

博士論文

精子に発現する TLR2 および TLR4 の機能解析による
新規生殖補助技術の開発

平成 24 年 9 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

藤田 陽子

目次

第一章	緒論	4
第二章	ヒト精子における TLR2 と TLR4 の発現とその生理的役割の解明	
	序論	13
	材料および方法	15
	結果	20
	考察	22
	要約	24
	図および表	25
第三章	TLR2 および TLR4 遺伝子欠損マウスを用いた精子に発現する TLRs の機能解析	
	序論	30
	材料および方法	32
	結果	36
	考察	38
	要約	41
	図および表	42
第四章	ヒト精液中の細菌感染と内毒素の ART への影響と、内毒素の影響を抑制する精液処理法の開発	
	序論	46
	材料および方法	48
	結果	51
	考察	53
	要約	56
	図および表	57
第五章	総合論議	61

第六章	総括	67
	謝辞	70
	引用文献	71

第一章

緒論

1. 生殖工学の発展

1-1 体外受精・顕微授精の歴史

受精とは、受精能を獲得した精子が、受精可能な第2減数分裂中期まで成熟した卵内に侵入し、父性・母性の両染色体が融合し2倍体になるまでの連続的なプロセスを指す (Bavister et al., 2002)。体外受精動物では、射精された精子が卵に到達することで、上記のように受精が成立する。一方、哺乳動物などの体内受精を行う動物では、射精された精子が、受精の場である卵管膨大部にまで上向する必要がある。卵においても、体内で受精し、子宮内で胚が発生するために、選択された卵のみを卵巣から排卵するという仕組みを獲得している。したがって、哺乳動物において生殖工学および高度生殖補助医療を目的とした体外受精を行うためには、体内で起きる受精メカニズムを明らかにする必要がある。

卵巣内では、卵胞発育過程を経て選抜された排卵前卵胞が、下垂体から分泌される黄体形成ホルモン (Luteinizing hormone, LH) の刺激を受けることにより、卵の減数分裂を再開し、第二減数分裂中期に進行し、成熟する。この成熟卵は、排卵され、卵管膨大部で受精することから、初期の体外受精では、卵管から回収した成熟卵が用いられた。マウスでは、腹腔内に5 i. u. のPMSGを投与した48時間後に5 i. u. のhCGを投与し、その11~13時間後に排卵が起こる。したがって、hCG投与16時間後に、マウス卵管内から成熟卵を回収することができる (Iwamatsu et al., 1971)。また、ハムスターでは、膣内検査により発情が確認された後、20~30 i. u. のPMSGを投与し、その48時間後に20~30 i. u. のhCGを投与することで、卵管内から成熟卵が回収できる。しかし、この手法では、卵管を切除し、そこから成熟卵を回収するため、同一個体からくり返し採卵することができない。したがって、反復的な採卵が必至なヒトの不妊治療、ウシやブタなどの経済動物での生殖工学的利用では、新たな方法を開発する必要があった。

そこで、体外受精をヒトの不妊治療に用いることを計画したSteptoeとEdwardsは、卵胞発育を経腹超音波によりモニタリングし、卵胞が充分発育する時期を明らかとした。さらに、充分発育した時点において全身麻酔下の腹腔鏡下で、卵胞内から卵の回収を試みた。しかし、この方法で採卵された卵は、未成熟卵であり、受精可能な第二減数分裂中期まで体外で培養する必要があった。彼らが試みた1970年代では体外培養技術が不十分であったため、その体外受精卵の受精能は著しく低いものであった。そこで彼らは、排卵時期の決定を経腹超音波によるモニタリングに加えて尿中LH濃度測定も行い、LHサーージ出現後に採卵を行うという手法を考案した。しかし、この方法においても既に排

卵が起こっていることが多く、採卵の成功率はきわめて低いものであった。

この自然排卵周期において成熟卵を得ることは、上述のように排卵時期の特定が困難であることに加えて、ヒトでは単一卵胞のみが発達することから、たとえ最適時期に採卵を行っても得られる成熟卵は1つに過ぎない。この単一卵胞が排卵過程に至る仕組みは、卵胞発育期に卵胞が複数リクルートされるが、その中から優性卵胞が選択され、その他は閉鎖することに起因している。この自然排卵周期における卵胞選択は、内因性FSHの低下によりFSH受容体の発現量の低い卵胞でアポトーシスが高頻度に誘起され、その結果、卵胞が閉鎖することに起因している。そこで、内因性のFSHが低下する月経開始5日目以降において外因性FSHを投与し、複数の成熟卵胞を育てることが試みられた。しかし、外因性FSH投与は複数の卵胞発育を促進したが、一つ一つの卵胞の発育度は低いにも関わらず、それらが分泌するエストラジオール 17β の総量が充分量に達するために、早期のLHサージが誘起された。その結果、早期の排卵が生じ、採卵率の改善には至らなかった。そこで、早期の内因性LHサージを抑制し、排卵刺激を人為的に行えるようにするために、Gn-RHアゴニストを用いた調節卵巣刺激法が開発された (Porter et al., 1984)。この方法は、Gn-RHにより下垂体機能を一時的に消失させ、早期のLHサージが生じない条件とする。FSH投与により複数の卵胞を発達させ、hCG投与により排卵刺激を人為的に行うというものである。この調節卵巣刺激法により、成熟卵を複数個採取することが可能となった。また、これまでの腹腔鏡を用いた方法から、経膈超音波装置を用いることで、採卵が簡便化された (Cohen et al., 1986)。これらの過排卵刺激法と採卵術は、採卵効率が向上し、受精可能な卵を複数個、簡便な方法で採取できることから、広く利用されている。

精子が受精する能力を備える条件として、精巣上体で一定期間滞留し、精子成熟を完了すること、射出時に前立腺などの副生殖器官から分泌される精漿と混合されること、雌の生殖器内で一定期間存在し、代謝機能が変化することが必要である。Austin (1951) と Chang (1951) はそれぞれ、排卵直後の卵管内に精子を注入し、受精が起こるタイミングを観察した。その結果、精子注入8時間以降において、受精が観察された。この観察結果から、精子は一定期間雌性生殖路内に存在し、その期間に受精する能力を獲得していると結論づけ、この現象を精子の受精能獲得と定義した (Austin et al., 1951 ; Chang et al., 1951 ; Chang et al., 1959 ; Adams and Chang, 1962)。

精子の受精能獲得は、精子が子宮と卵管の両者を通過することで、効率よく誘起されることも明らかとなっている。すなわち、ウサギ精子を子宮に注入したとき、注入5～6時間で受精が認められるのに対して (Chang et al., 1955)、卵管へ直接注入したときには10～11時間必要である (Adams and Chang, 1962)。そこで、Chang et al. (1959) は、容易に精子を回収できる子宮単独培養で受精能獲得を誘起させ、体外受精により得られた4細胞期胚をレシピエント個体に移植し産仔を得ることに成功した (Chang et al., 1959)。さらに、Seitz et al. (1970) は、18時間の子宮内前培養により、80%以上

の受精率を得られることを示した。

このウサギを用いて開発された子宮内で精子を前培養する体外受精法は、多くの動物種でも検討されている。ラットでは、子宮内で4~5時間の培養を行うことにより、精子が受精能を獲得し、受精卵を得られたことが報告されている (Miyamoto and Chang, 1973)。ウシでは生体の子宮や卵管内で受精能を獲得した精子を回収することが困難である。そこで、食肉処理場から屠殺直後の発情子宮または卵管を採取し、その中で射出精子を3~4時間37°Cで培養することにより、受精卵が得られたとの報告がある (Iritani and Niwa, 1977)。このことにより、ウシ精子の受精能獲得は生体内の組織に限らず、生体外に取り出した組織でも受精能の獲得が可能であることが明らかとなった。また、PMSGとhCGを投与したウサギ子宮内にウシ精子を注入し、その12~14時間後に回収した時、体外受精で受精卵が得られた (Iritani and Niwa, 1977)。この結果は、ウシ精子の受精能獲得に種特異的因子が関与していないことを示している。また、発情期の雌ブタの卵管溶液と子宮内腔液を回収し、それらを添加した培養液でブタ精子を4.5~5時間培養した時、精子は受精能を獲得し、体外受精による受精卵から産仔が得られた (Iritani et al., 1978)。つまり、精子の受精能獲得は、子宮や卵管上皮細胞との接触によるのではなく、液性成分により誘導されることが明らかとなった。そこで、体外で受精能獲得を誘起する手法を開発するため、組織液に含有する因子の研究が行われた。

卵胞液は、排卵時に卵と共に卵管への放出されることから、卵管内での精子機能に何らかの影響をもたらすと考えられる。そこで、Yanagimachi et al. (1969)は、ウシ卵胞液の培地への添加効果を検討した。しかし、ウシ卵胞液の添加は、受精能獲得を誘起しなかった。一方、この卵胞液を56°C、30分の非動化处理を行い、受精能獲得培養液に添加すると精子は受精能を獲得した (Yanagimachi et al., 1969)。これは、非熱処理条件では、卵胞液に含まれる補体成分が精子を攻撃し、精子が受精能を獲得する前に、精子の運動性が低下したためと考えられる。組織液の主要成分として、熱に不安定な高分子であるグロブリンのみでなく熱に安定的な低分子のアルブミンも含まれている。このことから、受精能獲得因子は非動化处理後も安定的なアルブミンである可能性が推測された。そこで、卵胞液と同様に高濃度のアルブミンを含有する血清が、受精能獲得を誘起するか否かについても検討され、ハムスター精子の受精能獲得が、非動化处理したハムスター、ウサギ、およびヒト血清により誘起された (Yanagimachi et al., 1970)。さらに、ウシ血清から生成した粉末アルブミンを培養液中に添加した時、コントロール区であるアルブミン無添加の培養液では受精能獲得は認められなかったが、アルブミン単独添加区で精子は受精能を獲得したことも報告されている (Miyamoto et al., 1971)。これらのことから、受精能獲得用の培養液にはアルブミンを添加する必要があることが明らかとなった。

培養液中に添加したアルブミンは、受精能獲得時に精子膜からコレステロールを遊離する働きがある (Davis et al., 1979; Go and Wolf, 1985; Suzuki and Yanagimachi, 1989)。

精子膜からコレステロールが減少すると、精子膜の流動性が高められる (Yanagimachi et al., 1994). 精子細胞膜からコレステロールが減少することは、精子膜のコレステロールとリン脂質の比率を変化させる結果、細胞膜のラフト構造に変動が生じる。この変化も受精能獲得の誘起に関与していることが報告されている (Cross et al., 2004 ; Shadan et al., 2004 ; Kondoh et al., 2005). さらに、培養液中の HCO_3^- により精子細胞膜のコレステロールの分布が変わり、その変化がアルブミンによる細胞膜からのコレステロール除去を効率化することも報告されている (Flesch et al., 2001). また、排卵時に卵胞から放出される卵胞液中の High-density lipoprotein (HDL) が、細胞膜のコレステロールを結合することによって受精能獲得時の細胞膜の脂質成分の除去に関与していることがわかっている (Visconti et al., 1999). このように、精子の受精能獲得時には、精子細胞膜の流動性を高めるために、精子細胞膜のコレステロール分布を変化させることが必要である。

ウサギ精子では、培養液中にアルブミンと dbcAMP を添加し、体外受精を行うことによって受精卵が得られる (Rosado et al., 1974). この cAMP の増加はアデニル酸シクラーゼに由来しており、アデニル酸シクラーゼが欠損しているマウスでは、十分な受精能獲得が得られない (Esposite et al., 2004 ; Xie et al., 2006). 精子内で cAMP が増加すると、PKA が活性化し、各種タンパク質のチロシンリン酸化を誘起することが知られている。受精能を獲得したハムスター精子では、激しく運動している精子の鞭毛部分において、タンパク質のチロシンリン酸化が強く認められる (Si and Okuno, 1999). このことから、受精過程では、cAMP が増加することによって、PKA が活性化し、タンパク質チロシンリン酸化が起こることが明らかとなった。さらに、このアデニル酸シクラーゼの活性による cAMP の増加は、精子内に流入する Ca^{2+} に依存している (Chen et al., 2000 ; Xie et al., 2006 ; Carlson et al., 2007). この精子細胞内での Ca^{2+} 増加は、BSA や HCO_3^- による精子細胞膜コレステロール分布の変化に伴う膜流動性の変化による pH 上昇に起因している。これは、細胞膜のイオンチャンネルが活性化されること、細胞小器官に蓄えられている Ca^{2+} の放出により生じることが報告されている (Kirichok et al., 2006 ; Carlson et al., 2007). また、ヒト精子では、 Ca^{2+} ionophores 処理が、精子の受精能獲得を誘起すること (Suarez et al., 1992 ; Marquez and Suarez, 2007), 受精能を獲得したハムスター精子の細胞内の Ca^{2+} を免疫蛍光染色により観察すると、精子鞭毛中により強い反応が認められることが報告されており (Suarez et al., 1993), 培養液中の Ca^{2+} は精子の受精能獲得を誘起する因子において重要であることは明らかである。

Toyoda and Chang (1974) は、アルブミンとピルビン酸を添加し、この培養液を用いてラット精子の受精能獲得に成功した。マウス精子においても、アルブミン、ピルビン酸とラクトースを添加した培養液中で 1 時間培養することにより、受精能を獲得することが報告されている (Miyamoto and Chang, 1973). これらの因子を用いて解糖系とクエン酸回路により効率的に ATP 産生を行うことで、精子は運動性を高めることが可能となる

(Hereng et al., 2011). ウシ精子において、受精能獲得の際には ATP の必要量が増加すること (Garrett et al., 2008), ATP 生産を行うラクトース脱水素酵素である LDH-C4 をノックアウトしたマウスは精子受精能獲得不全により不妊となることから (Odet et al., 2008), ATP の生産は受精能獲得とその後の精子運動性に関与していることが示された.

