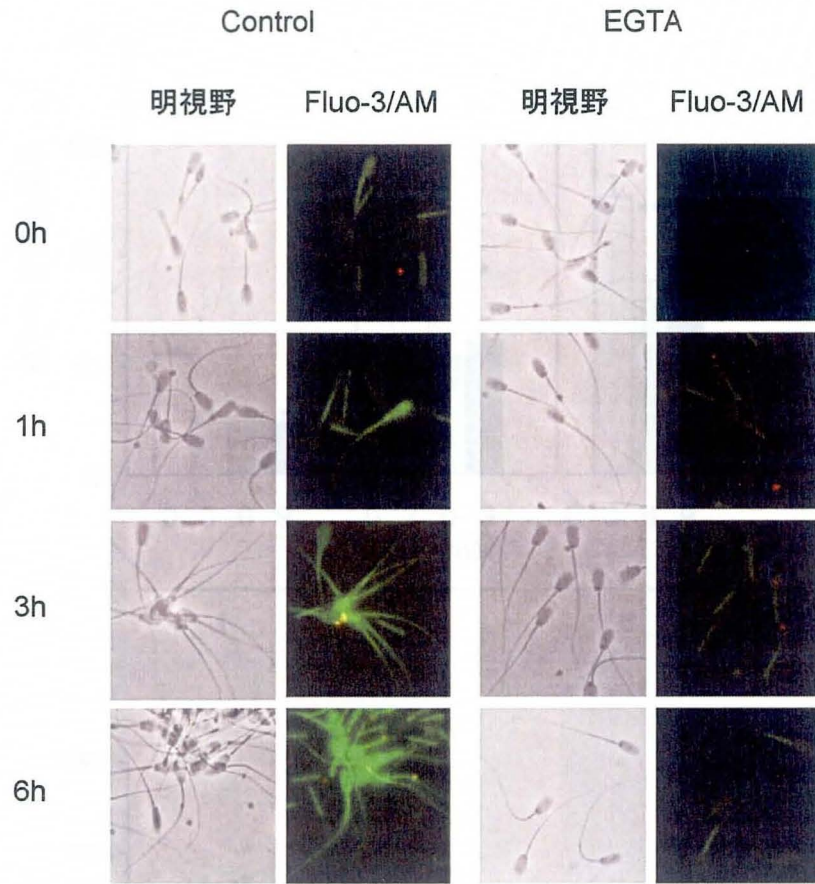


図2. Ca^{2+} キレート剤EGTAの融解液への添加が凍結融解精子のタンパク質チロシンリン酸化に及ぼす影響

各濃度のEGTAを添加した融解液で凍結精子を融解し、培養3時間における精子タンパク質チロシン残基のリン酸化を検出した。

A



B

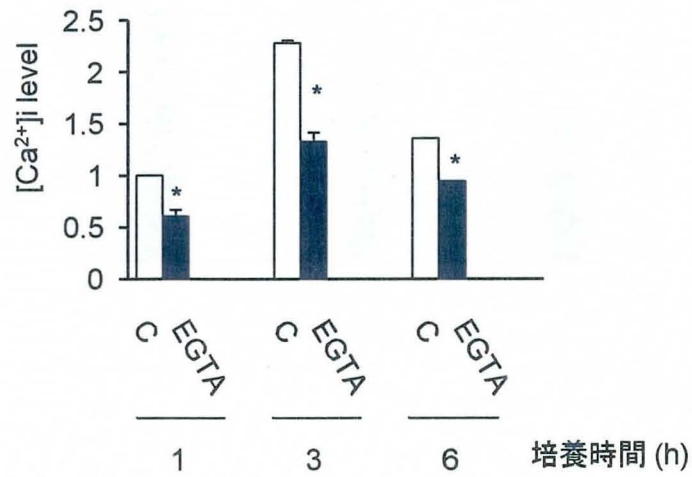
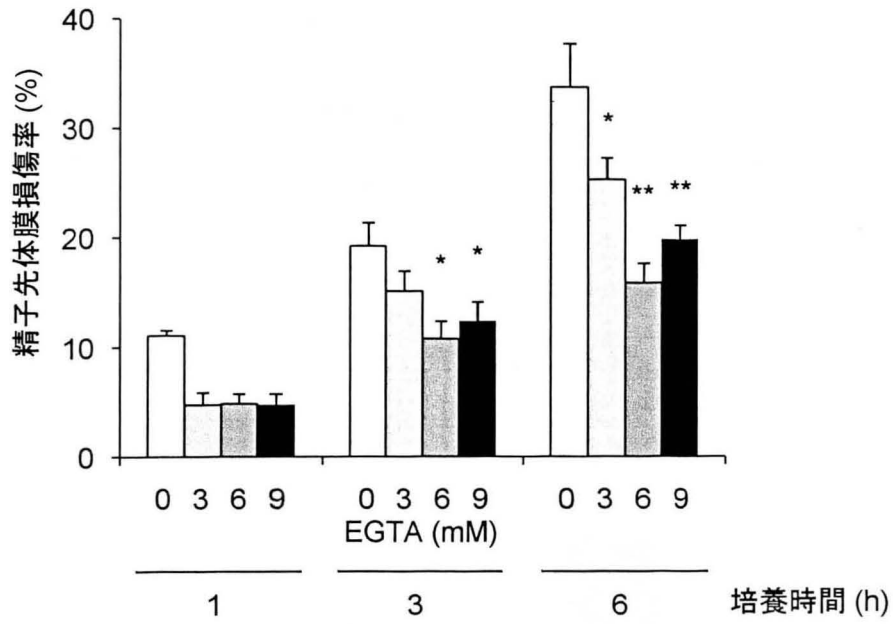


図3. 融解液へ6mMEGTAを添加した時の精子細胞内Ca²⁺濃度の変化

B; 培養1時間のControlの値を1とした相対比で示す

* (P<0.05)

A



B

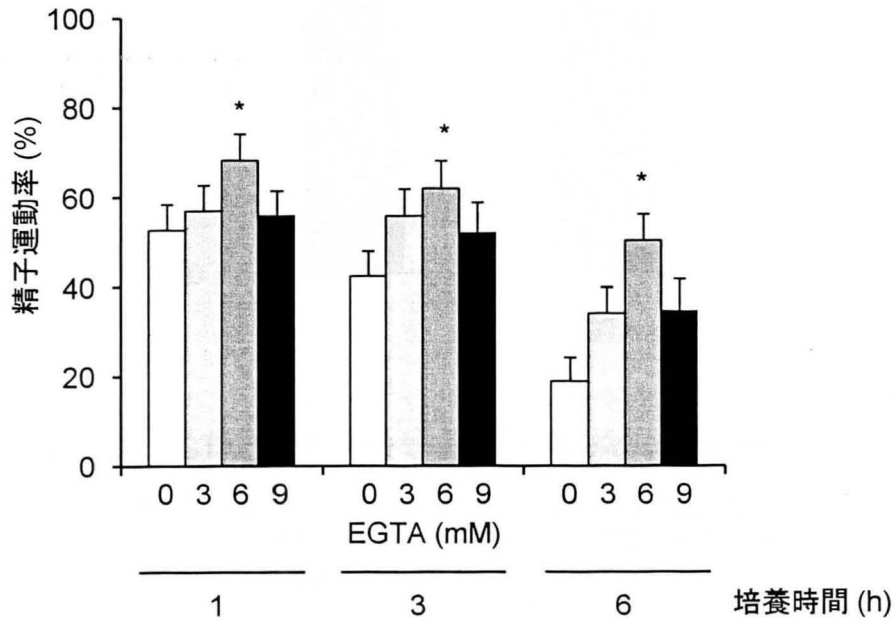


図4. 融解液へのEGTA添加が融解後の精子先体膜損傷率 (A) および運動率 (B) に及ぼす影響

各培養時間におけるEGTA無添加区と比較して有意差有り
* ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$)

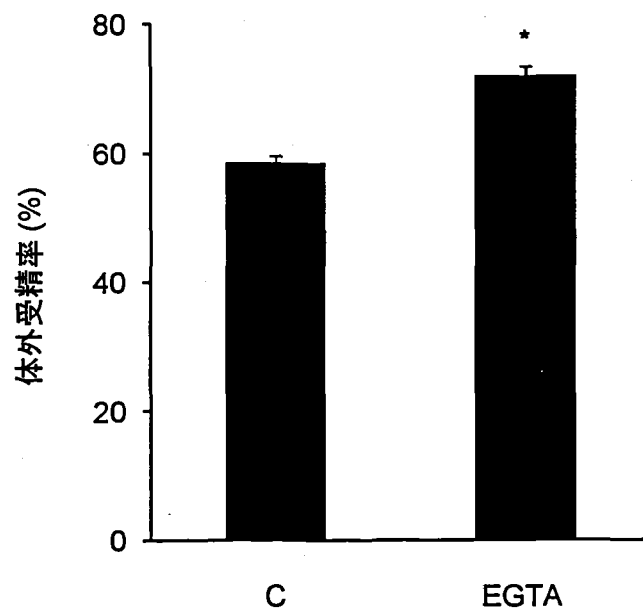
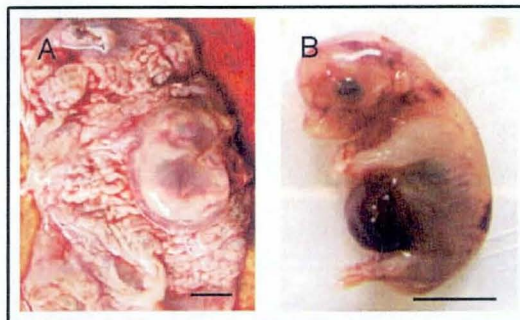


図5. EGTA含有融解液で融解した精子の体外受精能

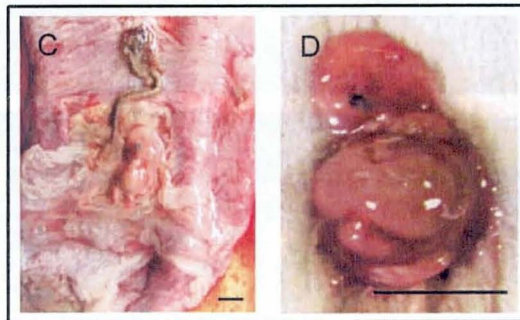
EGTA添加あるいは無添加融解液で凍結精子を融解し、30分間培養した後、mTBM培地で前培養を行った精子を体外受精に供試した。

* (P<0.05)

精漿含有融解液



EGTA含有融解液
(精漿無添加)



Bar=1cm

図6. EGTA含有融解液 (精漿無添加) にて精子を融解し、人工授精して作出された子宮内胎子
A, C; 子宮上皮に接着し、羊膜に覆われた胎子. B, D; 羊膜および羊水を除いた胎子

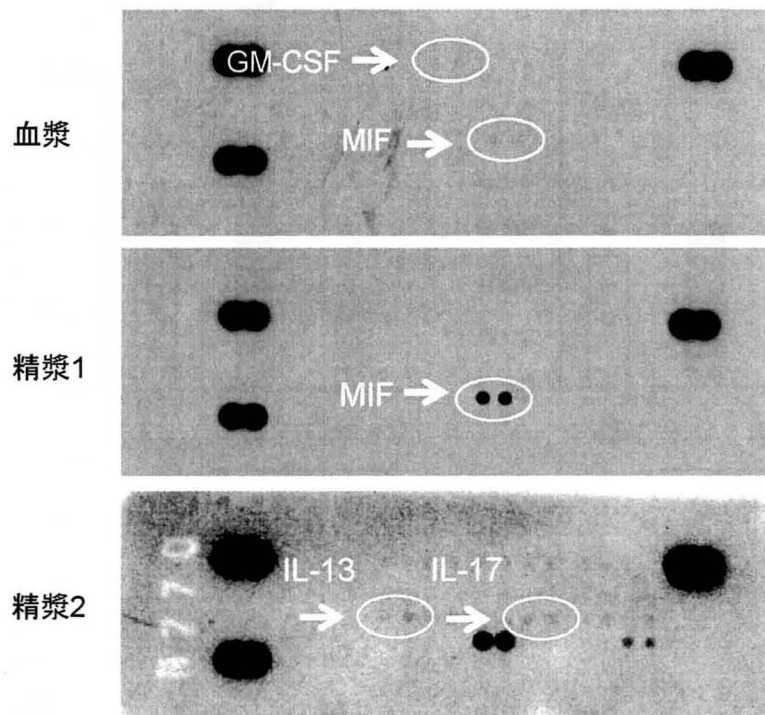
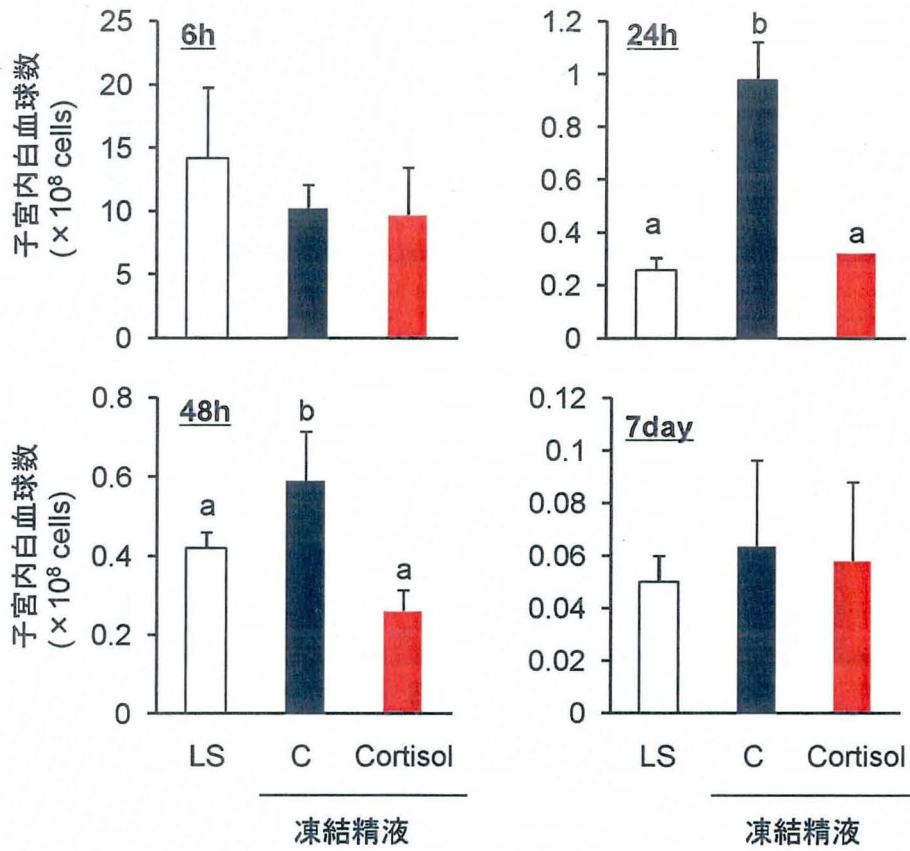


図7. 血漿および精漿中の免疫抑制因子の同定

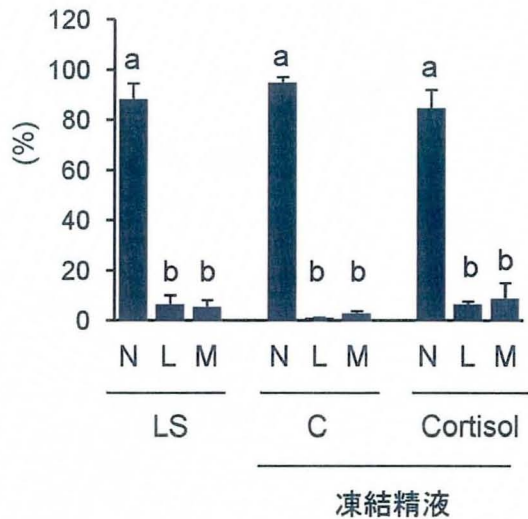
Membrane cytokine array systemにより精漿中に存在するサイトカインを同定した

精漿1はメンブランを1分間感光し、精漿2は精漿1のメンブランを5分間感光させたもの

A



B



C

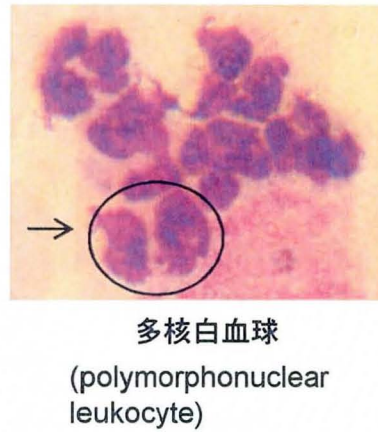


図8. 人工授精後の子宮腔内白血球数に及ぼすCortisolの影響

A; 子宮内白血球数 LS; 液状精液, C; Cortisol無添加を示す

B; N; 好中球, L; リンパ球, M; マクロファージ a-b, $P < 0.01$

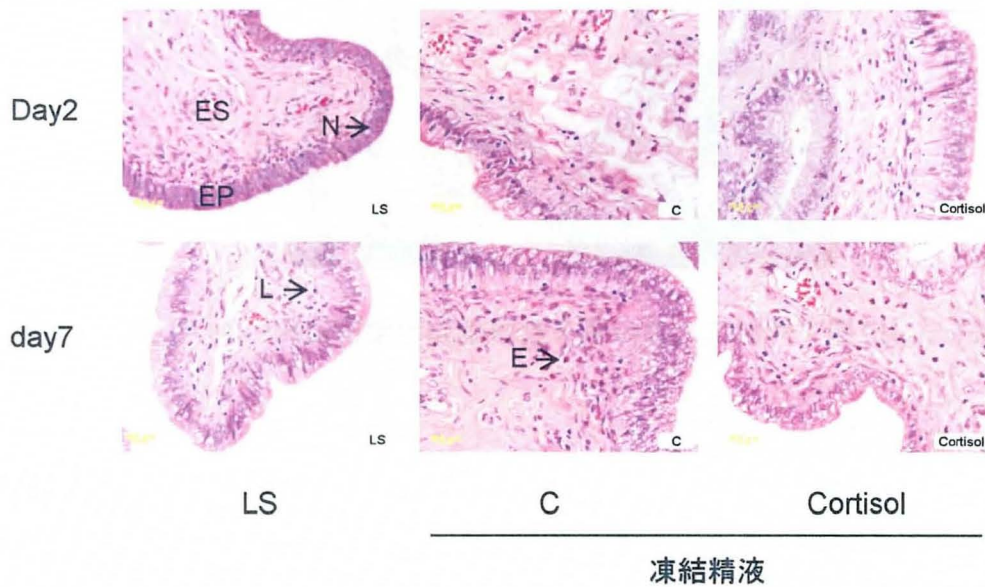
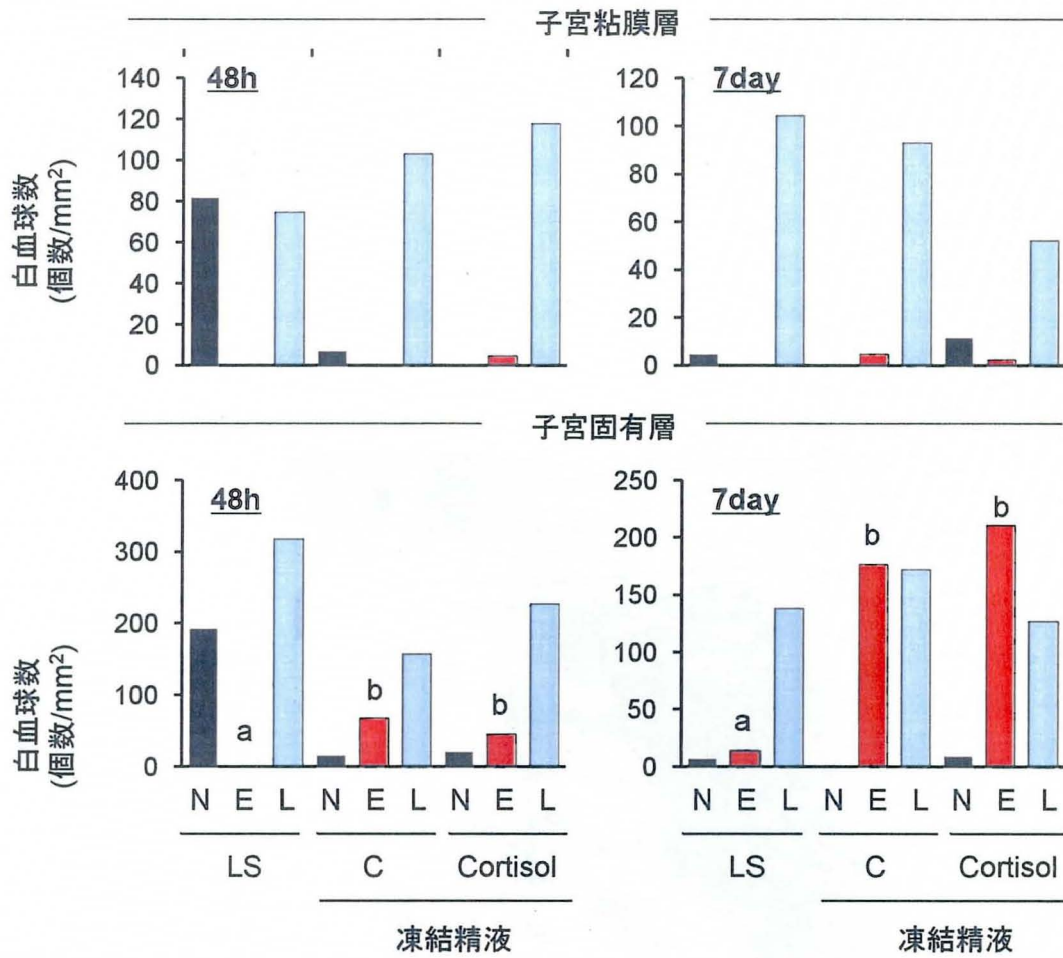