これらのことをまとめると、アルブミンによる精子細胞膜のコレステロール量の減少が、精子細胞膜の流動性を高める。流動性が高まった細胞膜を介して、培養液中の Ca^{2+} , HCO_3^- が流入が起こる。このイオン濃度の増加は cAMP 増加を介して PKA を活性化し、精子内でタンパク質のチロシンリン酸化により精子の運動性が上昇する。さらに精子の運動性を維持するために ATP 産生が必要であり、この代謝経路のエネルギー源として糖類を添加することによって、完全な受精能の獲得がより短時間で可能となった。したがって、現在使用されている主な体外受精用培地である Tyrode' s 液や TCM 培地, HTF 培地には、アルブミンやグルコース、ピルビン酸などの糖類、炭酸水素ナトリウムや塩化カルシウムなどのイオン化合物が添加されている。

ウシなどの大型家畜の体外受精では、過排卵刺激を行った卵巣から経膈超音波を用い成熟卵を得る方法、もしくは、卵巣から得られた未成熟卵に体外成熟培養を行い、成熟卵を得ている。精子は優良形質を持つ個体由来のものを凍結保存して用いる。凍結融解後の精子は運動性が低いため、受精能獲得用の培養液にはアルブミンや糖類, Ca^{2+} , HCO_3^- の他にカフェインなどを添加し精子の培養を行い、媒精に用いる。このようにして得られた受精卵は、胚盤胞までの発育が可能であり、ガラス化法による凍結により融解後の生存性が向上した。ウシの体外受精での受胎率は、新鮮胚移植で 68.4%, ガラス化法での凍結融解胚移植で 83.3%であることが報告されている (Ogata et al., 2001)。ヒトの体外受精でも、過排卵刺激によって得られた成熟卵と受精能獲得を誘起した精子を媒精することによって体外受精胚を得ている。現在、ヒトでは多くの周期で体外受精が行われており、その妊娠率は 23%前後であることが、日本産科婦人科学会より報告されている。

体外受精を行うためには、受精能を獲得した精子が多数必要である。しかし、精液の中には、卵への進入能に乏しい運動性の弱い精子の割合が高い症例や、精子が著しく少ない症例、円形精子細胞のみなどの症例がある。また、凍結融解後の精子なども、著しく運動性が低下し、通常の体外受精を行うことが困難な場合がある。このような運動性の低い精子や精子細胞を人為的に受精させる手法として、精子を直接卵子内に注入し、受精させる卵細胞質内精子注入法 (intracytoplasmic sperm injection; 以下 ICSI) がある。Uehara et al. (1976) は、哺乳動物 ICSI の最初の成功例として、ハムスター卵に精巣上体、もしくは精巣内精子を注入し、前核形成を認めたことを報告した。その後、ウシ (Goto et al., 1990), ウサギ (Hosoi et al., 1993), マウス (Kimura et al., 1995), などで産仔を得た報告がある。ヒトでは、球形精子症症例の精子で ICSI を行い、受精

の成立を観察したことが報告され (Lanzendorf et al., 1988), その後, 最初の ICSI の児誕生が, Palermo et al. (1992)により報告されている. 顕微授精には, 卵子を直接精子に注入する以外に, 透明帯開口法として酸性タイロードやマイクロニードルなどで透明帯に小孔を開け精子が卵内に進入しやすくするもの (Gordon et al., 1988), 囲卵腔内に精子を数匹注入する囲卵腔内精子注入法なども報告されているが (Ng et al., 1989), いずれも受精率で十分な結果が得られず, 受精率の高い症例では, 多精子受精が高頻度に起こるといった問題点がある. ICSI はこれらの方法と比較して安定した受精率と多精子進入が起こらないことから, 現在の主流となっている.

現在, このような体外培養や ICSI の技術は, 核移植や ES 細胞, iPS 細胞の作出に活用されており, 優良家畜の育種, 改良, 増産を目的とした家畜繁殖技術として, また, 再生医療や難治性疾患の発症メカニズムや創薬・治療開発に応用が期待されている.

1-2 体外受精・ICSI の問題点

体外受精・ICSI の技術の進歩, 特に ICSI 技術を用いることで, 高い受精率が期待できると考えられるが, 未だ胚移植後の妊娠率は低く, 流産率は自然妊娠よりも高いことが知られている.

このような胚の発育停止, 着床不全, 流産の多くは, 胚の染色体異常に原因があると報告されている (Delhanty et al., 1993 ; Kamiguchi et al., 1993 ; Iwarsson et al., 1999 ; Wilton et al., 2003 ; Fragouli et al., 2006). ヒト胚の培養過程で染色体検査を行うと, 初期胚の段階では 75%の胚に染色体異常が認められ, 胚盤胞に到達した胚の約 56%, さらに形態が良好な胚盤胞でも 48%に染色体異常が認められる (Alfarawati et al., 2011). このように胚の染色体異常が高率に認められる原因として, 減数分裂過程の染色体の分配異常あるいは減数分裂後の染色体の断片化が挙げられる.

卵子側の要因としては, 減数分裂再開時の染色体の分離異常による DNA の断片化が多く認められ, これらは紡錘体形成不全に起因している. これらの紡錘体の異常は高齢の患者から用いられた卵に多い. 加齢とともに染色体異常が増加するのは, 卵の減数分裂の特異性によるものである. すなわち, 出生時にすでに第 1 減数分裂前期の大部分を終了し, その後休止している卵は, 時間の経過とともに紡錘体に活性酸素などの悪影響が蓄積されるため, 紡錘体による染色体の不分離を引き起こされる. また, 精子側の要因としても, 減数分裂時の染色体分配異常が報告されている (Chandley et al., 1995). このような先天的な精子 DNA の断片化は, 精液所見の精子濃度や運動率, 精子正常形態との間に負の相関があることが報告されている (Walter et al., 2004). しかし, ハムスター卵を用いた詳細な検討 (ハムスターテスト) の結果, 正常男性においても精子染色体異常頻度は約 10%, そのうち構造異常は 6-7%であり, 数的異常は 3-4%発生してい

る (Guttenbach et al., 1997). したがって、精子運動率や精子形態などの精液所見から精子 DNA の断片化を予測することは困難である (Rives et al., 1999).

また、精子側の因子として、先天的な染色体異常とは別に、射出後に生じる精子 DNA の断片化も胚発生や着床に影響を与えられられる。ラットでは、精子 DNA の断片化を人為的に高頻度に引き起こすと、約 80%で着床前に流産が生じる (Harrouk et al., 2000). また、マウスにおいても γ 線照射により精子 DNA を高頻度で断片化させると、胚盤胞形成率が低下することが報告されている (Ahmadi et al., 1999). 射出精子において DNA が断片する原因の 1 つとして、活性酸素の増加による酸化ストレスが報告されている (Aitken et al., 1997 ; Lopes et al., 1998 ; Shen et al., 2000) . 通常、精子は精漿内の抗酸化作用により保護されているが、過度の活性酸素は、細胞膜の不飽和脂肪酸を酸化し、精子膜機能を減退させる。その結果、精子運動性が低下し、精子と卵の融合能が消失することや (Aitken et al., 1993) , 受精したとしてもその後の胚発生と胚の生存性を低下させると報告されている (Nackerdien et al., 1991 ; Olinski et al., 1992 ; Altman et al., 1995) . 体内受精においては、活性酸素により細胞膜にダメージを受けた精子が受精する可能性は極めて低いと考えられている (Palermo et al., 1995) . しかし、体外での精子操作では、酸化ストレスの高い条件下であり、精子が活性酸素のダメージを受けやすい状況下である (Aitken et al., 1997) . さらに、体外受精、特に ICSI においては、このような DNA が断片化した精子を選択し、受精させている可能性があるため、精子 DNA の断片化が胚の生存性に影響する可能性が高い (Palermo et al., 1995) . また、活性酸素の産生には、白血球の増加が起因している。この白血球の増加は、精液中に細菌が混入することによる自然免疫応答によって起こりえることから、精子 DNA の断片化を誘起する精液中の活性酸素の増加は、精液中に細菌が混入することが原因となっている可能性が考えられた。

このように、胚の染色体異常の原因となりえる精子 DNA の断片化は、射精後の体外での操作によっても起こる可能性が高いと推測される (Bianchi et al., 1996). 大型家畜やヒトでは、父性由来の遺伝子は、桑実胚以降に急速に発現が上昇する (Ahmadi et al., 1999) . また、栄養膜細胞における胎盤形成は、父性由来の染色体から発現される遺伝子に依存することが報告されており (Borini et al., 2006) , 精子の染色体異常の影響は、桑実胚以降の胚発生の停止、胚盤胞形成不全や栄養膜細胞の機能低下による着床不全と流産を引き起こすと推測される。しかし、一般的に行われている精液検査は、肉眼的な検査に留まることが多く、精子 DNA の断片化までは標準的な検査項目にはなっていない。さらには、用いる精子を非侵襲的に DNA 正常性を判定すること、断片化を抑制する処理法などは開発されていない。したがって、精子の正常性を予測する方法を検討することは、体外受精・ICSI を成功させる上で必要なことと考えられる。

1-3 現在の精液検査法と問題点

ヒトで現在行われている一般的な精液採取法と精液検査法は以下の通りである。

(1) 精液採取

- ① 採取場所；サンプルの採取は，精液の気温変動への暴露を制限し，また採取から検査までの時間を管理するため，院内で採取する。
- ② 禁欲期間；サンプルは2～7日間の禁欲期間後，採取する。
- ③ 採取方法；精液サンプルはマスターベーションによって，滅菌したガラスもしくはプラスチック製広口容器中に，全量採取する。採取後の容器は20℃～37℃に保ち，精子への大きな温度変化をさける。

(2) 精液の肉眼的検査

- ① 液化；室温または37℃，大気下で15～60分間静置する。シリンジなどで吸引滴下し，完全に液化が得られてから検査を行う。精液量；重量法を原則とし，1 g=1 mlとする。
- ② 粘性；ピペットで2 cm以上液化精液が糸を引く状態では高いと判断する。
- ③ pH；精液を放置すると高くなるので，1時間以内にpH試験紙で測定する。pH7.2～7.4が正常である。
- ④ 顕微鏡的検査

検査項目は主に以下の通りである。

- ・ 精子濃度 (/ ml)
- ・ 総精子数
- ・ 精子運動率 (%)
- ・ 高速運動精子率 (%)
- ・ 正常形態率 (%)
- ・ 精子生存率 (%)