図9. 人工授精後の子宮粘膜中白血球数に及ぼすCortisolの影響

N; 好中球, E; 好酸球, L; リンパ球を示す

EP; 子宮上皮細胞, ES; 子宮粘膜固有層

a-b, P<0.01



図10. EGTA+Cortisol完全合成融解液を用いた人工授精で誕生した子豚

第六章：総合論議

精子を凍結保存し、人工授精により産子を得る試みは、1952年の Polge and Rowson (1952) の研究に始まりをみる。彼らは、ドライアイス・アルコールを用いてウシ射出精子を -79°C に凍結し、その精子を用いた人工授精により、受胎させることに初めて成功した。しかし、 -79°C で保存した凍結精子は、保存後2-3ヶ月から徐々に融解後の精子運動率が低下し、数年後には受精が不可能となることが明らかとなった。低温物理学分野での研究においては氷晶の安定限界温度が -130°C とされているため、 -79°C では物質は不安定であり、凍結保存に適していなかったためであると考えられる(毛利ら, 2006)。その後、 -196°C の液体窒素で精子を保存する技術が、多くの研究者らの実験により確立され(Rubin et al., 1969; Pickett and Berndtson, 1974)、長期保存の影響を全く受けず、半永久的に保存が可能となった(Iritani et al., 1980; 西川ら, 1976)。実際に、20年間凍結保管したウシ精子は十分な受精能力を持つことも報告されている(白山ら, 1986)。これらの報告から、現在では、肉用牛、乳用牛生産において、凍結精液技術は世界的に普及しており、我が国においても1961年に家畜改良増殖法が改正され、ウシの人工授精は液状精液から凍結精液へと切り替えられ、ほぼ100%が凍結精液による人工授精により種付けが行われている。

ブタにおいては、その精子が他動物種と比較して凍結に対する感受性が高く(Mazur et al., 2008)、精子の凍結そのものが困難であり、また、凍結精液を用いた人工授精後の繁殖成績も著しく低いことから、全く実用化されていない。ブタ精子は凍結時に細胞膜の損傷を受けることで、融解後の精子機能が低下する(Hamamah et al., 1990; De Leeuw et al., 1990; Kumar et al., 2003)。したがって、ブタ精子細胞膜を正常に保持したまま凍結するためには、ウシで開発された卵黄-glycerol凍結希釈液をさらにブタ用に改良する必要がある。現在までに、精子細胞膜を保護するため凍結希釈液への界面活性剤(OEP, Pluonic-F127)、糖類(lactose, trehalose)、抗酸化剤(BHT, α -tocopherol)などの様々な添加実験が行われてきたが、これらを用いて凍結した精液による人工授精での繁殖成績は未だ低く、ブタ用凍結希釈液は不完全なままである(Pettitt and Buhr, 1998; Roca et al., 2004; Breininger et al., 2005; Gadea et al., 2005; Hu et al., 2009)。そこで、本研究、第二章において、ブタ精子はglycerolによる浸透圧変化に対する耐性が他動物種と比較して弱いこと(Gilmore et al., 1998)、高張条件の凍結希釈液は精子細胞内氷晶形成を抑制する(Zeng et al., 2001)という報告から、この二つの要因に着目し、ブタ凍結希釈液の最適な浸透圧およびglycerol濃度条件を検討した。その結果、第一次希釈液を400mOsm/kgの高浸透圧条件にし、第二次希釈液へのglycerol濃度を2%へと減少させた新規凍結希釈液を開発した。本希釈液を用いて凍結した精子は、融解後の膜が正常に保たれ、人工授精後の受胎率も改善できることを明らかとした。このように、凍結保存の基幹となる凍結希釈液の開発に成功した。他にも、凍結融解後の精子の機能性や受精能を向上させるため、凍結希釈液の改良の他にも、冷却温度や融解温度の最適化(Medrano et al., 2002; Hernández et al., 2007)や凍結ストローの形状の検討(Bwanga et al., 1991; Peláez et al., 2006)など、技術的改良に関する研究も国内外で盛んに行われ、一定の成果は得られているが、本研究の第二章の成果を含めて、雄ブタの半数があてはまる

低耐凍能という問題を解決するまでには至っていない。

「耐凍能」とは、精子の凍結に対する耐性の度合いを表すと一般的に考えられている。しかし、精液採取直後の精子活力は個体間で差はないが、各個体の自己の精漿で数時間精子を培養した時、その運動率は個体間で大きく変化する(Caballero et al., 2004)。つまり、精子は凍結前処理の過程で(精子を凍結することとは無関係に)すでに精子の機能性が低下し、それが個体間の融解後の運動率の差として現れていると示唆される。言い換えると、「耐凍能の低い個体の精子」とは、射出された精液(精子+精漿)の質が劣悪であるということである。したがって、このような精液を凍結可能にするためには、現在までに行われてきた凍結に関する技術的改良のみではなく、精子および精漿の相互作用を解明し、その基礎的な知見を基にした新しい処理法の開発が必要と考えられる。

本研究、第三章第一節において、ブタ精液には細菌が感染しており、その数は雄個体間において差異が認められること、精子は細胞膜表面にTLR4 および TLR2 を発現し、グラム陰性菌とグラム陽性菌の病原性破片である LPS やリポペプチドなどをそれぞれ認識し、精子の膜機能性低下とアポトーシスを誘起することで運動率が低下することを明らかとした。この成果は、「免疫担当細胞ではなく、体外へと放出される細胞である精子が病原体に対する自然免疫能を有している」という初めての報告である。このような精子と精漿の生理学的な相互作用を考慮し、第三章第二節および第四章では、精子に悪影響を及ぼす病原性破片など精漿に存在する負の因子を除去するため、採精後、直ちに精漿を除去し、LPS 不活化剤である polymyxin B (PMB) を添加した前処理液にて精子を培養し、凍結するという新しい凍結処理法を開発し、耐凍能の低い個体においても、融解後に高い運動率を有した精子の作出に成功した。本手法により凍結融解した耐凍能の高い個体の精子においても、高い運動率が維持されていたことから、この新規凍結処理法は全ての雄個体の精子を凍結可能にする技術であることが示された。しかし、このようにして作出した精子の融解過程において、精子は cryo-capacitation を誘起し、人工授精における体内の受精能が低かった。精漿はこの cryo-capacitation を抑制する作用があることを解明し、精漿を融解液へ再度添加することで、全ての雄個体の凍結精液を用いた人工授精で高い繁殖成績をもたらすことに成功した(2ステップ凍結融解処理法)。

一方、精漿は季節や個体毎により成分が異なり、融解液の品質が均一化しないことや精漿に含まれるウイルスなどの病原体が混入する恐れがある。そこで、第五章において、精漿を含まない合成融解液の開発を試みた。その結果、cryo-capacitation を誘起する精子細胞内 Ca^{2+} 上昇を EGTA により抑制可能であること、凍結精液による人工授精後に子宮腔内へ遊走される白血球の数は、cortisol により減少することから、精漿の代わりに EGTA+cortisol を添加した完全合成融解液を開発した。これを用いた人工授精は 2 ステップ凍結融解処理法と同等の繁殖成績を示し、ブタ凍結精液による人工授精を実用化レベルに到達させることに成功した。以上のように、50 年以上の長期間に亘って研究がなされてきたにも関わらず確立されていなかったブタの凍結精液による人工授精の成功は、精漿の生理学的役割の解析結果から判明した「精漿あるいは cortisol を子宮内へ注入する」ことによる高い着床率により実現したと考えている。

ブタの射出精液量は 200~500ml と非常に多く、他の哺乳動物と比較しても類を見ない。この

ようなブタ固有の雄生殖道の発達には、雌ブタに特徴的な長い子宮角の中を精子が効率的に通過するためであると考えられてきた。しかし、本研究から、大量の精漿が子宮内へ入ることは、cortisolなどの免疫機能を制御する因子を子宮内へと充満させ、多胎妊娠を成立させるためにも重要な役割を果たしているという新たな意義が明らかとなった。

マウスおよびヒトにおいて、精漿中のサイトカインと子宮内膜細胞との関係を検討した Robertson et al. (2002, 2005, 2007) および Gutsche et al. (2003) は、精漿中の TGF- β と IL-8 が子宮内膜細胞に即座に作用し、granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)、IL-6 などの炎症性サイトカインを産生、分泌させ、着床部位に多数のリンパ球を誘引することを報告した。このように集積した子宮粘膜のリンパ球 (CD45⁺陽性細胞) は、着床期に細胞障害作用が低下した子宮内特異的な uterine NK 細胞 (uNK) と CD4⁺ヘルパー T 細胞 (Th2) へと分化していることが示されている (Nishikawa et al., 1991; Kaeoket et al., 2003)。特に、CD4⁺ヘルパー T 細胞は産生するサイトカインの種類により Th1 と Th2 に分類され、Th1 は細胞障害性 T 細胞を誘導するため、Th1>Th2 環境では胎子に対する拒絶反応を示し、流産が生じる (Chaouat, 2007a)。さらに、Chaouat (2007b) は、Th2 そのものは細胞障害性をもたず、かつ、uNK 細胞の細胞障害性を抑制する働きがあることから、哺乳類の正常妊娠には Th2 優位の状態が望ましいと考え、Th1/Th2 バランスが妊娠成立において重要であると主張している。以上の報告から、正常な妊娠が成立するためには、着床期の子宮粘膜中のリンパ球は、父性抗原をもつ半同種移植片 (semi-allograft) である胎子を侵襲しないため、それらは免疫抑制されていることが必要であると考えられる。偏心着床 (子宮内膜の一部のひだの間に胚盤胞が着床する) の齧歯類、壁内着床 (子宮内膜へ胚盤胞が浸潤し着床する) の霊長類では、胚の着床点が決定されていることから、その局所で子宮内膜リンパ球の免疫抑制が起こっている (Blois et al., 2004, 2007)。また、中心着床 (伸張した胚が子宮角全面に拡張し、接着する) を行うウシにおいても、胎盤は子宮小丘でのみ形成されるため、局所で免疫抑制が起こっていると推察される。しかし、ウシと同様、中心着床を行いながらも子宮小丘をもたないという特徴を示すブタでは、着床点が定まっておらず子宮腔全面の子宮内膜に存在するリンパ球が免疫抑制されなければならないと推察される。既存の方法で凍結精液を人工授精 (精漿無添加融解液による人工授精) した時、受胎した雌ブタは、妊娠初期から中期において、高確率で胚の消滅あるいは流産することが報告されている (Roca et al., 2003; Bathgate et al., 2008) が、本研究第四章、第五章において、精漿あるいは cortisol 含有融解液を用いた人工授精は、胎子の着床率を向上させた。これらの結果から、ブタ精漿中の cortisol などの免疫抑制因子は、子宮粘膜に作用し、着床期におけるリンパ球の免疫抑制を制御していると示唆される。したがって、中心着床を行うブタにおいては、子宮内膜全面に精漿が曝される必要性があることから、雄ブタは大量の精漿を子宮内へ射出するという特徴的な繁殖システムを有すると考察された。