(3) その他の検査

- ・ 精液中の細菌培養検査・・・膿精液症の判定のため
- ・ 精子運動性評価
(精子自動分析装置；computer assisted sperm analyzer；CASA)
・・・精子頭部の運動軌跡を画像処理し，精子濃度，運動率，運動性の分類，運動速度，直進性を自動的に解析する。

上記のような検査項目で精子の性状を判定するが，運動性や形態の観察が主であり，精子の受精能などの機能性やDNAの断片化を観察するものではない。その他の精子を評価する方法としては，精子先体反応評価法やSperm penetration assay (SPA) などがある

が、これらは受精能を予測するものである。しかし、精子DNAの断片化とその精子を用いた体外受精由来胚の移植後の成績を判定するものではない。このため、精子DNAの断片化を予測できるような評価法が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

現在、広く行われている体外受精・ICSIは、受精率および胚盤胞期胚への発生率は高い。しかし、着床率は低く、流産率は高い。その原因として、卵や精子DNAの断片化が挙げられる。特に精子形成・成熟後のDNA断片化は、精漿への暴露や体外操作によって起こると考えられる。

ヒト射出精液は精子と精漿から成っており、精子は精漿の影響を大いに受けると考えられる。精漿中のタンパク質の変性は、男性生殖器の細菌感染により引き起こされ (Gonzales et al., 1993), このような症例では抗酸化作用が低下し、過度の活性酸素が産生されると報告されている (Pasqualotto et al., 2007)。これらの細菌感染や活性酸素の増加は、精子DNAを断片化する危険性が高まると報告されている (Agarwal et al., 2003)。精液中への細菌感染に対しては、抗生物質の処方や培養液中への抗生物質の添加を行っているが、その添加が精子DNAの安定化に及ぼす影響は不明である。これらのことから、精漿中の細菌感染が、精子DNAの断片化、精子の機能性および体外受精・ICSIの結果にどのように影響を与えるかを明らかにする必要があると考えた。

以上のことから、本研究では、ヒト体外受精・ICSIに用いる精子のDNA断片化に影響を及ぼすと考えられる因子、それらが精子の機能性や、体外受精・ICSI予後へ及ぼす影響を検討することにより、DNA断片化が起きた精子を効率的に除去し体外受精・ICSIに用いる方法を開発することを目的とした。第二章では、精子に影響を与えられ精漿中の因子として、精漿中の細菌感染の有無と、細菌から放出される内毒素濃度を測定し、それらが精子機能性に与える影響と体外受精・ICSIの結果に与える影響を検討した。第三章では、マウス精子を用いて、細菌から放出される内毒素を認識する作用機序の検討を行った。第四章では、体外受精・ICSIに用いる精子のDNA断片化精子を効率よく除去する方法を検討し、より質のよい精子を回収するための精子の処理法の開発を試みた。

第二章

ヒト精子における TLR2 と TLR4 の発現とその生理的役割の解明

序論

生殖器の細菌感染は、男性不妊要因の1つである (Anderson et al., 1988 ; Diemer et al., 2000 ; Eley et al., 2005 ; Ochsendorf et al., 2008). *N. gonorrhoeae* は、生殖器に感染する細菌であり、その重度の感染症例では白血球数の増加に伴って不妊を呈することが知られている (Ness et al., 1997). 特に、精巣や精巣上体への細菌感染は、精子形成不全や成熟不全を引き起こすことから、射出精子数の低下と奇形率が上昇する。一方、前立腺への細菌感染は、精漿成分の変性により精子機能が低下する (Ochsendorf et al., 1999 ; Althouse et al., 2000). すなわち、前立腺に炎症が認められると、精子の運動性が低くなると報告されている (Purvis and Christiansen, 1993). さらに、副生殖器官への細菌感染は、精液中への白血球の増加を引き起こし、それが精液中の活性酸素濃度を過剰に上昇させる結果、精子細胞膜の変性も引き起こされる (Zalata et al., 1998). このように、細菌感染は直接的あるいは間接的に精子の運動性の低下、受精能獲得、先体反応などの機能性低下を引き起こす (Gomez et al., 1998 ; Ochsendorf et al., 2008).

生体内に細菌などの異物が混入すると、細胞が炎症反応を起こす。炎症した細胞からは、白血球間の情報伝達を担うサイトカインであるインターロイキンや走化性を示すケモカインなどが分泌される。このようにして、白血球は炎症反応を起こした部位に集積する初期免疫応答を示す。さらに、細菌からは強い病原性を示す内毒素が放出されることが知られている。具体的には、グラム陽性菌は、細胞壁の主成分であるペプチドグリカンの内毒素として分泌する。グラム陰性菌の内毒素は、細胞壁外膜にあるリポ多糖であるリポポリサッカライド (lipopolisaccharide ; LPS) であり、Lipid A という活性中心を持つ。免疫担当細胞である白血球には、このような細菌から放出される内毒素を特異的に認識する Toll-like Receptor (TLR) が発現し、初期免疫応答を担っていることが明らかとなっている (Takeuchi et al., 1999 ; Takeda and Akira, 2005). ヒトやマウスにおいて、この TLR family は 11 種類同定されており、それぞれ認識する病原体が異なる。ペプチドグリカンは TLR2 に認識され (Muller et al., 2001), LPS は TLR4-CD14 に結合することにより、TLR4 に特異的に認識される (Poltorak et al., 1998 ; Hoshino et al., 1999). 非自己を認識した TLRs は、その下流シグナル伝達系を活性化することで、サイトカイン、ケモカインの発現・分泌を誘起することが知られている (Takeda and Akira, 2004 , 2005). このときに分泌されるサイトカインの一種である TNF- α は、多

くの細胞の膜表面に発現する type1-TNF α と結合することにより、アポトーシスを誘起する (Agarwall et al., 2003). 精子にもこの type1-TNF α が発現しており、ヒト射出精液中に TNF- α を加えると精子運動性が低下し、アポトーシスを起こした精子の割合が上昇すると報告されている (Perdichizzi et al., 2007). これらのことから、精液中の細菌感染による精子運動性の低下は、白血球からのサイトカイン分泌による自然免疫応答によって誘起されていると考えられてきた。

精液中の白血球数は、クラミジアなどの細菌感染が確認された症例において高くなるという報告がある。しかし、クラミジア感染の有無に関わらず白血球数は変化しないなど (Eggart-Kruse et al., 1996), 細菌感染と白血球の増加には関連が認められないとする報告もある (Trum et al., 1998). このことから、重篤な細菌感染と白血球数の増加が認められなくても、精液中への細菌の混入が、直接的に精子運動性を低下させる可能性が考えられる。

近年、免疫細胞以外においても TLR family などの免疫細胞関連遺伝子が発現していることが報告されている。排卵後の卵丘細胞卵子複合体においては、卵丘細胞に TLR2/4 が発現し、受精過程で産生される短鎖ヒアルロン酸により活性化され、ケモカイン類を発現、分泌する (Shimada et al., 2006, 2008). 精子には卵丘細胞から分泌されたケモカインを認識する受容体が存在し、ケモカインを認識することにより卵への走化性を示す (Shimada et al., 2006; Tamba et al., 2008). このことから、受精には、免疫機能に関わる遺伝子の発現が必要であり、精子にも免疫細胞様の機能を有していることが示された。さらに Palladino et al. (2008) は、ラット精子に 10 種類の TLR family の発現を報告している。これらのことから、精液中に混入している細菌が放出する内毒素は、白血球上の TLRs のみではなく、直接精子を刺激すると仮説立てた。

そこで本章では、ヒト精子の免疫機能の解明を目的とした。実験 1 は、精液の細菌培養検査を行い、ヒト精液中に存在する細菌種の同定を行った。また、細菌の有無と精液所見との関連を検討した。実験 2 では、実験 1 でヒト精液中にも細菌感染が認められたことから、細菌が放出する内毒素濃度の測定を行った。実験 3 では、ヒト精子における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*) およびグラム陰性菌の内毒素である LPS の受容体の TLR4 (*Tlr4*) について、RT-PCR, Westernblotting および immunofluorescence 法を用いて発現と局在を検出した。実験 4 では、精漿中の内毒素濃度が比較的低い症例に対して、LPS もしくは TLR2 のリガンドである Pam3Cys を添加し、精子の運動性と TUNEL 陽性率によるアポトーシスを検出し、精子の機能性に果たす TLR2/4 の役割の解明を試みた。

材料および方法

精液の回収, 精液所見の測定, 培養

精液は, 2009年2月から2010年11月にウイメンズ・クリニック大泉学園へ不妊治療のために通院し, 精液検査および, 体外受精・胚移植を行った症例のうち, インフォームドコンセントの得られた372症例とした. 精液のサンプルは, 3~5日間の禁欲期間の後に採取した. 精液の所見は, 約15~30分の液化の後, WHOの基準(World Health Organization, 2011)に基づき, 精液量, 精子濃度, 運動率, 奇形率, 白血球数を測定した.

精液は, 精液所見の測定後, 抗生物質であるゲンタマイシンを含む human follicular fluid (HFF99 ; Fuso chemical Co., Tokyo, Japan) に 5% human serum albumin (Irvine Scientific) を添加した培養液にて希釈した. 希釈後, 37°C, 5%CO₂環境下で6~24時間培養を行い, 培養後の運動率と TUNEL 陽性率を測定した. また, 細菌に感染していない症例の一部は, 100 ng/ml の LPS もしくは 10 µg/ml の Pam3Cys を培養液に添加し, 精子運動率と TUNEL 陽性率を測定した. TLR4 の合成リガンドである LPS は *Escherichia coli* 0111:B4 由来 (L4391, Sigma, St Louis, MO, USA) を, TLR2 の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-Ser-(Lys)₄₁ (Pam3Cys ; Calbiochem, Los Angeles, CA, USA) を mTBM で溶解し, -20°C に保存したものを使用した. さらに, 細菌に感染している症例に対しては, 100 µg/ml の polymyxin B (PMB) を培養液に添加し, 精子運動率と TUNEL 陽性率の測定を行った. PMB は, Sigma (Bio Chemika) から購入したものを HFF で希釈し, -20°C で保存したものを使用した.

細菌種の同定

細菌の培養は, 全てのサンプル (n=372) を 5% ヒツジ血清のトリプティックソイ血液寒天培地もしくは B. T. B. 乳糖寒天培地を用い, 37°C, 6.9%CO₂ 下で 24 時間好気培養を行った. 引き続き, それぞれの細菌のコロニーを培地から分離し, 5% (v/v) ヒツジ血清のトリプティックソイ血液寒天培地もしくは B. T. B. 乳糖寒天培地を用い, 37°C にてそれぞれ細菌の培養を行った. 培養した細菌種の同定と感受性の分析は, Vitek (Sismex Biomerieux, Tokyo, Japan) にて行った.

精漿中の LPS 濃度の測定

精漿中の LPS 濃度の測定は, limulus ES-II シングルテストワコー (WAKO chemical Co., Osaka, Japan) を用いたリムルステストにて行った (Elin et al., 1975). 精漿は, エンドトキシンフリーの希釈液で希釈後, 70°C 10 分の加熱処理を行った. 処理後, amebocyte lysate と混合し, Toxinometer-ET2000 (WAKO Pure Chemical Industries Ltd.)