本研究で精漿あるいは cortisol を含んだ融解液にて凍結精液を人工授精する手法では、合計 150 ml (50 ml \times 3 回) 注入し、この量は子宮内膜が融解液に曝される十分な量であると考えられる。このように、ブタ精漿の生理学的研究を基にして凍結精液の人工授精を改良した例は全くなく、本研究で開発された 2 ステップ凍結融解処理法や完全合成融解液による凍結精液の人工授精法は、

これを実用化レベルへもたらした画期的かつ有意義なものである。

以上のように、本研究において得られた知見を応用した新規「凍結精液による人工授精法」が養豚農家において安定的に実施することが可能となれば、年間を通じて「受胎率 90%、産子数 10 頭以上」を全ての雄ブタ由来精子で恒常的に達成でき、高い経済効果（仮に母豚一頭の年間生産・出荷頭数が一頭増加すると仮定した場合；936,700 頭（全国母豚頭数；農林水産省畜産統計平成 21 年 2 月 1 日現在） \times 0.9（受胎率） \times 1 頭（増加頭数） \times 75 kg（枝肉重量） \times 422 円（枝肉単価；平成 21 年 10 月の東京市場，中の高値）=266 億 8 千万円の畜産粗生産額の向上）と経営の安定化が見込める。また、本技術が実用化されることで、養豚農家は雄ブタを飼育する必要がなく、その飼養コスト（雄ブタ一頭あたり 5 万円以上）や導入コスト（雄一頭あたり 20 万円程度）削減も可能となる。さらに、精漿を含有しない完全合成融解液による人工授精は、SPF 農家においても、使用可能とする技術であることから、我が国で飼養されている SPF 母豚（7 万 5 千頭；<http://www.j-spf.com/>）の生産性向上につながり、安心かつ安全な SPF 豚肉の生産増加が期待される。このように本研究成果は、養豚業の発展に大きく貢献する。

近年では、系統造成豚や貴重な品種の長期維持のため、ブタにおいても凍結胚の移植に関する研究が盛んに行われている。しかし、凍結胚の外科的あるいは非外科的移植による受胎率は、極めて低いものである（Dobrinsky, 2001）。この成功率を上げるために行われている研究は、専ら移植胚の質の向上である（Cameron et al., 2006）。先に述べたとおり、胚が子宮内で生存・着床し、胎子へと発達するためには、それを受け入れる子宮の免疫細胞が妊娠期のそれへと変化していることが重要であり、本研究の成果である精漿あるいは cortisol 注入による子宮内免疫抑制法は、レシピエント（移植側）の子宮内環境を考慮した新しい ET 法の確立にも応用されると期待される。したがって、家畜の生殖工学においても有効であると考えられる。

第七章：総括

養豚業において、その種付け業務は、自然交配が一般的であった。しかし、自然交配を行うためには、多数の雄ブタを飼育する必要があるだけでなく、種付け時の危険性や夏から秋にかけて雄ブタの精子活力の減退による不受胎が多発し、経営上好ましくない。このような背景から、液状精液を用いた人工授精に関する研究が行われるようになり、近年では、公的機関や民間の種畜場から精液検査に合格した液状精液が生産者へ配布され、これによる人工授精法が確立されている。この液状精液による人工授精は、十分な活力を有した精子のみを使用するため、自然交配と比較して、繁殖成績は改善されたが、急な発情に対応できないこと、保管期間が7日間程度と短いこと、さらには、輸送中の精液の温度変化が精子に悪影響を与えることなどの理由から、普及率は40%で停滞している。凍結精液による人工授精法は、これらの欠点を全て解消し、年間を通じて安定的な繁殖成績が得られると期待されるが、ブタにおけるその受胎率および一腹産子数は現在においても未だ低く、全く実用化されていないのが現状である。そこで、本研究では、「凍結方法」および「融解方法」をそれぞれ最適化し、高い繁殖成績を示す凍結精液による人工授精法を開発することを目的とした。

至適浸透圧と glycerol 濃度の検討によるブタ精子新規凍結希釈液の開発

精子は凍結時に原形質膜および先体膜の損傷が起こり、融解後にその機能性が損なわれる。これらの損傷は、凍結時の細胞内氷晶形成に起因すると考えられていることから、細胞内自由水を置換する耐凍剤である glycerol が添加される。一方、glycerol は細胞毒性を示し、ブタ精子は他動物種のそれと比較して glycerol の毒性に対する感受性が高い。したがって、glycerol の機能を補助する凍結希釈液の開発が求められる。そこで、本章では、凍結希釈液の浸透圧 (300, 400, 500 mOsm/kg) と最終 glycerol 濃度 (0.5, 1, 2, 3%) の最適化を図り、新規ブタ凍結希釈液の開発を試みた。その結果、凍結希釈液の浸透圧が 400 mOsm/kg の高張条件の時、融解後精子運動率は有意に高い値を示し、また、400 mOsm/kg 条件下において、融解後の精子精子膜正常率は glycerol 濃度 2% が 1 および 3% と比較して有意に高かった。これらの結果から、浸透圧を 400 mOsm/kg の高張条件にし、glycerol 濃度を 2% へと低減した新規凍結希釈液を開発した。これを用いて作出した凍結融解精子は既存の希釈液 (300 mOsm/kg, 最終 glycerol 濃度 3%) のそれと比較して、高い運動率および原形質膜正常性を示し、さらに、人工授精による受胎率も高い値を示した (29% vs 79%)。以上の結果から、第一次凍結希釈液の浸透圧を 400 mOsm/kg の高張条件とし、第二次凍結希釈液へ添加する glycerol を 2% へと低下させた新規凍結希釈液は、ブタ凍結精子作製に有効であることが明らかとなった。

耐凍能を負に制御する因子の同定と、その作用機序の解明

第二章において、3頭の雄ブタ精子を新規凍結希釈液にて凍結した場合においても、1頭の雄ブタの融解後精子運動率は低く、個体間で耐凍能に差異が存在した。この個体間の耐凍能の差は、

凍結精液による人工授精が実用化されない要因となっている。そこで、本章では、耐凍能を左右する負の因子として、精液中の細菌に焦点をあてた。

「Toll-like receptor を介した精子の初期免疫応答の解明」

精液にはグラム陰性菌および陽性菌共に検出され、その数は個体間でばらつきが見られた。また、細菌数と精子運動率は培養 3 時間で、有意な負の相関関係が認められた。精液細菌の多くはグラム陰性菌であり、その病原性破片である LPS が精漿から検出されたことから、LPS などの病原性破片が精子に悪影響を及ぼしていると推察された。そこで、LPS 受容体の TLR4 とグラム陽性菌の病原性破片を認識する TLR2 の精子における発現と機能解析を行った。その結果、精子は TLR4、*Cd14* および TLR2 を発現しており、先体部および中片部に局在していた。精子培養液への LPS および Pam3Cys (TLR2 リガンド) の添加は、その濃度依存的に精子運動率・生存率を低下させ、これらの精子は、caspase-3 に依存したアポトーシスを誘起していた。以上のことから、精子は TLR4 と TLR2 を介して細菌の病原性破片を認識し、アポトーシスや膜異常を誘起し、その結果、運動率が低下するという精子の初期免疫応答が初めて明らかとなった。

「凍結前処理液および凍結希釈液への LPS 阻害剤 PolymyxinB 添加が融解後精子機能性に及ぼす影響」

精子凍結処理過程において、精子は採精後、数時間精漿と共存することが一般的であるため、この間に精子は TLR4 を活性化し、精子機能性が失われていると考えられる。そこで、第二節では、LPS 不活化剤 PMB の影響について検討した。その結果、100 µg/ml 濃度の PMB 添加は、LPS による運動率低下、caspase-3 によるアポトーシスを抑制すること、精漿中 LPS 活性を完全に不活化すること、penicillin G (P) と PMB の複合処理は、液状精液の保存性を向上させ、人工授精による繁殖成績を向上させることが示された。そこで、PMB を凍結前処理液および凍結希釈液へ添加した結果、複合処理は融解後の精子機能性を有意に向上させ、人工授精においても高い受胎率および一腹産子数が得られた。以上のことから、P+PMB の複合処理は、耐凍能を左右する負の因子である LPS を凍結前処理の段階で不活化し、TLR4 を活性化させず、融解後においても機能性の高い精子が得られる有効な凍結処理法であることが明らかとなった。

耐凍能の低い個体の精子を凍結可能にする新規凍結融解処理法の開発

精液にはグラム陽性菌も検出されるが、これらの病原性破片を不活化する抗生物質は現在のところ存在しないこと、また、精漿中には pH 変動因子や cholesterol など精子機能性を負に制御する因子が含まれているという報告がある。これらのことから、採精後、直ちに精漿を除去して凍結する方法が耐凍能の低い個体の精子を凍結可能とする最適な手法であると推察した。採精直後の精漿除去は、耐凍能の高い個体 (GF) の融解後の精子運動率、体外受精率に影響を及ぼさなかったが、耐凍能の低い個体 (PF) におけるそれらは改善された。しかし、精漿除去法により作製した PF 凍結融解精子を用いた人工授精では、受胎率は向上しなかった。精漿除去法により作出した精子は、融解直後から自発的な受精能獲得 (capacitation) とその後誘起される先体反応 (AR) に起因する先体損傷が促進されていた。精漿は capacitation および AR を抑制するという報告があることから、融解液へ精漿を再度添加する実験を試みた。融解液への精漿添加は、濃度

依存的に capacitation および先体損傷を抑制し、融解液への 10% (v/v) 添加はそれらを抑制する充分量であることが明らかとなった。以上の結果から、採精後、直ちに精漿を除去して凍結し、10% (v/v) 精漿含有融解液にて精子を融解する「2ステップ凍結融解処理法」を開発し、これを用いた人工授精で、PF 個体においても受胎率 70%、全ての雄個体で受胎率 81%、一腹産子数 10.4 頭という高い繁殖成績を得ることに成功した。

動物由来物質を含有しない完全合成融解液の開発

精漿は、季節によりその正常が変化すること、様々なウイルスが検出されることから、安定的に安全な技術とするためには、精漿添加融解液と同等の機能を有した完全合成融解液の開発が必要である。精子の capacitation は、精子細胞内 Ca^{2+} 上昇により誘起されることが知られている。そこで、第五章では Ca^{2+} キレート剤 EGTA が融解後の精子 capacitation および機能性に及ぼす影響を検討した。その結果、融解液への 6 mM EGTA 添加は、精子細胞内 Ca^{2+} 上昇を抑制し、それによる自発的 capacitation 誘起および AR に起因する先体損傷も抑制した。また、融解後の精子運動率および体外受精率も EGTA 添加により有意に増加した。しかし、EGTA 合成融解液による人工授精では、卵管内受精率は 82% と高いにもかかわらず、胎子の着床率は 51% と精漿添加融解液による人工授精のそれと比較して有意に低く、さらに、着床胎子においても、白血球による侵襲を受けていた。この結果から、精漿には免疫抑制因子が存在し、これらが、精子が抗原となり遊走された白血球による胚の食食を防ぐと仮説を立てた。精漿中のサイトカイン・ケモカインの網羅的解析およびステロイドホルモンの検出の結果、免疫抑制因子として IL-13 と cortisol が同定された。融解液への cortisol 添加は、凍結精液を人工授精後 24 および 48 時間の子宮腔内白血球数を有意に抑制し、正常妊娠モデルとなる「液状精液による人工授精」の子宮内白血球と類似した動態を示した。cortisol 含有融解液で人工授精した場合の着床率は 83% と向上し、繁殖成績も受胎率が 91%、一腹産子数 9 頭と実用化レベルに達した。以上の結果から、融解後精子の Ca^{2+} 上昇に起因する capacitation を抑制する EGTA と子宮内の細胞性免疫を低下させ、胚の着床を促進させる cortisol を添加した完全合成融解液の開発に成功し、これによる人工授精で高い繁殖成績が得られることが明確となった。

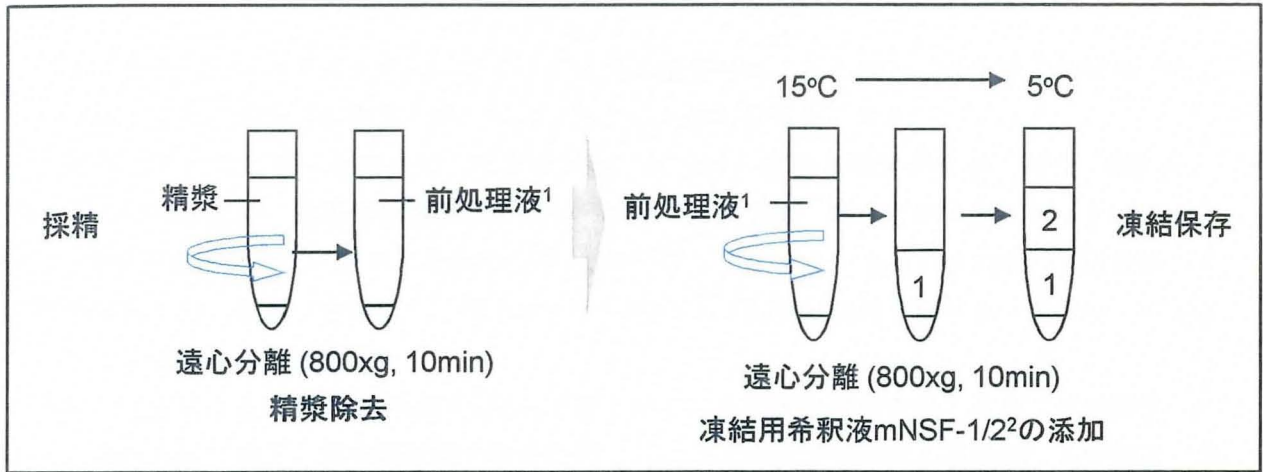
本研究により

1. 採精後、直ちに精漿を除去する
2. 100 μ g/ml 濃度の PMB を添加した前処理液にて精子を希釈する
3. 浸透圧 400 mOsm/kg の高張条件にし、最終 glycerol 濃度を 2% にした凍結希釈液にて精子を凍結する
4. 融解液へ 10% (v/v) 精漿あるいは、6 mM EGTA+5 μ g cortisol を含有した融解液にて精子を融解し、人工授精する

という新規ブタ凍結精液による人工授精法の開発に成功した (図 1)。ブタの凍結精液作製に関する研究の歴史は長いが、現在までに行われてきた研究は、その技術的改良が主であった。本研究成果は、精子と精漿の生理学的機能を解明し、その基礎的知見を基にした新しい技術開発であり、

それによりブタ凍結精液による人工授精が初めて実用化レベルに達した。本技術が養豚業に広く普及されれば、生産性向上や経営の安定化など養豚業の発展に大きく寄与するであろう。また、本成果の基礎的な知見は、胚移植などの家畜の生殖工学の発展にも貢献することが期待される。

凍結処理



融解処理(養豚農家における種付け)

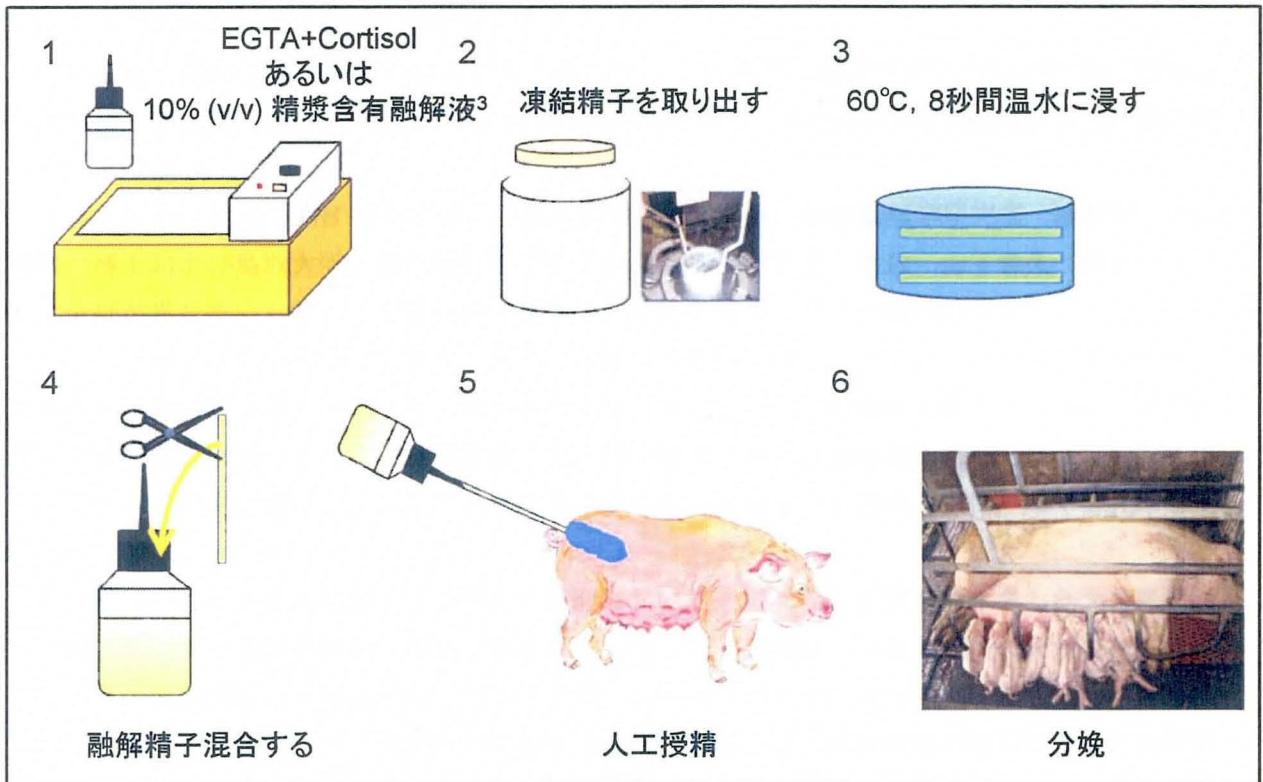


図1. 新規ブタ凍結精液による人工授精法の概要

採精後15分以内に精漿除去し、凍結用希釈液mNSF1/2を用いて凍結する。10% (v/v)精漿あるいはCortisolを添加した融解液を用いて人工授精を行う。

¹ 100 μ g/mlPMB+Penicillin G添加前処理液

²mNSF-1; NSF-1希釈液の浸透圧を400mOsm/kgに調整し、100 μ g/mlのPMBを添加したもの。mNSF-2はmNSF-1に1.5%のOEP及び4%のglycerol(最終glycerol濃度2%)を添加したもの

³ 精漿は液状精液による人工授精で80%以上の受胎率を示す雄ブタから採取する。6mM EGTAと5 μ g Cortisolを添加する

謝辞

本研究を遂行し、とりまとめるに際し、ご指導ご鞭撻を賜った広島大学大学院生物圏科学研究科 家畜生殖学研究室 准教授 島田昌之 博士に深謝の意を表します。

これまで有益なご教示を賜りました生物圏科学研究科 家畜生殖学研究室 教授 前田照夫 博士および同研究科 家畜生体機構学研究室 教授 吉村幸則 博士に厚く御礼申し上げます。また、本研究を博士論文に取りまとめるに際し、懇切なるご助言を下された生物圏科学研究科 免疫生物学研究室 教授 古澤修一 博士および同研究科 動物資源科学研究室 准教授 田辺創一 博士に感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、精漿中 cortisol 濃度測定は生物圏科学研究科 家畜生体機構学 准教授 磯部直樹 博士，蛍光顕微鏡の使用に関しては分子栄養学研究室 准教授 矢中規之 博士にご協力頂き、ここに感謝の意を表します。

本研究遂行時や論文の執筆時において、多大なるご指導とご助言を頂いた京都大学 医学部 名誉教授 森崇英 博士，Baylor College of Medicine 教授 JoAnne S. Richards 博士に厚く御礼申し上げます。

家畜生殖学研究室の OB であり現在、麻布大学 獣医学部 動物繁殖学研究室 准教授 伊藤潤哉 博士および鳥取大学 農学部獣医学科 応用動物学研究室 助教 山下泰久 博士には、研究分野が異なるにも関わらず終始熱意溢れるご教示を頂き、時には精神的な支えにもなって頂きました。また、同研究室の同級生であり、現在、医療法人社団レニア会 ウイメンズ・クリニック大泉学園の胚培養士である藤田陽子 女史とは研究に対する討論や実験を共に行い、同研究室の後輩である川島一公 氏，三原敏敬 氏，野間紀孝 氏には本研究に対して多数協力して頂きました。本研究を遂行し、完結する上で多くのご協力を賜った上述の皆様、厚く御礼申し上げます。

博士課程への社会人入学および本研究の推進において、様々なご配慮を頂きました大分県農林水産研究センター畜産試験場 場長 甲斐照孝 氏，同 元場長 小田原利美 氏（現在 社団法人 大分県畜産協会 事務局長），同 元次長 中村進 氏，同 中小家畜・環境担当 元総括 阿部正八郎 氏（現在 大分家畜保健衛生所 総括）さらには、同試験場の職員の方々に深謝致します。特に、本研究の遂行のため、多くの出張を重ねた際など様々な形でご協力頂いた大分県農林水産研究センター畜産試験場 中小家畜・環境担当 総括 手島久智 氏，主幹研究員 津田剛 氏，主幹研究員 吉田周司 氏，主任研究員 阿南加治男 氏，主任研究員 菅正和 氏，主任研究員 秋吉禎一 氏，さらには、技師の方々に感謝の意を表します。

最後に、本研究の遂行および論文の作成にあたり、暖かい目で見守ってくれた家族と多くの出張の際、息子 新の面倒をいつも見てくれた義理の両親，日々の研究生活において叱咤激励し，かつ，健康面を支えてくれた妻 尚美にこの場を借りて感謝の意を表します。