を用い、37°C120 分間の比濁時間分析法にて LPS 濃度の測定を行った。

精漿中のペプチドグリカン濃度の測定

精漿中のペプチドグリカン濃度の測定は、SLP-HS シングル試薬テストワコー (WAKO Pure Chemical Industries Ltd.) を用いた SLP (silkworm larvae plasma) テストを用いて行った。精漿は、エンドトキシンプリーの希釈液で希釈後、90°C10 分の加熱処理を行った。処理後、SLP-HS (Silkworm Larvae Plasma High Sensitive) と混合し、Toxinometer-ET2000 (WAKO Pure Chemical Industries Ltd.) を用い、37°C、120 分間の比色時間分析法にて測定した。

RNA 抽出および RNA 濃度測定

RNeasy Mini Kit (250) (QIAGEN science, Germantown, MD, U. S. A.) を用いてマウス精巣上体精子から Total RNA を抽出した。Total RNA の濃度は、NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, MA, U. S. A.) を用いて 260 nm と 280 nm の吸光度を測定し、その測定値から Total RNA 濃度とその純度 (260 nm/280 nm) を算出した。Total RNA サンプルを逆転写に使用するまで -80°C で保存した。

逆転写反応

逆転写反応液の組成は、1 サンプルあたり AMV RT 5×Buffer (PROMEGA, Fitchburg, WI, U. S. A.) 4 μl, 2 mM Gene Amp dNTP Mix (Applied Biosystems, Lincoln Centre Drive Foster City, CA, U. S. A.) 8 μl, Oligo dT (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) 0.5 ul, AMV Reverse Transcriptase (PROMEGA) 0.25 μl を混合し 12.75 μl ずつ分注した。そこに 100 ng の Total RNA (7.25 μl) 加え、反応に用いた。

総量 20 μl の混合液を 48°C、75 分の条件で逆転写反応させ、94°C、5 分の条件下で酵素を失活させた。作製した cDNA を -30°C で保存した。

PCR

Tlr2 および *Tlr4* のプライマー配列は表 1 に示したものを使用した。

1 サンプルあたり 2×MightyAmp Buffer (Mg²⁺, dNTP plus) (Takara Bio. Co., Siga, Japan) 7.5 μl, ddH₂O 3.8 μl, MightyAmp™ DNA Polymerase (Takara Bio. Co., Siga, Japan) 0.2 μl を混合し、目的の遺伝子ごとに設計した Forward Primer 0.75 μl, Reverse Primer 0.75 μl, cDNA 2 μl の計 15 μl の反応液を作製後、98°C 2 分間の条件下で cDNA を解離させたあと、98°C 10 秒, X°C 15 秒, 68°C 2 分を 35 サイクル行い、DNA を増幅した。

反応後、68°C 5 分の条件で PCR 産物を安定化させ、15°C まで冷却した PCR 産物に Roding Buffer (Takara) を混合し、ethidium bromide (NIPPON GENE, Tokyo, Japan)

を添加した 1.5% (w/v) アガロースゲル (Nakarai tesque) を用い、TBE 溶液中で 100 V 定電圧条件により電気泳動した。

電気泳動後、紫外線照射により PCR 産物を検出した。

TLR2 および TLR4 の蛍光免疫染色法

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 時間室温ブロッキングを行った。M. O. MTM Protein Concentrate で各一次抗体 (anti-TLR2 antibody, Mab mTLR2, InvivoGen, San Diego, CA, USA), anti-TLR4 antibody (Mab mTLR4/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 (Vecrashield 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。

TLR2, TLR4 の Western Blotting による検出

TLR2/4 のポジティブコントロールとしてヒト白血球を回収した。ヒト白血球は、真空採血管で採血を行った後、Lymphoplep 溶液 (コスモバイオ co.) を用いた密度勾配遠心法にて回収した。回収した白血球をホモジナイズし、100 μ l の Whole cell lysis Buffer により懸濁し、氷上で 10 分間静置後、4°C, 15,000 rpm, 10 分間で遠心分離した。遠心後の上清を回収し、使用するまで -80°C で保存した。Whole cell extract Buffer の組成は、100 mM NaCl (純正化学株式会社, Tokyo, Japan), 100 mM Na₄P₂O₇ (Nakarai tesque), 50 mM NAF (Sigma), 0.1 mM Na₃VO₄ (Sigma), 1% Triton \times 100 (Sigma), 2.5 mM HEPES (pH 7.5) (Sigma), 10% glycerol (Nakarai tesque), 5 mM EDTA (Sigma), 5 mM EGTA (Sigma) である。

抽出した白血球タンパク質濃度は、DC Protein Assay Kit (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, U. S. A.), NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

精子タンパク質は、精子をエッペンドルフチューブに回収し、100°C, 5 分間加熱した 1 \times SDS Sample Buffer を加え、ピペッティングにより懸濁し、精子懸濁液を作製した。懸濁後のサンプルを超音波破碎機 (UD-200, TOMY, Tokyo, Japan) を用いて、4°C, 10 秒間の処理により DNA を断片化させた。

細胞溶解液中のタンパク質濃度を 10 mg/ml に調整後、等量の Laemli sample buffer (Laemli, 1970) を添加し、100°C, 5 分間煮沸した。精子サンプルについても同様に

加熱処理を行った。煮沸した白血球タンパク質 10 μ l および精子タンパク質 10 μ l を 7.5%の Polyacrylamide gel を用いて 100 V, 10 mA の条件下で分離した。用いた泳動バッファは 25 mM Tris (Nakarai tesque), 192 mM Glycin (Nakarai tesque), 0.1% (w/v) Sodium dodecyl sulfate (Sigma) である。泳動したゲルを Polyvinylidene fluoride membrane (PVDF membrane, GE healthcare) に 100 mA, 4°Cの条件で 12 時間転写した。転写バッファには 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 10% (w/v) Methanol (Nakarai tesque) を用いた。

転写した PVDF membrane は, 5% (w/v) スキムミルク (森永乳業, Tokyo, Japan) を溶解させた PBS (-) でブロッキングした。チロシン残基のリン酸化の検出においては, 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA, Nakarai tesque) 添加 TBS でブロッキングした。

2.5% (w/v) スキムミルクを溶解させた PBS-T (0.1% (w/v) Tween-20 (Sigma) を添加した PBS (-)) もしくは 2.5% (w/v) BSA を溶解させた TBS-T (0.1% (w/v) Tween-20 (Sigma) を添加した TBS) に X 倍に希釈した一次抗体を添加し, ブロッキング後の PVDF membrane と 4°Cで一晩反応させた。

一次抗体の希釈倍率は, anti-TLR2 antibody (1:1000, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA) は 1:1000, anti-TLR4 antibody (IMGEX, San Diego, CA, U. S. A.) は 1:1000 とした。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 TBS-T で 2 時間振揺させ洗浄した。

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 2.5%(w/v) スキムミルク添加 PBS-T を用いて 1.5 時間室温で反応させた。

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 PBS-T 中にて 1 時間室温で振揺させた。

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 Lightning 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。

アポトーシスの検出

精子は terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling ; TUNEL 法 (*In-Situ* Cell Death Detection kit, Soche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用い, アポトーシス精子の検出を行った。スライドガラスに塗抹した精子は 4% (w/v)

paraformaldehyde, PBS で固定し, TUNEL 反応液を加え, 加湿環境下, 37°C, 60 分間静置した. 蛍光染色を行った精子は落射蛍光顕微鏡を用いて観察を行い, 精子 DNA fragmentationn を含む, アポトーシス精子を検出した.

実験計画

【実験 1】ヒト精液中の細菌感染種の同定と精液所見との関係

実験 1 では, 372 症例の精液検査を行い, その細菌種を同定した. また, 細菌感染の有無と精液所見, 精子の TUNEL 陽性率との関連を検討した.

【実験 2】ヒト精漿中 LPS, ペプチドグリカン濃度の測定

実験 2 では, ヒト精液中に認められたグラム陽性菌から放出されるペプチドグリカンの精漿中の濃度を SLP テストにて検出し, グラム陰性菌から放出される LPS の精漿中の濃度をリムルステストにて検出した.

【実験 3】ヒト精子の TLR2 (*Tlr2*) および TLR4 (*Tlr4*) の発現と局在検出

実験 3 では, LPS に対する受容体である TLR4 (*Tlr4*) と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*) のヒト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】ヒト精子における TLR2 および TLR4 の機能解析

実験 4 では, 精漿を除去し, 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, 精子運動率と TUNEL 陽性率についてそれぞれ検討した. また, LPS の活性を中和する PMB を精子培養液に添加し, 精子運動率と TUNEL 陽性率について検討した.

統計処理

各実験の結果は, Statcel (The Useful Addin forms on Excel) を用いて統計分析を行った. 平均値の比較は, Fisher の最小有意差検定により判定し, 5%水準で有意差を評価した.

結果

【実験 1】細菌培養検査を行った 372 症例の平均年齢は、37.78 歳であった。細菌培養検査にて、細菌のコロニーが検出されたのは 119 症例であり、そのうちグラム陽性菌が検出されたのは 110 症例、グラム陰性菌が検出されたのは 9 症例であった。253 症例では細菌は検出されなかった（表 2-1）。検出された細菌のうち、グラム陽性菌では、*Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Enterococcus sp.* が多く検出された。グラム陰性菌では、*Escherichia coli.*, *Chryseobacterium sp.*, *Acinetobacter sp.* などが検出された（表 2-1）。次に精液中の細菌の存在と精液所見との関連を明らかにするため、多くの症例で検出されたグラム陽性菌検出症例と菌が検出されなかった症例において、精液量、精子濃度、運動率、奇形率、白血球数、TUNEL 陽性率を比較した。その結果、精液量、精子濃度、運動率、奇形率において、細菌の有無による差は認められなかった。しかし、白血球数は、グラム陽性菌検出症例において 0.8×10^6 cell/ml であり、細菌検出の無い症例の 0.42×10^6 /ml と比較して有意に高い値を示した ($P < 0.05$) (表 2-2)。さらに、TUNEL 陽性率は、グラム陽性菌検出症例で 22.0%、であり、細菌が検出されない症例の 13.4% と比較して有意に高い値を示した ($P < 0.05$) (表 2-2)。細菌が検出された精液では、精子 DNA の断片化が進行している可能性が示された。

【実験 2】精液中には細菌が検出される症例が多く認められたことから、グラム陽性菌の内毒素であるペプチドグリカン、グラム陰性菌の内毒素である LPS に着目し、それぞれの濃度を検出した。ペプチドグリカンは SLP テスト、LPS はリムルステストにて検査を行った。結果、細菌検出の有無に関わらずそれぞれの内毒素が検出され、両内毒素が検出される症例も存在した。その濃度は、ペプチドグリカンが 3.265 ± 1.694 pg/ml であり、LPS は 1.275 ± 0.931 pg/ml であった（表 2-3）。それぞれの内毒素濃度には症例間でばらつきが認められた。内毒素濃度が高い症例においては、内毒素が直接精子に悪影響を与える可能性が考えられた。

【実験 3】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 TLR2 はペプチドグリカンを認識し、TLR4 は LPS を認識することから、ヒト精子における TLR2 および TLR4 の発現を検討した。RT-PCR および Western blotting によりヒト精子において、TLR2 および 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になった（図 2-1 A, B）。さらに免疫蛍光染色法の結果から、精子先体部に強く局在していることが示された（図 2-1 C）。これらの結果から、精漿中の内毒素を精子上に存在する TLR2/4 が直接認識する可能性が示唆された。

【実験 4】実験 3 において、精子には TLR2 および TLR4 が発現していることが明らかとなったことから、精子が合成ペプチドグリカンである Pam3Cys あるいは LPS に対する応

答について検討した。Pam3Cys あるいは LPS 添加培養液で精子を 6 時間培養した結果、精子運動率はコントロールの無添加培養液と比較して有意に低下した (図 2-2 A)。さらに、24 時間培養後の TUNEL 陽性率はコントロールと比較して有意に上昇した (図 2-2 B)。

さらに LPS 濃度が比較的高い症例に、LPS 活性を中和する PMB を添加し、精子に与える影響を検討した。PMB 添加区では、無添加区と比較して 6 時間後の精子運動率の低下が有意に抑制され (図 2-2 C)、24 時間培養後の TUNEL 陽性率は有意に低下した (図 2-2 D)。

考察

男性生殖器の細菌感染は不妊原因となると報告されている (Eley et al., 2005 ; Ochsendorf et al., 2008 ; Moretti et al., 2009). 本章実験 1 において, 精液中に細菌が検出される症例が認められ, 検出された細菌の多くが *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Enterococcus sp.* などのグラム陽性菌であった. 症例数は少なかったが, グラム陰性菌も *Escherichia coli.*, *Chryseobacterium, sp.*, *Acinetobactor sp.* などが検出された. グラム陽性菌検出症例では細菌が検出されなかった症例と比較して, 精子の TUNEL 陽性率が有意に高くなることが認められた.