引用文献

- Abeydeera LR, Day BN. Fertilization and subsequent development in vitro of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol Reprod*, 1997; 57: 729-734.
- Aboagla EM, Terada T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod*, 2003; 69: 1245-1250.
- Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 2003; 3: 745-747.
- Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggestt S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*, 1999; 285: 736-739.
- Almiñana C, Gil MA, Cuello C, Roca J, Vazquez JM, Rodriguez-Martinez H, Martinez EA. Adjustments in IVF system for individual boars: value of additives and time of sperm-oocyte co-incubation. *Theriogenology*. 2005; 64:1783-1796.
- Almlid T, Johnson LA. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J Anim Sci*. 1988; 66:2899-29905.
- Althouse GC, Kuster CE, Clark SG, Weisiger RM. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*. 2000; 53:1167-1176.
- Althouse GC, Lu KG. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*. 2005; 63:573-584.
- Appelmelk BJ, An YQ, Geerts M, Thijs BG, de Boer HA, MacLaren DM, de Graaff J, Nuijens JH. Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect Immun*. 1994; 62:2628-2632.
- Arienti G, Carlini E, Polci A, Cosmi EV, Palmerini CA. Fatty acid pattern of human prostasome lipid. *Arch Biochem Biophys*. 1998; 358:391-395.
- Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M, Florman HM. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96:6757-6762.
- Arriola J, Foote RH. Effects of amikacin sulfate on the motility of stallion and bull spermatozoa at different temperatures and intervals of storage. *J Anim Sci*. 1982; 54: 105-110.
- Back DG, Pickett BW, Voss JL, Seidel GE Jr. Effect of antibacterial agents on the motility of stallion spermatozoa at various storage times, temperatures and dilution ratios. *J Anim Sci*. 1975; 41:137-143.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci*. 2000; 5:E110-123.

- Ball BA, Vo A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J Androl.* 2001; 22:1061-1069.
- Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl.* 2000; 21:1-7.
- Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank.* 2009;10:49-62.
- Barthelemy C, Royere D, Hammah S, Lebos C, Tharanne MJ, Lansac J. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. *Arch Androl.* 1990; 25:29-40.
- Barton SC, Surani MA, Norris ML. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature.* 1984; 311:374-376.
- Bathgate R, Grossfeld R, Susetio D, Ruckholdt M, Heasman K, Rath D, Evans G, Maxwell WM. Early pregnancy loss in sows after low dose, deep uterine artificial insemination with sex-sorted, frozen-thawed sperm. *Anim Reprod Sci.* 2008; 104:440-444.
- Berger T, Clegg ED. Effect of male accessory gland secretions on sensitivity of porcine sperm acrosomes to cold shock, initiation of motility and loss of cytoplasmic droplets. *J Anim Sci.* 1985. 60:1295-1302.
- Blois SM, Joachim R, Kandil J, Margni R, Tometten M, Klapp BF, Arck PC. Depletion of CD8+ cells abolishes the pregnancy protective effect of progesterone substitution with dydrogesterone in mice by altering the Th1/Th2 cytokine profile. *J Immunol.* 2004; 172:5893-5899.
- Blois SM, Kammerer U, Alba Soto C, Tometten MC, Shaikly V, Barrientos G, Jurd R, Rukavina D, Thomson AW, Klapp BF, Fernández N, Arck PC. Dendritic cells: key to fetal tolerance? *Biol Reprod.* 2007; 77:590-598.
- Bollwein H, Petschow K, Weber F, Leiding C, Stolla R. The incidence of agglutination and its influence on sperm quality and fertility of boar semen. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2004; 117:327-333.
- Bollwein H, Fuchs I, Koess C. Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Reprod Domest Anim.* 2008; 43:189-195.
- Borg KE, Lunstra DD, Christenson RK. Semen characteristics, testicular size, and reproductive hormone concentrations in mature duroc, meishan, fengjing, and minzhu boars. *Biol Reprod.* 1993; 49:515-521.
- Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod.* 2006; 21:2876-2881.
- Bourc'his D, Le Bourhis D, Patin D, Niveleau A, Comizzoli P, Renard JP, Viegas-Péquignot E. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr Biol.* 2001; 11:1542-1546.

- Breining E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM, Beconi MT. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*. 2005; 63:2126-2135.
- Buhr MM, Curtis EF, Kakuda NS. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*. 1994; 31:224-238.
- Buhr MM, Fiser P, Bailey JL, Curtis EF. Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *J Androl*. 2001; 22:961-969.
- Bwanga CO, Einarsson S, Rodriguez-Martinez H. Cryopreservation of boar semen. II: Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini- and maxi-straws and plastic bags. *Acta Vet Scand*. 1991; 32:455-461.
- Caballero I, Vazquez JM, Centurión F, Rodríguez-Martinez H, Parrilla I, Roca J, Cuello C, Martinez EA. Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. *Reprod Domest Anim*. 2004; 39:370-375.
- Callies C, Cooper TG, Yeung CH. Channels for water efflux and influx involved in volume regulation of murine spermatozoa. *Reproduction*. 2008; 136:401-410.
- Cameron RD, Beebe LF, Blackshaw AW. Cryopreservation and transfer of pig embryos. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 2006; 62:277-291.
- Carlini E, Palmerini CA, Cosmi EV, Arienti G. Fusion of sperm with prostasomes: effects on membrane fluidity. *Arch Biochem Biophys*. 1997; 343:6-12.
- Carvajal G, Cuello C, Ruiz M, Vázquez JM, Martínez EA, Roca J. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *J Androl*. 2004; 25:389-396.
- Chaouat G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol*. 2007a;29:95-113.
- Chaouat G, Dubanchet S, Ledée N. Cytokines: Important for implantation? *J Assist Reprod Genet*. 2007b; 24:491-505.
- Chauhan MS, Kapila R, Gandhi KK, Anand SR. Acrosome damage and enzyme leakage of goat spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *Andrologia*. 1994; 26:21-26.
- Chun J, Prince A. Activation of Ca²⁺-dependent signaling by TLR2. *J Immunol*. 2006; 177:1330-1337.
- Constância M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, Stewart F, Kelsey G, Fowden A, Sibley C, Reik W. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature*. 2002; 417:945-948.
- Corcuera BD, Marigorta P, Sagúés A, Saiz-Cidoncha F, Pérez-Gutiérrez JF. Effect of lactose and glycerol on the motility, normal apical ridge, chromatin condensation and chromatin stability of frozen boar spermatozoa. *Theriogenology*. 2007; 67:1150-1157.
- Courtens JL, Ekwall H, Paquignon M, Plöen L. Preliminary study of water and some element contents in boar spermatozoa, before, during and after freezing. *J Reprod Fertil*. 1989; 87:613-626.
- Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil Steril*. 1988; 50:314-320.

- Cross NL. Multiple effects of seminal plasma on the acrosome reaction of human sperm. *Mol Reprod Dev.* 1993; 35:316-323.
- Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod.* 2000; 5:46-52.
- Davis B, Niwa K. Inhibition of mammalian fertilization in vitro by membrane vesicles from seminal plasma. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1974; 146:11-16.
- De Bosscher K, Haegeman G. Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol Endocrinol.* 2009; 23:281-291.
- De Leeuw FE, Chen HC, Colenbrander B, Verkleij AJ. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology.* 1990; 27:171-183.
- Diemer T, Ludwig M, Huwe P, Hales DB, Weidner W. Influence of urogenital infection on sperm function. *Curr Opin Urol.* 2000; 10:39-44.
- Dobrinsky JR. Cryopreservation of pig embryos: adaptation of vitrification technology for embryo transfer. *Reprod Suppl.* 2001; 58:325-333.
- Domino SE, Garbers DL. The fucose-sulfate glycoconjugate that induces an acrosome reaction in spermatozoa stimulates inositol 1,4,5-trisphosphate accumulation. *J Biol Chem.* 1988; 263:690-695.
- Dumitraşcu D. Mast cells as potent inflammatory cells. *Rom J Intern Med.* 1996; 34:159-172.
- Durham SR. The inflammatory nature of allergic disease. *Clin Exp Allergy.* 1998; 28 Suppl 6:20-24.
- Eley A, Pacey AA, Galdiero M, Galdiero M, Galdiero F. Can Chlamydia trachomatis directly damage your sperm? *Lancet Infect Dis.* 2005; 5:53-57.
- Elin RJ, Robinson RA, Levine AS, Wolff SM. Lack of clinical usefulness of the limulus test in the diagnosis of endotoxemia. *N Engl J Med.* 1975; 293:521-524.
- Eriksson BM, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, Lucas X, Rodriguez-Martinez H. Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology.* 2001; 55:1593-1605.
- Estienne MJ, Harper AF, Day JL. Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18 degrees C. *Reprod Biol.* 2007; 7:221-231.
- Fahning ML, Garcia MA. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology.* 1992; 29:1-18.
- Fiser PS, Ainsworth L, Langford GA. Effect of osmolality of skim-milk diluents and thawing rate on cryosurvival of ram spermatozoa. *Cryobiology.* 1981; 18:399-403.
- Fiser PS, Fairfull RW. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology.* 1984; 21:542-551.
- Florman HM, First NL. The regulation of acrosomal exocytosis. I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro. *Dev Biol.* 1988; 128:453-463.
- Fournier B, Philpott DJ. Recognition of Staphylococcus aureus by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18:521-540.
- Fumarola D, Munno I, Monno R, Miragliotta G. Lipopolysaccharides of Rickettsiaceae and the Limulus

- endotoxin assay. *G Bacteriol Virol Immunol.* 1979; 72:40-43.
- Funahashi H, Sano T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. *Theriogenology.* 2005; 63:1605-1616.
- Gadea J, García-Vazquez F, Matás C, Gardón JC, Cánovas S, Gumbao D. Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *J Androl.* 2005; 26:396-404.
- Gao DY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser JK. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod.* 1993; 49:112-123.
- Gao DY, Liu J, Liu C, McGann LE, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser ES, Critser JK. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum Reprod.* 1995; 10:1109-1122.
- Gilmore JA, McGann LE, Liu J, Gao DY, Peter AT, Kleinhans FW, Critser JK. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 1995; 53:985-995.
- Gilmore JA, Du J, Tao J, Peter AT, Critser JK. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *J Reprod Fertil.* 1996; 107:87-95.
- Gilmore JA, Liu J, Peter AT, Critser JK. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biol Reprod.* 1998; 58:28-36.
- Girard R, Pedron T, Uematsu S, Balloy V, Chignard M, Akira S, Chaby R. Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. *J Cell Sci.* 2003; 116:293-302.
- Gopichandran N, Ekbote UV, Walker JJ, Brooke D, Orsi NM. Multiplex determination of murine seminal fluid cytokine profiles. *Reproduction.* 2006; 131:613-621.
- Guérin B, Pozzi N. Viruses in boar semen: detection and clinical as well as epidemiological consequences regarding disease transmission by artificial insemination. *Theriogenology.* 2005; 63:556-572.
- Guthrie HD, Liu J, Critser JK. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod.* 2002; 67:1811-1816.
- Gutsche S, von Wolff M, Strowitzki T, Thaler CJ. Seminal plasma induces mRNA expression of IL-1beta, IL-6 and LIF in endometrial epithelial cells in vitro. *Mol Hum Reprod.* 2003; 9:785-791.
- Hamamah S, Royère D, Nicolle JC, Paquignon M, Lansac J. Effects of freezing-thawing on the spermatozoon nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reprod Nutr Dev.* 1990; 30:59-64.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl.* 1990; 11:73-88.
- Harris CL, Vigar MA, Rey Nores JE, Horejsi V, Labeta MO, Morgan BP. The lipopolysaccharide co-receptor CD14 is present and functional in seminal plasma and expressed on spermatozoa.

- Immunology*. 2001; 104:317-323.
- Henry MA, Noiles EE, Gao D, Mazur P, Critser JK. Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertil Steril*. 1993; 60:911-918.
- Hernández M, Roca J, Gil MA, Vázquez JM, Martínez EA. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology*. 2007; 67:1436-1445.
- Hinkovska-Galcheva V, Petkova D, Koumanov K. Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. *Cryobiology*. 1989; 26:70-75.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*. 1999; 162:3749-3752.
- Homonnai TZ, Sasson S, Paz G, Kraicer PF. Improvement of fertility and semen quality in men treated with a combination of anticongestive and antibiotic drugs. *Int J Fertil*. 1975; 20:45-49.
- Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Li WY. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Cryobiology*. 2008; 57:257-262.
- Hu JH, Li QW, Li G, Jiang ZL, Bu SH, Yang H, Wang LQ. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Anim Reprod Sci*. 2009; 112:107-118.
- Iritani A, Shirayama K, Nishikawa Y. Conception results with frozen bull semen stored for long term (16 years). IX, Inter. Congre. Anim. Reprod. Artif. Insem. III. *Symposia Madrid*1980: 388.
- Jacobs DM, Morrison DC. Inhibition of the mitogenic response to lipopolysaccharide (LPS) in mouse spleen cells by polymyxin B. *J Immunol*. 1977; 118:21-27.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Zaneveld LJ. Nonbeneficial effects of glycerol on the oocyte penetrating capacity of cryopreserved and incubated human spermatozoa. *Cryobiology*. 1985; 22:434-437.
- Jiang D, Liang J, Li Y, Noble PW. The role of Toll-like receptors in non-infectious lung injury. *Cell Res*. 2006; 16:693-701.
- Johnson LA, Aalbers JG, Willems CM, Sybesma W. Use of spermatozoa for artificial insemination. I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. *J Anim Sci*. 1981; 52:1130-1136.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci*. 2000; 62:143-172.
- Kaeoket K, Persson E, Dalin AM. Influence of pre-ovulatory insemination and early pregnancy on the infiltration by cells of the immune system in the sow endometrium. *Anim Reprod Sci*. 2003; 75:55-71.

- Kaecket K, Persson E, Dalin AM. Influence of pre-ovulatory insemination and early pregnancy on the distribution of CD2, CD4, CD8 and MHC class II expressing cells in the sow endometrium. *Anim Reprod Sci.* 2003; 76:231-424.
- Kanwar KC, Yanagimachi R, Lopata A. Effects of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 1979; 31:321-327.
- Katsanos GS, Anogeianaki A, Orso C, Tetè S, Salini V, Antinolfi PL, Sabatino G. Mast cells and chemokines. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2008; 22:145-151.
- Kawano N, Shimada M, Terada T. Motility and penetration competence of frozen-thawed miniature pig spermatozoa are substantially altered by exposure to seminal plasma before freezing. *Theriogenology.* 2004; 61:351-364.
- Kharenko NI. Microbial contamination of boar sperm. *Veterinariia.* 1975; 82-85.
- Kikuchi K, Kashiwazaki N, Noguchi J, Shimada A, Takahashi R, Hirabayashi M, Shino M, Ueda M, Kaneko H. Developmental competence, after transfer to recipients, of porcine oocytes matured, fertilized, and cultured in vitro. *Biol Reprod.* 1999; 60:336-340.
- Kim J, Han DU, Choi C, Chae C. Simultaneous detection and differentiation between porcine circovirus and porcine parvovirus in boar semen by multiplex seminested polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci.* 2003; 65:741-744.
- Koppang N, Filseth O. The bacteria flora of semen and prepuce in boars. *Nord. Vet. Med.* 1958; 10:603-609.
- Kozdrowski R, Dubiel A. The effect of season on the properties of wild boar (*Sus scrofa* L.) semen. *Anim Reprod Sci.* 2004; 80:281-289.
- Kozumplík J. The effect of modifiers of surface tension on the morphology and motility of boar sperm after thawing. *Vet Med (Praha).* 1983; 28:273-278.
- Kozumplík J, Vlcek Z. The effect of apramycin on bacterial contamination and the survival of boar semen during a short preservation period. *Vet Med (Praha).* 1984; 29:479-487.
- Kumar S, Millar JD, Watson PF. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology.* 2003; 46:246-253.
- Lane SJ, Lee TH. Mast cell effector mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 1996; 98:S67-71; discussion S71-72.
- Larsson K. Fertility of deep frozen boar spermatozoa at various intervals between insemination and induced ovulation: influence of boars and thawing diluents. *Acta Vet Scand.* 1976; 17:63-73
- Lasley JF, Bogart R. A comparative study of epididymal and ejaculated spermatozoa of the boar. *J Anim Sci.* 1944; 3:360-370.
- Latham KE, Doherty AS, Scott CD, Schultz RM. Igf2r and Igf2 gene expression in androgenetic, gynogenetic, and parthenogenetic preimplantation mouse embryos: absence of regulation by genomic imprinting. *Genes Dev.* 1994; 8:290-299.

- Lewis SEM, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res.* 2005; 322:33-41.
- Li XP, Do KT, Kim JJ, Huang J, Zhao SH, Lee Y, Rothschild MF, Lee CK, Kim KS. Molecular characteristics of the porcine DLK1 and MEG3 genes. *Anim Genet.* 2008; 39:189-192.
- Liu Z, Foote RH. Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. *J Dairy Sci.* 1998; 81:1868-1873.
- Lovelock JE, Polge C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Biochem J.* 1954; 58:618-622.
- Lovelock JE. The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1957; 147:427-433.
- Maes D, Nauwynck H, Rijsselaere T, Mateusen B, Vyt P, de Kruif A, Van Soom A. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview. *Theriogenology.* 2008; 70:1337-1345.
- Magnus O, Brekke I, Abyholm T, Purvis K. Effects of manganese and other divalent cations on progressive motility of human sperm. *Arch Androl.* 1990; 24:159-166.
- Malm J, Nordahl EA, Bjartell A, Sørensen OE, Frohm B, Dentener MA, Egesten A. Lipopolysaccharide-binding protein is produced in the epididymis and associated with spermatozoa and prostasomes. *J Reprod Immunol.* 2005; 66:33-43.
- Matthijs A, Harkema W, Engel B, Woelders H. In vitro phagocytosis of boar spermatozoa by neutrophils from peripheral blood of sows. *J Reprod Fertil.* 2000; 120:265-273.
- Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature.* 2000; 403:501-502.
- Mazur P, Leibo SP, Seidel GE Jr. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. *Biol Reprod.* 2008; 78:2-12.
- Mazurová J, Vinter P. The effect of selected antibiotics on microorganisms contaminating boar ejaculate. *Vet Med (Praha).* 1991; 36:213-223.
- McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryo-genesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell.* 1984; 37:179-183.
- McLaughlin EA, Ford WC, Hull MG. The contribution of the toxicity of a glycerol-egg yolk-citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation. *J Reprod Fertil.* 1992; 95:749-754.
- Medrano A, Watson PF, Holt WV. Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reproduction.* 2002; 123:315-322.
- Mishra DP, Pal R, Shaha C. Changes in cytosolic Ca²⁺ levels regulate Bcl-xS and Bcl-xL expression in spermatogenic cells during apoptotic death. *J Biol Chem.* 2006; 281:2133-2143.
- Moretti E, Capitani S, Figura N, Pammolli A, Federico MG, Giannerini V, Collodel G. The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *J Assist Reprod Genet.* 2009; 26:47-56.

- Müller K, Pomorski T, Müller P, Herrmann A. Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. *J Cell Sci.* 1999; 112:11-20.
- Murase T, Imaeda N, Yamada H, Miyazawa K. Seasonal changes in semen characteristics, composition of seminal plasma and frequency of acrosome reaction induced by calcium and calcium ionophore A23187 in Large White boars. *J Reprod Dev.* 2007; 53:853-865.
- Niemetz J, Morrison DC. Lipid A as the biologically active moiety in bacterial endotoxin (LPS)-initiated generation of procoagulant activity by peripheral blood leukocytes. *Blood.* 1977; 49:947-956.
- Nishikawa K, Saito S, Morii T, Hamada K, Ako H, Narita N, Ichijo M, Kurahayashi M, Sugamura K. Accumulation of CD16-CD56+ natural killer cells with high affinity interleukin 2 receptors in human early pregnancy decidua. *Int Immunol.* 1991; 3:743-750.
- Nishizono H, Shioda M, Takeo T, Irie T, Nakagata N. Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury. *Biol Reprod.* 2004; 71:973-978.
- Ochsendorf FR. Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia.* 2008; 40: 72-75.
- O'Leary S, Jasper MJ, Warnes GM, Armstrong DT, Robertson SA. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. *Reproduction.* 2004; 128:237-247.
- Ollero M, Bescós O, Cebrián-Pérez JA, Muñio-Blanco T. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology.* 1998; 49:547-555.
- Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol.* 2000; 10:475-478.
- Palladino MA, Johnson TA, Gupta R, Chapman JL, Ojha P. Members of the Toll-like receptor family of innate immunity pattern-recognition receptors are abundant in the male rat reproductive tract. *Biol Reprod.* 2007; 76:958-964.
- Pålsson-McDermott EM, O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology.* 2004; 113:153-162.
- Park CH, Kim HS, Lee SG, Lee CK. Methylation status of differentially methylated regions at Igf2/H19 locus in porcine gametes and preimplantation embryos. *Genomics.* 2009; 93:179-186.
- Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology.* 1992; 29:255-266.
- Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology.* 1992; 38:209-222.
- Peláez J, Breininger E, Alegre B, Peña FJ, Domínguez JC. In vitro evaluation of the quality and fertilizing capacity of boar semen frozen in 0.25 ml straws. *Reprod Domest Anim.* 2006; 41:153-161.
- Pena FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology.* 2003; 60:677-689.