グラム陽性菌は, 溶菌時に細胞膜成分のペプチドグリカンを放出し, これが毒素として作用することが知られている (Lefrancier et al., 1967 ; Kengatharan et al., 1998). そこで, 本章実験 2 において, グラム陽性菌由来のペプチドグリカンを SLP テストで測定した. その結果, 血漿中濃度よりも有意に高く検出され, 症例によってはかなり高濃度に検出されるものが存在した. また, グラム陰性菌はヒト精液中に検出される症例は少なかったが, その内毒素である LPS は, グラム陽性菌においても放出するものがあるとの報告がある (Ginsburg et al., 2002). このことから, ヒト精漿中の LPS 濃度をリムルステストにて測定した結果, ペプチドグリカンと同様に症例によってはかなり高濃度に検出された. 細菌培養検査による細菌の検出限界以下であっても, 内毒素が検出されたことから, 細菌フリーと診断されている検体においても精子が内毒素の悪影響を受けている可能性が示された.

これらの精液中に検出されたペプチドグリカンや LPS は, TLR2 あるいは TLR4 を刺激することが免疫細胞で知られている (Tsan et al., 2004 ; Fournier and Philpott, 2005). さらに, 卵丘細胞, 血管内皮細胞, 胚上皮細胞, 子宮上皮細胞などにおいてもそれらが発現することが明らかになっている (Mori et al., 2003 ; Shimada et al., 2006). そこで, RT-PCR 法と western blotting 法および免疫染色を行い, ヒト精子でのこれらの受容体の発現を検討した. その結果, TLR2 および TLR4 がヒト精子に発現し, それらが先体部に局在していることが示された. ヒト精子において, *Chlamydia trachomatis* 由来である LPS 添加培地での培養は, 精子の運動性を低下させ, 精子 DNA の断片化率を上昇させることが報告されている (Eley et al., 2005). そこで, 精漿中の細菌性内毒素が精子へ与える影響を明らかにするため, 本章実験 4 において, 細菌フリーの精液を用いて, ペプチドグリカンの合成リガンドである Pam3cys あるいは LPS 添加培地で精子を培養し, 精子の運動性と TUNEL 陽性率の検出を行った. これらの処理は, 精子の運動性を低下させ, TUNEL 陽性率を上昇させた. 精漿中には細菌から放出される内毒素が存在し, その内毒素は, 精子上に存在する受容体により認識され, 精子の運動性の低下や精子 DNA の断片化を誘起する一因となっていることが示された. これらの添加実験において,

精子運動性を低下させ、TUNEL 陽性率を上昇させた内毒素濃度は、血清中の濃度と比較して高濃度である。しかしヒト精漿中には可溶性の sCD14 (soluble CD14 α , β) が存在することや (Harris et al., 2001), lipopolysaccharide-binding protein (LBP) が精漿中のプロスタソームに存在していることが報告されている (Malm et al., 2005)。これらの 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。リムルステストでは複合体である LPS-sCD14 および LPS-LBP は検出できず、遊離 LPS のみ検出していることから、今回の検出値以上の LPS がヒト精漿中には存在しているものと推察される。このことから、本研究で実施した細菌検出条件では、コロニーが形成されないような極めて少数の細菌存在条件において、培養液に含まれている溶菌性の抗生物質が放出する内毒素を高感度で検知できると考えられ、内毒素濃度測定は、精子の性状を判定する有効な測定項目であることが示唆された。

精漿中には細菌が放出する内毒素が検出され、それら内毒素は精子の機能性を低下させることが示されたことから、ヒト精子処理過程において内毒素を不活化する必要があると考えられる。そこで LPS の中和剤である PMB 添加培地で処理を行った結果、LPS に起因する精子の運動性低下と TUNEL 陽性率の上昇が抑制された。ブタ精子においても、細菌が混入している症例において、PMB とペニシリン G との複合処理によって、長期保存での精子の運動性が維持されることが報告されている (Okazaki et al., 2010)。このことから、LPS の毒性を中和することにより、精子上の TLR4 の認識による精子機能性低下が抑制されたと考えられる。しかし、ヒト精液中にはグラム陽性菌の混入が多く認められるが、この内毒素であるペプチドグリカンの中和剤は存在しないため、内毒素が存在する精漿を除去し、速やかに精子を分離することが必要であると考えられる。

さらに、TLRs は、LPS や Pam3cys を認識し、活性化すると、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)。このため、精漿中の内毒素を認識した精子の TLRs が、精子内に急激な Ca^{2+} の増加をもたらすと考えられる。精子内に Ca^{2+} が取り込まれることにより、精子膜の変化に伴う自発的な受精能獲得や先体反応を誘起し、生存の持続時間が短縮され、アポトーシスを引き起こすことが報告されている

(Mishra et al., 2006)。したがって、LPS や Pam3Cys による TLR を介した精子の運動性の低下は、アポトーシスに加え、 Ca^{2+} 放出による精子のネクローシスも関与している可能性が考えられる。

以上の結果から、①ヒト精液中にはグラム陽性菌、陰性菌が混入しており、細菌の混入は精子 DNA の断片化率を増加させること、②ヒト精漿中にはペプチドグリカンや LPS が検出されること、③ヒト精子はペプチドグリカンや LPS を認識する TLR2 および TLR4 が発現しており、精子の先体部に局在していること、④LPS, Pam3Cys は TLR を介して精子 DNA の断片化を誘起し、精子の運動率を低下させているという、ヒト精子における初期免疫応答が明らかとなった。

要約

生殖器の細菌感染は男性不妊因子の一つである。細菌混入により白血球が集積し、白血球に発現している TLR2 および TLR4 が細菌から放出される内毒素を認識すると、サイトカインやケモカインを分泌する。サイトカインの一種である TNF- α の分泌は、細胞膜表面の Type1-TNF α と結合することにより、アポトーシスを誘起する。このように、精液中の細菌感染による精子機能性の低下は、自然免疫応答によって誘起されている。しかし、精液中の細菌感染と白血球数には関連が認められない症例もあることから、精液中の細菌混入が精子運動性を直接低下させることも考えられる。また、精子には、走化性に関与するケモカインレセプターが発現しており、免疫細胞様の機能を有することが明らかとなっている。これらのことから、ヒト精子には精液中に混入している内毒素を直接認識する可能性が考えられたことから、ヒト精子における TLRs の発現と機能について検討した。

まず、ヒト精液中に混入している細菌種の同定と、内毒素濃度の測定を行った。その結果、精液中には細菌が混入している症例が認められ、その多くはグラム陽性菌であった。さらに、グラム陽性菌が混入している症例では、細菌が認められない症例と比較して TUNEL 陽性率が有意に高い値を示した ($P<0.05$)。また、精液中の内毒素濃度を測定した実験 2 では、精漿中には血清中と比較して高濃度にペプチドグリカンや LPS が存在していることが示された。実験 3 では、ヒト精子に TLR2 および TLR4 の発現を認めた。これらのことから、実験 4 では、内毒素の刺激による精子の TLR2 および TLR4 の作用を検討した。精子をペプチドグリカンの合成リガンドである Pam3Cys あるいは LPS 添加培養液で培養し、運動率と TUNEL 陽性率の測定を行った。その結果、Pam3Cys、LPS 添加処理において、運動率は有意に低下して TUNEL 陽性率は有意に増加した。さらに、LPS が精漿中に比較的高い値の症例に対し、LPS の中和剤である PMB 処理を行うと、運動率の低下と TUNEL 陽性率の増加が抑制された。

これらのことから、精漿中には細菌が混入しており、さらに細菌から放出される内毒素が存在している。精子にはこれらの内毒素を認識する TLR2 および TLR4 が発現し、精子が直接内毒素を認識することによって精子運動性や精子 DNA の断片化に対して負の影響を与えていることが示された。

表2-1. ヒト精液中の存在する細菌種の同定

細菌混入陰性	253
細菌混入陽性	119
グラム陽性菌	110
<i>Staphylococcus sp.</i>	39
<i>Staphylococcus sp.</i>	50
<i>Enterococcus sp.</i>	29
<i>Corynebacterium sp.</i>	4
グラム陰性菌	9
<i>Proteus mirabilis</i>	1
<i>Acinetobactor sp.</i>	2
<i>Escherichia coli</i>	3
<i>Chryseobacterium sp.</i>	2
<i>Neissiria sp.</i>	1
総症例数	372

血液寒天培地を用いて、初回体外受精にて提出された372症例の精液中の細菌混入の頻度と細菌種の同定を行なった。

測定した症例の平均年齢は、37.78歳 (range, 24-54) であった。

精液中に細菌混入が認められた症例は119症例であった。そのうちグラム陽性菌は110症例、グラム陰性菌は9症例で検出され、両方の菌が検出された症例は認められなかった。

表2-2. ヒト精液中の細菌混入による精液所見への影響

検査項目	グラム陽性菌	グラム陰性菌	細菌混入なし	
精液量 (ml)	2.48	2.70	2.70	<i>N. S.</i>
精子数 ($\times 10^6/ml$)	87.65	82.44	121.44	<i>N. S.</i>
運動率 (%)	54.01	58.14	55.05	<i>N. S.</i>
奇形率 (%)	45.73	43.29	43.14	<i>N. S.</i>
白血球数($\times 10^6/ml$)	0.8	1.38 **	0.42 *	<i>P<0.05</i>
TUNEL陽性率 (%)	22.0 **	—	13.4 *	<i>P<0.05</i>

精液中の細菌混入による精液所見への影響を検討した。

精液量は目視にて、精子数、運動率、奇形率、白血球数はマクラーカウンティングチャンバーにより顕微鏡下で測定を行った。

細菌が混入している症例と、混入していない症例では、精液量、精子数、運動率、奇形率に差は認められなかった。

白血球数は、コントロール（細菌混入なし）と比較してグラム陰性菌混入症例で有意に高く、TUNEL陽性率は、コントロールと比較してグラム陽性菌混入症例で有意に高い値を示した。グラム陰性菌混入症例での測定はなかった。

数値は平均値

同一項目内,*,**間に有意差あり($P<0.05$).

表2-3. ヒト精漿中のLPS, ペプチドグリカン濃度

	ヒト精漿	ヒト血清
LPS (pg/ml)	1.275+/-0.931	0.004+/-0.004
ペプチドグリカン (pg/ml)	3.265+/-1.694	N.D.

グラム陰性菌から放出される内毒素であるLPSをリムルステストにて、グラム陽性菌から放出される内毒素であるペプチドグリカンをSLPテストにて、検出した。

コントロールとしてヒト血清中の内毒素濃度を測定した。

ヒト精漿中には、高濃度にLPSもしくはペプチドグリカンが検出される症例が存在し、両内毒素が検出された症例も存在した。

また、症例間で内毒素濃度にばらつきが生じることが明らかとなった。

ヒト血清中のペプチドグリカン濃度は検出限界以下であった。

数値は平均値+/-SD

N.D.;血清中のpeptideglican濃度は検出限界以下。

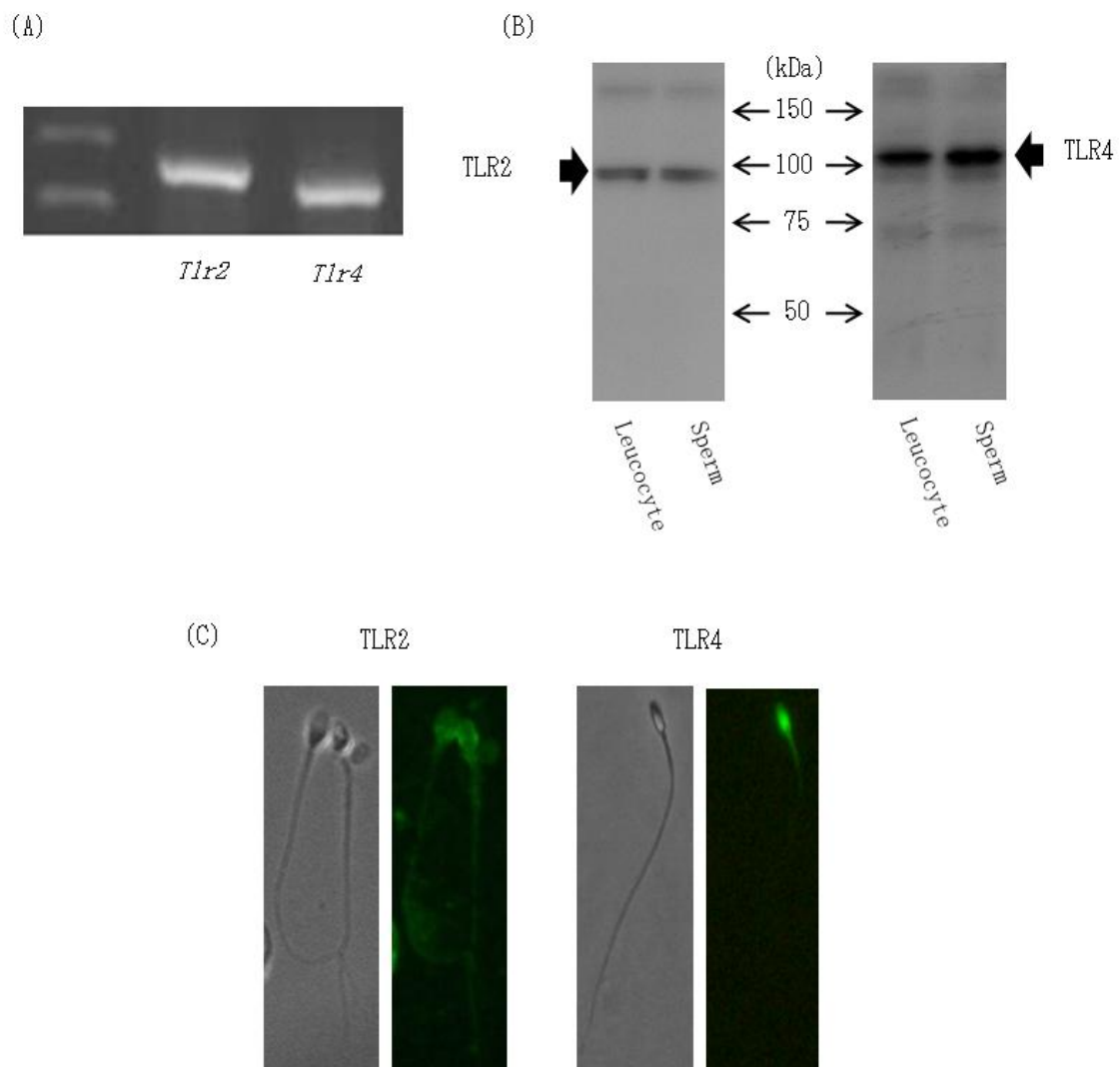


図2-1. ヒト精子におけるTLR2(*Tlr2*)およびTLR4 (*Tlr4*)の発現と局在

- A: RT-PCRによる*Tlr2*および*Tlr4*の発現解析
 B: Western blottingによるTLR2およびTLR4の発現解析
 陽性コントロールとしてヒト白血球を使用した。
 ヒト精子にTLR2およびTLR4の発現が認められた。
- C: 免疫蛍光染色法によるTLR2とTLR4の局在解析
 青; DAPI (核)
 緑; TLR2/TLR4
 ヒト精子の先体部にTLR2およびTLR4の局在が認められた。

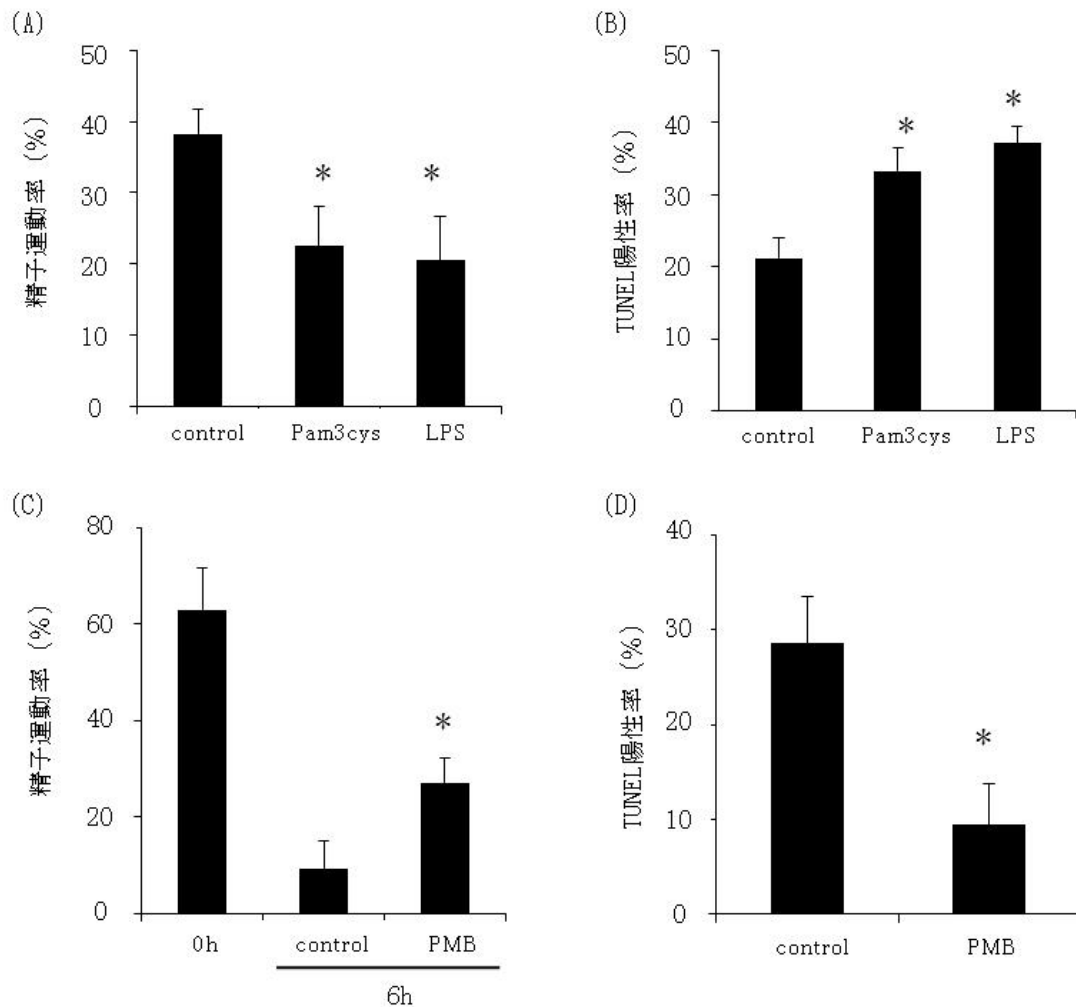


図2-2. ヒト精子における, LPS, Psm3Cys添加による精子機能性への影響と, LPS中和剤であるPMBを添加したときの精子機能性への影響

- A ; LPS, Pam3Cysを添加, 6 時間培養後の精子運動性の比較
 コントロールと比較して, LPS, Pam3Cys添加区では, 6時間培養後の精子運動性が有意に低下した.
- B ; LPS, Pam3Cysを添加, 2 4 時間培養後の精子アポトーシス率の比較
 コントロールと比較して, LPS, Pam3Cys添加区では, 24時間培養後のTUNEL陽性率が有意に上昇した.
- C ; LPS中和剤であるPMBを添加, 6 時間培養後の精子運動性の比較
 LPS高濃度症例において, PMB添加処理を行うと, コントロールと比較して培養後の精子運動性の低下が抑制された.
- D ; LPS中和剤であるPMBを添加, 2 4 時間培養後の精子アポトーシス率の比較
 LPS高濃度症例において, PMB添加処理を行うと, コントロールと比較して培養後のTUNEL陽性率の上昇が抑制された.

* ; コントロールに対して有意差あり ($P < 0.05$).

第三章

TLR2 および TLR4 遺伝子欠損マウスを用いた精子に発現する TLRs の機能解析

序論

第二章により、ヒト精液にはグラム陽性菌やグラム陰性菌が混入していること、細菌から放出される内毒素が高濃度検出される症例があることが示された。さらに、ヒト精子は内毒素を認識する TLR2 および TLR4 を発現しており、精液中に TLR2 あるいは TLR4 のリガンドである Pam3Cys や LPS を添加すると、精子運動性が低下し、精子 DNA の断片化が誘起されることが明らかとなった。これらのことから、精液中のペプチドグリカンや LPS は、ヒト精子に発現する TLR2 および TLR4 を介して精子の機能性に影響を及ぼすことが示唆された。しかし、ヒト精子は射出直後からすでに内毒素が存在する精漿に曝された状態であるため、添加実験を行う前に精子が精漿中の内毒素の影響を受けてしまっている可能性がある。したがって、内毒素が存在する精漿に曝される前の精巣上体精子を用いて検討する必要がある。

添加実験に用いた LPS の精製法は、グラム陰性菌を溶出し、タンパク質や核酸などの菌体由来の不純物を温水フェノール法で除去した後、超遠心や核酸分解酵素、タンパク質分解酵素などの各種分解酵素を用いて不純物を除去している (Darveau et al., 1983 ; Eidhin et al., 1993)。しかし、超遠心処理では精製率が低く、各種タンパク質分解酵素処理法では、その酵素が残留するなど、抽出法によって純度が異なることが知られている (Darveau et al., 1983 ; Eidhin et al., 1993)。一方、TLR2 のリガンドとして用いた Pam3Cys は合成ペプチドであることから、LPS で懸念されるコンタミネーションの可能性は排除される。しかし、生理的なリガンドであるペプチドグリカン自身ではないことから、精子 TLR2 の機能解析として、その特異性について確認する必要がある。したがって、精子に発現する TLR2 および TLR4 の特異的な機能を明確にするためには、精巣上体精子を用いることのみでなく、TLR2 や TLR4 の機能を欠損させた精子を用いて、リガンド添加実験および、細菌存在下での培養実験を行う必要がある。

マウスにおいて、 γ 線に媒精前の精子を曝露させると、精子 DNA の断片化は増加し、受精率には差は認められないが、胚盤胞発生率と受胎率が低下すると報告されている (Ahmadi et al., 1999)。また、ヒトの人工授精では、精子 DNA の断片化が高頻度起こっている症例の妊娠率は低い (Bungum et al., 2007)。このようなことから、精子が高頻度に DNA 断片化を起こしている症例では、精子の受精能あるいは受精後の胚における雄ゲノムの不健全に伴う発生能の低下が引き起こされている可能性が考えられる。

これらのことから、本章では、精巣上体精子を容易に利用可能であり、体内および体

外での受精試験も容易で、かつ各 TLR の遺伝子欠損個体が利用可能なマウスを用いて、精子に存在する TLRs の詳細な作用機序の解明と、受精・発生能に与える影響を明らかにすることを目的とした。実験 1 では、マウス精子における TLR2(*Tlr2*)、および TLR4(*Tlr4*) の発現と局在を、Westernblotting および immunofluorescence 法を用いて検出した。実験 2 では、細菌感染フリーのマウス精巣上体精子を用い、LPS もしくは Pam3Cys を添加し、精子の運動性と TUNEL 陽性率による精子 DNA の断片化を検出した。さらに、*Tlr2* ノックアウトマウス、*Tlr4* ノックアウトマウス、*Tlr2;Tlr4* ダブルノックアウトマウスの精巣上体精子を用いて同様の添加実験を行い、精子の機能性に果たす TLR2 および TLR4 の役割の解明を試みた。実験 3 では、*Tlr4* ノックアウトマウス、*Tlr2;Tlr4* ダブルノックアウトマウスの精巣上体精子を用いて LPS もしくは Pam3Cys 添加培地で前処理した後に体外受精を行い、TLR2 および TLR4 で細菌内毒素を認識した精子の受精能を検討した。実験 4 では、細菌混入下で培養した精子を用いて人工授精を行った。細菌が混入していないコントロール群と、細菌混入であり PMB 処理を行った群との受精率を比較し、体内における受精能を検討した。

材料および方法

RNA 抽出および RNA 濃度測定, 逆転写反応, TLR2 および TLR4 の蛍光免疫染色法, アポトーシスの検出は第二章と同様に行った.