- Pettitt MJ, Buhr MM. Extender components and surfactants affect boar sperm function and membrane behavior during cryopreservation. *J Androl.* 1998; 19:736-746.
- Philpott M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br Vet J.* 1993; 149:339-369.
- Pilikian S, Czyba JC, Guerin JF. Effects of various concentrations of glycerol on post-thaw motility and velocity of human spermatozoa. *Cryobiology.* 1982; 19:147-153.
- Perdichizzi A, Nicoletti F, La Vignera S, Barone N, D'Agata R, Vicari E, Calogero AE. Effects of tumour necrosis factor-alpha on human sperm motility and apoptosis. *J Clin Immunol.* 2007; 27:152-162.
- Petters RM, Reed ML. Addition of taurine or hypotaurine to culture medium improves development of one- and two- cell pig embryos in vitro. *Theriogenology.* 1991; 235:253
- Pickett BW, Berndtson WE. Preservation of bovine spermatozoa by freezing in straws: a review. *J Dairy Sci.* 1974; 57:1287-1308.
- Plummer JM, Watson PF. Ultrastructural localization of calcium ions in ram spermatozoa before and after cold shock as demonstrated by a pyroantimonate technique. *J Reprod Fertil.* 1985; 75:255-263.
- Polge C. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at 79 degrees C. *Nature.* 1952; 169:626-627.
- Polge C, Rowson LE. Results with bull semen stored at -79 °C. *Vet Rec.* 1952; 864:851.
- Politch JA, Tucker L, Bowman FP, Anderson DJ. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Hum Reprod.* 2007; 22:2928-2935.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998; 282:2085-2088.
- Prieto C, Suárez P, Bautista JM, Sánchez R, Rillo SM, Simarro I, Solana A, Castro JM. Semen changes in boars after experimental infection with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Theriogenology.* 1996; 45: 383-395.
- Pursel VG, Johnson LA, Rampacek GB. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J Anim Sci.* 1972; 34:278-283.
- Pursel VG, Johnson LA, Schulman LL. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J Anim Sci.* 1973; 37:528-531.
- Pursel VG, Johnson LA. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci.* 1975; 40:99-102.
- Rank RG, Bowlin AK, Reed RL, Darville T. Characterization of chlamydial genital infection resulting from sexual transmission from male to female guinea pigs and determination of infectious dose. *Infect Immun.* 2003; 71:6148-6154.
- 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.

- Robertson SA, Ingman WV, O'Leary S, Sharkey DJ, Tremellen KP. Transforming growth factor beta—a mediator of immune deviation in seminal plasma. *J Reprod Immunol*. 2002; 57:109-128.
- Robertson SA. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res*. 2005; 322:43-52.
- Robertson SA. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. *J Anim Sci*. 2007; 85:E36-44.
- Roca J, Carvajal G, Lucas X, Vazquez JM, Martinez EA. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*. 2003; 60:77-87.
- Roca J, Gil MA, Hernandez M, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J Androl*. 2004; 25:397-405.
- Roca J, Hernández M, Carvajal G, Vázquez JM, Martínez EA. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci*. 2006; 84:2692-2699.
- Royere D, Barthelemy C, Hamamah S, Lansac J. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. *Hum Reprod Update*. 1996; 2:553-559.
- Rozeboom KJ, Troedsson MH, Crabo BG. Characterization of uterine leukocyte infiltration in gilts after artificial insemination. *J Reprod Fertil*. 1998; 114:195-199.
- Rozeboom KJ, Troedsson MH, Rocha GR, Crabo BG. The chemotactic properties of porcine seminal components toward neutrophils in vitro. *J Anim Sci*. 2001; 79:996-1002.
- Rozeboom KJ, Reicks DL, Wilson ME. The reproductive performance and factors affecting on-farm application of low-dose intrauterine deposit of semen in sows. *J Anim Sci*. 2004; 82:2164-2168.
- Rubin SO, Andersson L, Boström K. Deep-freeze preservation of normal and pathologic human semen. *Scand J Urol Nephrol*. 1969; 3:144-150.
- Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, Evenson DP, Alvarez JG. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2002; 78:1215-1224.
- Shimada M, Nishibori M, Isobe N, Kawano N, Terada T. Luteinizing hormone receptor formation in cumulus cells surrounding porcine oocytes and its role during meiotic maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod*. 2003; 68:1142-1149.
- Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robanya I, Richards JS. Induced expression of pattern recognition receptors in cumulus oocyte complexes: novel evidence for innate immune-like functions during ovulation. *Mol Endocrinol*. 2006; 20:3228-3239.
- Shimada M, Yanai Y, Okazaki T, Noma N, Kawashima I, Mori T, Richards JS. Hyaluronan fragments generated by sperm-secreted hyaluronidase stimulate cytokine/chemokine production via the TLR2 and TLR4 pathway in cumulus cells of ovulated COCs, which may enhance fertilization. *Development*. 2008; 135:2001-2011.

- Sikka SC, Champion HC, Bivalacqua TJ, Estrada LS, Wang R, Rajasekaran M, Aggarwal BB, Hellstrom WJ. Role of genitourinary inflammation in infertility: synergistic effect of lipopolysaccharide and interferon-gamma on human spermatozoa. *Int J Androl.* 2001; 24:136-141.
- Silva PF, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology.* 2006; 65:958-978.
- Sone M, Ohmura K, Bamba K. Effects of various antibiotics on the control of bacteria in boar semen. *Vet Rec.* 1982; 111:11-14.
- Suarez SS. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol.* 2008; 52:455-462.
- Surani MAH, Barton SC. Development of gynogenic eggs in the mouse: Implications for parthenogenetic embryo. *Science.* 1983; 222:1034-1036.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005; 17:1-14.
- Tarter TH, Cunningham-Rundles S, Koide SS. Suppression of natural killer cell activity by human seminal plasma in vitro: identification of 19-OH-PGE as the suppressor factor. *J Immunol.* 1986; 136:2862-2867.
- Terabe M, Park JM, Berzofsky JA. Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth. *Cancer Immunol Immunother.* 2004; 53:79-85.
- Thurston LM, Watson PF, Mileham AJ, Holt WV. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J Androl.* 2001; 22:382-394.
- Thurston LM, Siggins K, Mileham AJ, Watson PF, Holt WV. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biol Reprod.* 2002; 66:545-554.
- Tominaga K. Cryopreservation and sexing of in vivo and in vitro-produced bovine embryos for their practical use. *J Reprod Dev.* 2004; 50:29-38.
- Treviño CL, Felix R, Castellano LE, Gutiérrez C, Rodríguez D, Pacheco J, López-González I, Gomora JC, Tsutsumi V, Hernández-Cruz A, Fiordelisio T, Scaling AL, Darszon A. Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca(2+) channels in mammalian male germ cells and sperm. *FEBS Lett.* 2004; 563:87-92.
- Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol.* 2004; 76:514-519.
- Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, Gil MA, Parrilla I, Cuello C, Carvajal G, Lucas X, Vazquez JL. Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination. *Theriogenology.* 2005; 63:536-547.
- Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR, Niwa K. Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J Reprod Fertil.* 1995; 104:305-313.

- Watson PF, Duncan AE. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology*. 1988; 25:131-142.
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*. 2000;60-61:481-92.
- Wennemuth G, Westenbroek RE, Xu T, Hille B, Babcock DF. CaV2.2 and CaV2.3 (N- and R-type) Ca²⁺ channels in depolarization-evoked entry of Ca²⁺ into mouse sperm. *J Biol Chem*. 2000; 275:21210-21217.
- Westendorf P, Richter L, Treu H. Deep freezing of boar sperma. Laboratory and insemination results using the Hülseberger paillete method. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 1975; 82:261-267.
- Wiggin HB, Almquist JO. Combinations of glycerol percent, glycerol equilibration time, and thawing rate upon freezability of bull spermatozoa in plastic straws. *J Dairy Sci*. 1975; 58:416-419.
- Wilmot I, Polge C. Recent progress in the deep-freeze preservation of boar semen. *J Reprod Fertil*. 1971; 25:301-302.
- Wilmot I, Polge C. The fertilizing capacity of boar semen stored in the presence of glycerol at 20, 5 and -79 degrees C. *J Reprod Fertil*. 1974; 38:105-113.
- Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev*. 2005; 206:306-335.
- Wira CR, Fahey JV. A new strategy to understand how HIV infects women: identification of a window of vulnerability during the menstrual cycle. *AIDS*. 2008; 22:1909-1917.
- Wu H, Wang H, Xiong W, Chen S, Tang H, Han D. Expression patterns and functions of toll-like receptors in mouse sertoli cells. *Endocrinology*. 2008; 149:4402-4412.
- Yamaguchi S, Funahashi H, Murakami T. Improved fertility in gilts and sows after artificial insemination of frozen-thawed boar semen by supplementation of semen extender with caffeine and CaCl₂. *J Reprod Dev*. 2009. In press.
- Yokota S, Ochi H, Ohtsuka H, Kato M, Noguchi H. Heterogeneity of the L-rhamnose residue in the outer core of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide, characterized by using human monoclonal antibodies. *Infect Immun*. 1989; 57:1691-1696.
- Yoshida C, Nakao T. Response of plasma cortisol and progesterone after ACTH challenge in ovariectomized lactating dairy cows. *J Reprod Dev*. 2005; 51:99-107.
- Zeng WX, Shimada M, Isobe N, Terada T. Survival of boar spermatozoa frozen in diluents of varying osmolality. *Theriogenology*. 2001; 56:447-458.
- Zeng WX, Terada T. Effects of methyl-beta-cyclodextrin on cryosurvival of boar spermatozoa. *J Androl*. 2001; 22:111-118.
- Zeng WX, Terada T. Protection of boar spermatozoa from cold shock damage by 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Theriogenology*. 2001; 55:615-627.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The Cell. 細胞の分子生物学第4版 株式会社ニュートンプレス, 2004.

- 白山勝彦, 入谷明, 西川義正, 大西宏. 液体窒素で長期 (20 年) 保存した牛凍結精液による受胎試験成績 人
工授精研誌, 1986;8,1:18-20.
- 鈴木達行ら. 最新バイオテクノロジー全書 家畜の繁殖と育種 農業図書株式会社, 1990.
- 曾根勝, 斉藤美英, 川原崎達雄. パーコール密度勾配遠心法を利用した源精液中の細菌除去について 静岡
県中小家畜試験場研究報告 1990;第3号7-11.
- 奈良信雄ら. スタンダード検査血液学 医歯薬出版株式会社, 2003.
- 西川義正, 入谷明, 加藤征史郎, 丹羽皓二. 牛凍結精液の長期 (4~13 年) 保管成績 凍結精液研究会報,
1976;49:1-3.
- 丹羽太左衛門. 豚凍結精液利用技術マニュアル 社団法人日本家畜人工授精師協会, 1989. (Hess et al., 1957
の記載あり)
- 丹羽太左衛門. 養豚ハンドブック 株式会社養賢堂発行, 1994.
- 正木淳二. 家畜人工授精講習会テキスト (家畜人工授精編) 社団法人日本家畜人工授精師協会, 2000.
- 毛利秀雄, 星元紀. 新編精子学 東京大学出版会, 2006.
- 山根ら. 豚病研究会報, 2009;54:8-14.
- 病性鑑定マニュアル 農林水産省消費・安全局監修, 2008.
- PRRS コントロール事例集 日本養豚開業獣医師協会(JASV)監修, 2007.
- 養豚基礎調査全国集計結果 社団法人日本養豚協会, 2008.