マウスの飼育法および精子サンプルの回収

実験には ICR 系統のマウスを用いた. マウスは日照時間 (点灯 14 時間, 消灯 10 時間) および気温 (23°C) が管理された SPF 環境下で飼育し, 給餌およびその動物の取り扱い は広島大学の実験動物指針に従った.

8 週齢 ICR 系統雄マウスから左右の精巣上体尾部を体外受精培地 500 μ l 中に取り出し, 26G 針を用いて精巣上体尾部を切開し, 精巣上体精子を培地内に放出させた. 体外受精培地には mHTF 培地を使用し, 37°C, 5%CO₂, 飽和水蒸気条件下で一晩静置させたものを使用した. mHTF の組成は以下の通りである. 10.16 mM NaCl (純正化学株式会社, Tokyo, Japan), 4.69 mM KCl (Sigma, St. Luis, MO, U.S.A.), 5.14 mM CaCl₂ · 2H₂O (Sigma), 0.4mM KH₂PO₄ (Sigma), 0.2 mM MgSO₄ · 7H₂O (片山化学工業, Osaka, Japan), 8.401 mM NaHCO₃ (Nakarai tesque, Kyoto, Japan), 2.77 mM glucose (Sigma), 0.13 mM Na lactate (Sigma), 0.34 mM pyruvic acid (Sigma), 0.006% (w/v) penicillin G (Sigma), 0.005% (w/v) streptomycin (Sigma), 0.4% (w/v) bovine serum albumin (Sigma), phenol red (Merck, Whitehouse Station, NJ, U.S.A.).

精子運動性の測定, 培養

8 週齢 ICR 系統雄マウスの精巣上体尾部を回収後, 4 well dish (NUNC, Rochester, NY, U.S.A.) を用いて mHTF 培地 500 μ l 中に精巣上体精子を放出させ, 最終濃度 1×10^8 sperm/ml の濃度になるように mHTF 培地で希釈した. 37°C, 5%CO₂, 飽和水蒸気条件下で培養を行った. 精子運動性の測定については目視による観察を行い, 培養 3 時間後まで計測した.

マウス精巣上体精子は 100 ng/ml の LPS もしくは, 10 μ g/ml の Pam3Cys を培養液に加え, 培養を行い, 培養 3 時間後の運動率と, 6 時間後の TUNEL 陽性率, caspase3 活性の測定による精子 DNA の断片化の検出を行った. TLR4 の合成リガンドである LPS は *Escherichia Coli* 0111:B4 由来の LPS (L4391, Sigma, St Louis MO, USA) を, TLR2 の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)₄₁ (Pam3Cys ; Calbiochem, Los Angels, CA, USA) を mHTF で溶解し, -20°C に保存したものを使用した.

TLR2, TLR4, Caspase3 の Western Blotting 法

TLR2 および TLR4 のポジティブコントロールとして脾臓を回収した。回収した脾臓をホモジナイズし、100 μ l の Whole cell lysis Buffer により懸濁し、氷上で 10 分間静置後、4 $^{\circ}$ C, 15,000 rpm, 10 分間で遠心分離した。遠心後の上清を回収し、使用するまで -80 $^{\circ}$ C で保存した。Whole cell extract Buffer の組成は、100 mM NaCl (純正化学株式会社, Tokyo, Japan), 100 mM Na₄P₂O₇ (Nakarai tesque), 50 mM NAF (Sigma), 0.1 mM Na₃VO₄ (Sigma), 1% Triton \times 100 (Sigma), 2.5 mM HEPES (pH 7.5) (Sigma), 10% glycerol (Nakarai tesque), 5 mM EDTA (Sigma), 5 mM EGTA (Sigma) である。

抽出した脾臓タンパク質濃度は、DC Protein Assay Kit (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, U.S.A.), NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

精巣上体精子タンパク質は、以下の手順で回収した。精巣上体より 4 well dish に回収した精巣上体精子もしくはリガンド処理後の精巣上体精子をエッペンドルフチューブに回収し、100 $^{\circ}$ C, 5 分間加熱した 1 \times SDS Sample Buffer を加え、ピペッティングにより懸濁し、精子懸濁液を作製した。懸濁後のサンプルを超音波破砕機 (UD-200, TOMY, Tokyo, Japan) を用いて、4 $^{\circ}$ C, 10 秒間の処理により DNA を断片化させた。

細胞溶解液中のタンパク質濃度を 10 mg/ml に調整後、等量の Laemli sample buffer (Laemli, 1970) を添加し、100 $^{\circ}$ C, 5 分間煮沸した。精子サンプルについても同様に加熱処理を行った。煮沸した脾臓タンパク質 10 μ l および精子タンパク質 10 μ l を 7.5% の Polyacrylamide gel を用いて 100 V, 10 mA の条件下で分離した。

以下第二章と同様の手順で行った。

一次抗体の希釈倍率は、anti-TLR2 antibody (1:1000, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA) は 1:1000, anti-TLR4 antibody (IMGEX, San Diego, CA, U.S.A.) は 1:1000, anti-cleaved caspase 3 (Asp175) (1:1000, Cell signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA), β -actin (Sigma) は 1:10000 とした。

マウスの体外受精

体外受精に用いる卵子は、C57BL/6 系統の未成熟メスマウスに過排卵処理を行い、卵丘細胞卵子複合体 (cumulus-oocyte complex ; COC) を回収することにより成熟卵を得た。過排卵刺激は、23 日齢時に 4 IU の Equine chorionic gonadotrophine ; eCG (アスカ製薬株式会社) を腹腔内投与することにより、複数の卵胞の発育を促した。eCG 投与 48 時間後、5 IU の Human chorionic gonadotrophine ; hCG (アスカ製薬株式会社) を腹腔内投与し、その 16 時間後に卵管から COC を回収した。回収した COC は、150 μ l の HTF 培地中で培養を行った。体外受精用の培地には、37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂, 飽和水蒸気条件下で一晩静置させた HTF 培地を使用した。回収した精子を 60 分間、前培養を行い、受精能の獲得を誘起した。この間に、Pam3Cys, LPS の処理群は 10 μ g/ml の Pam3Cys, 100 ng/ml の LPS をそれぞれを培地中に添加し処理を行った。培養後、精子は媒精用の培養液中に最終数が 1000 個/ μ l になるよう調整を行い、COC との媒精に用いた。媒精 12

時間後に顕微鏡下で前核の有無により受精の確認を行った。

マウスの人工授精

人工授精に用いるマウスは、ICR 系統の 8 週齢成熟メスマウスに体外受精時と同様に過排卵処理を行った。精子は回収後、細菌処理群では大腸菌との共培養を行い、60 分間の前培養を行った。メスマウスに hCG 投与 12 時間後に子宮内に精子の注入を行い、受精率の測定を行った。さらに、LPS の中和剤である 100 $\mu\text{g/ml}$ の polymyxin B (PMB) を人工授精に用いる精子の培養液に加え、培養を行い、受精率の測定を行った。PMB も第二章と同様に、Sigma から購入したものを mHTF で希釈し、 -20°C で保存したものを使用した。

ノックアウトマウス

Tlr2^{-/-}マウス (Takeuchi et al., 1999) , *Tlr4*^{-/-}マウス (Hoshino et al., 1999) は、6 世代交雑させて C57BL/6 マウスから得た。これらのマウスは日照時間 (点灯 12 時間, 消灯 12 時間) および気温 (23 $^{\circ}\text{C}$) が管理された SPF 環境下で飼育し、給餌およびその動物の取り扱い は Baylor College of Medicine の実験動物飼育指針に従った。

実験計画

【実験 1】マウス精子の TLR2 (*Tlr2*) および TLR4 (*Tlr4*) の発現と局在

実験 1 では、LPS に対する受容体である TLR4 (*Tlr4*) と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*) のマウス精子における発現と局在を Western Blotting および Immunofluorescence 法を用いて検出した。

【実験 2】マウス精子の TLR2 および TLR4 の細菌感染に対する特異的機能

実験 2 では、SPF マウス精液の精漿を除去し、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、精子運動率と精子 DNA の断片化についてそれぞれ検討した。さらに *Tlr2*^{-/-}、*Tlr4*^{-/-} および *Tlr2*^{-/-};*Tlr4*^{-/-} マウスを用いて同様の添加実験を行い、それぞれのリガンドに対する精子運動率と精子 DNA の断片化を検討した。精子 DNA の断片化の検出は、TUNEL 陽性率と caspase3 活性を検出することにより行った。

【実験 3】マウス精子の TLR2 および TLR4 の細菌感染に対する受精能への影響

実験 3 では、SPF マウス精液の精漿を除去し、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、体外受精による受精率についてそれぞれ検討した。さらに *Tlr4*^{-/-} および *Tlr2*^{-/-};*Tlr4*^{-/-} マウスを用いて同様に添加実験を行い、それぞれのリガンドに対する受精能への影響を検討した。

【実験4】 マウス精子における細菌混入と体内受精能への影響

実験4では、SPF マウス精液の精漿を除去し、精子培養液と細菌を供培養することにより、細菌混入下での体内受精による受精率について検討した。さらに精子培養液と細菌の供培養と同時に LPS の中和剤である PMB にて処理を行うことにより、受精能への影響を検討した。

統計処理

各実験の結果を Statistical Analysis System Package(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いて統計分析を行った。それぞれの症例において試験を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の最小有意差検定により判定し、5%水準で有意差を評価した。

結果

【実験 1】

Western blotting によりヒト精子と同様にマウス精子においても TLR2 および TLR4 が発現していることが明らかになった (図 3-1 A). さらに免疫蛍光染色法の結果から, 精子先体部に局在していることが示された (図 3-1 B).

【実験 2】

実験 1 において, マウス精子には TLR2 および 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 Pam3Cys あるいは LPS の刺激に対する応答について検討を行った. 野生型マウスの精子を Pam3Cys あるいは LPS 添加培養液で 3 時間培養した結果, 精子運動率はコントロールの無添加培養液と比較して有意に低下した (図 3-2 A). Pam3Cys あるいは LPS 添加培養液で精子を 6 時間培養すると, TUNEL 陽性率はコントロールと比較して有意に上昇し (図 3-2 B), caspase3 の活性化も認められた (図 3-2 C). このことから, 精子は精漿中の内毒素を, TLR2 および TLR4 により直接認識することにより精子 DNA の断片化と運動性の低下が認められたと考えられる.

さらに, *Tlr2*^{-/-}, *Tlr4*^{-/-} および *Tlr2*^{-/-}; *Tlr4*^{-/-} マウスを用いて同様の添加実験を行った. Pam3Cys あるいは LPS 添加培養液で精子を 6 時間培養した結果, *Tlr2*^{-/-} マウスでは Pam3Cys 添加による, *Tlr4*^{-/-} マウスでは LPS 添加による運動性の低下は認められず, *Tlr2*^{-/-}; *Tlr4*^{-/-} マウスでは, Pam3Cys あるいは LPS 添加による運動性の低下は認められなかった (図 3-2 A). さらに同様の添加処理区で 6 時間後の TUNEL 陽性率を比較したところ, *Tlr2*^{-/-} マウスでは Pam3Cys 添加による, *Tlr4*^{-/-} マウスでは LPS 添加による TUNEL 陽性率の増加は認められず, *Tlr2*^{-/-}; *Tlr4*^{-/-} マウスでは, Pam3Cys あるいは LPS 添加による TUNEL 陽性率の増加は認められなかった (図 3-2 B). このことから, TLR2 存在下では, Pam3Cys の刺激により, TLR4 存在下では, LPS の刺激によりそれぞれの TLRs が活性化することにより, 精子 DNA の断片化と, 運動率の低下が示された.

【実験 3】

Tlr4^{-/-} および *Tlr2*^{-/-}; *Tlr4*^{-/-} マウスを用いて Pam3Cys あるいは LPS 添加培養液で培養した精子を用いた体外受精を行い, 受精能に対する影響を検討した. 野生型マウスでは, Pam3Cys あるいは LPS 添加区において受精率が有意に低下した. しかし, *Tlr4*^{-/-} マウスの LPS 添加による受精率の低下は認められず, *Tlr2*^{-/-}, *Tlr4*^{-/-} マウスでは, Pam3Cys あるいは LPS 添加による受精率の低下は認められなかった (図 3-3).

【実験 4】

実験3において、精子が内毒素を感知することによる体外での受精能の低下が明らかとなったことから、高濃度に細菌が混入している精液を用いた人工授精によって、体内での受精能に対する影響を検討した。マウス精巣上体精子を不活化した大腸菌と共培養し、外科的人工授精に用いた。精液中の細菌濃度が増加するにつれ、コントロールの細菌混入のない精液と比較して人工授精での受精率が有意に低下した。さらに、細菌濃度 1×10^6 個/ml の受精率が有意に低下した症例の精液を大腸菌の供培養と同時に PMB 処理を行うと、受精率の低下が抑制された (図 3-4)。

考察

本論文第二章において、ヒト精子には TLR2 および TLR4 が発現しており、細菌が放出する内毒素を認識すると、精子の運動性が低下すること、および精子 DNA の断片化が増加することを示した。そこで、その詳細な作用機序と受精への直接的な影響を明らかにするため、マウスをモデルとした基礎的検討を行った。

まず、マウス精子にも TLR2 および TLR4 が発現し、それらが先体部に局在していることが示された。また、詳細な機能性を検討するため、TLR2 および TLR4 欠損マウス精巣上体精子を用い、Pam3Cys や LPS の添加処理での精子運動率と TUNEL 陽性率を検討した。その結果、TLR2 および TLR4 はそれぞれのリガンドを特異的に認識して、運動性の低下と精子 DNA の断片化を誘起していることが明らかとなった。マクロファージや白血球などの免疫細胞に発現する TLRs は細菌の内毒素などにより活性化されるとアポトーシスを誘起する。この TLRs の機能は、MYD88 を介して nuclear factor kappa B (NF- κ B) を活性化させ、その標的因子である TNF- α の分泌を誘導し、それが caspase3 を活性化することで、アポトーシスが引き起こされる (Agarwal et al., 2003)。また、TNF- α の分泌を介さずに直接的に精子 DNA の断片化を誘起する仕組みも存在する (Aliprantis et al., 1999)。ヒト精子において、高濃度の Pam3Cys もしくは LPS 処理により、caspase3 の活性化が認められた。これらのことから、精子に発現する TLR2 および TLR4 は、マクロファージなどの免疫細胞と同様のシグナル伝達系を活性化し、精子 DNA の断片化を誘起していることが推測された。このような TLR4 のシグナル伝達経路として、TNF- α associated death domain protein (TRADD)、TLR2 には Fas-associated death domain protein (FADD) の存在がある (Aliprantis et al., 1999)。免疫細胞において TRADD はアポトーシスの誘起に必須であり、これが欠損しているマウスでは、TNF- α もしくは TLR4 のリガンドのどちらの刺激に対しても、アポトーシスが起らないことが報告されている (Ermolaeva et al., 2008)。精子は、TNF- α の添加により DNA の断片化を誘起すること、一方、精子の TNF- α の分泌に関する報告はないことから、精子に発現する TLR2 および TLR4 においても、このような免疫細胞と同様な経路により直接的に精子 DNA の断片化が誘起されると推測される。

また、本章実験 3 では、Pam3Cys もしくは LPS 処理における、TLR2 および TLR4 ノックアウトマウス精巣上体精子を用いた体外受精での受精率を検討した。その結果、TLR2 あるいは TLR4 のリガンドで処理した精子の受精率が、それぞれの受容体依存的に低下した。ブタ精子において、LPS の中和剤である PMB で処理を行うと精子の細胞膜や先体の正常性が高く維持され、受精率が上昇することが報告されている (Okazaki et al., 2010)。マウス精子において、凍結・融解により精子の先体が損傷し、その結果受精率が低下すること、その低下は、透明体除去卵との媒精では回復することが示されて

いる。ブタ精子を LPS で処理すると先体損傷が引き起こされると報告されていること、マウス精子でも TLR7 のリガンド刺激により先体損傷が高率で認められることから

(Fang et al., 2010), 細菌性内毒素による精子受精能の低下は, 先体損傷による透明帯の侵入能の低下による可能性が考えられる。精子膜の損傷は, 精子内 Ca^{2+} が急激に増加し, 精子膜に変化が起こることで誘起されているとの報告がある (Chun and Prince, 2006 ; Mihara et al., 2010)。TLRs の下流においても, Ca^{2+} 上昇が生じ, それにより続発性の開裂が生じる可能性も示されていることから, 内毒素による精子受精能の低下は, 精子 TLRs が内毒素を認識, 活性化すると Ca^{2+} により先体膜が損傷するのかもしれない。実験 4 では, 細菌と共培養した精液を用いた人工授精を行い, 受精能の検討を行った。その結果, 高濃度の細菌処理によって体内での受精能が低下することが示された。この受精率の低下は体外受精でのそれと比較して著しいものであり, 10%程度しか受精が認められなかった。体外受精においては, 一度卵細胞腔に進入し先体反応を起こした精子であってもその精子を回収し, 他の卵周囲に移動させると新たな卵に受精すると報告されている (Inoue et al., 2011)。すなわち, 先体損傷した精子であっても体外では受精し得るのに対して, 体内では機能, 形態が正常な精子のみ受精可能であるということである。

体内の受精では, 精子先体部が正常であることが子宮卵管狭部における精子の維持に必須である。この上皮細胞と先体部の糖鎖を介して結合した精子が受精のために卵へとケモタキシスによって誘引される (Shimada et al., 2006 ; Tamba et al., 2008)。この精子選択は, 受精卵の正常生の維持に必要であると推測される。本実験で示されたように, 体外受精では受精率は低下するものの, 細菌性内毒素により刺激された精子も受精可能であった。この精子は, 先体損傷とともに精子 DNA の断片化も引き起こされている。精子 DNA の断片化が起こることにより, この受精卵では精子由来のゲノムが不安定化していることとなる。精子由来の父性遺伝子は, 4-8 細胞期から発現を開始し, 胎盤形成を司ることが知られている (Ito et al., 1988)。これらのことから, 精子は内毒素に刺激されると, DNA に断片化が生じる。この不安定化したゲノムにより受精卵が異常を呈することを回避するために, 先体損傷を同時に引き起こすという TLRs 下流の 2 つの経路を持っていると考えられる。しかし, 体外受精, 特に ICSI においては, このような自然選択は生じにくくなっており, 細菌性内毒素により DNA が断片化しつつある精子であっても受精しうる。Borini et al. (2006) は, TUNEL 陽性率が高い症例では ICSI による受精率は高いが, 妊娠率が有意に低下し, 流産率が有意に上昇することを報告している。したがって, 体外受精および ICSI における流産率の高さに, TLR 系が負の影響を及ぼしていることが推測された。

以上の結果から, ①ヒト精子はペプチドグリカンや LPS を認識する TLR2 および TLR4 が発現しており, 精子の先体部に局在していること, ②精子上の TLR2/TLR4 はそれぞれのリガンドを特異的に認識し, 精子 DNA の断片化を誘起, 精子の運動率を低下させてい

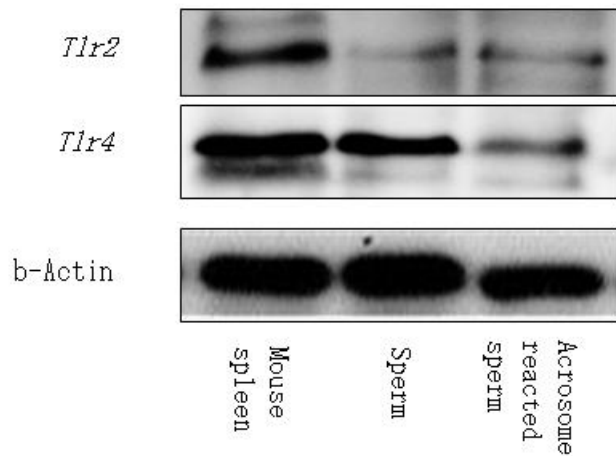
ること、③TLRs を介した精子への負の影響は体外や体内での受精能を低下させることが示され、マウス精子による初期免疫応答とそれに伴う受精能への影響が明らかとなった。このことから、次章では、マウスと同様に TLR2/4 の発現が認められたヒト精子において、内毒素による受精能、さらにその後の胚発生、着床能への影響を検討するとともに、ART に用いる精子へ内毒素の影響を抑えるための処理法の検討を行った。

要約

第二章より、ヒト精子に発現する TLR2 および TLR4 を介して、精子の機能性に影響を及ぼすことが示唆された。しかし、ヒト射精精子では射精直後からすでに内毒素の影響にさらされている状態であることから、細菌感染フリーの精巣上体マウス精子を用いた Pam3Cys および LPS の添加実験を行った。また、TLR2 および TLR4 の作用機序と精子の機能性や受精能に与える影響を検討するため、TLR2 および TLR4 ノックアウトマウスを用いて検討を行った。

本章実験 1 において、マウス精子の TLR2 および TLR4 の発現を確認したことから、実験 2 において Pam3Cys あるいは LPS 添加培養液で培養を行い、精子運動率とアポトーシス率を検討した。その結果、野生型マウス精子では、Pam3Cys および LPS 処理によって精子運動率の低下と TUNEL 陽性率の増加が認められたが、TLR2^{-/-}マウスでは Pam3Cys 処理、TLR4^{-/-}マウスでは LPS 処理による負の影響は認められなかった。さらに、TLR2^{-/-};TLR4^{-/-}マウスでは Pam3Cys および LPS 処理による負の影響は認められなかった。精子に対する負の影響は TLR2 および TLR4 が特異的に内毒素を認識することによって起こることが示されたことから、体外受精での精子受精能に対する影響を検討した。その結果、野生型マウス精子の Pam3Cys および LPS 処理による受精率は有意に低下したが、TLR2^{-/-};TLR4^{-/-}マウスでの低下は認められなかった。これらのことから、TLR2 および TLR4 が特異的に内毒素を認識することによって起こる精子機能性の低下は、体外受精での受精率にも影響を及ぼすことが示された。また、実験 4 では、精子を高濃度の細菌と共培養した後、人工授精に用いると、人工授精による受精率の低下が認められたことから、精子に対する細菌や細菌から放出される内毒素による負の影響は、体内での受精にも影響を与えることが明らかとなった。

(A)



(B)

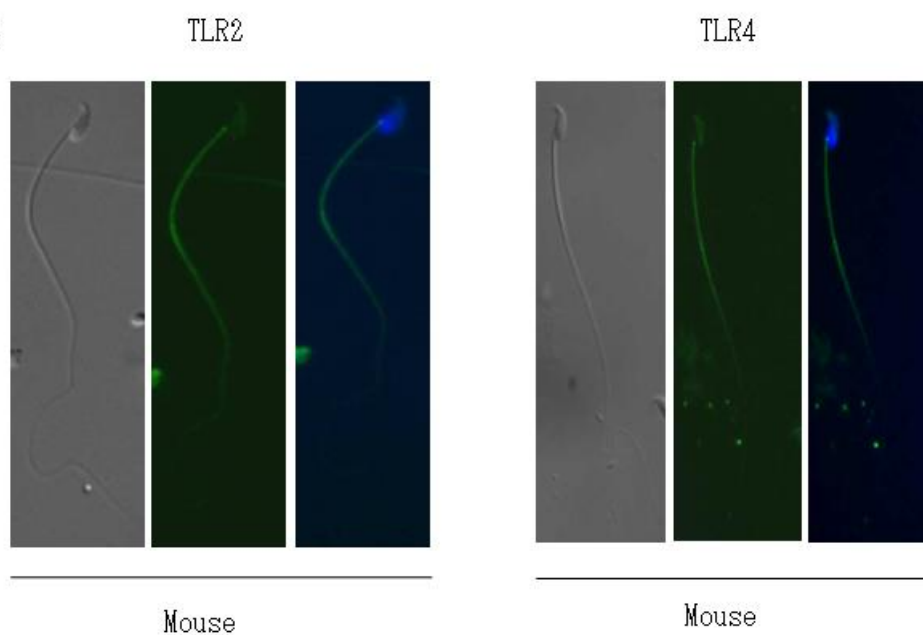


図3-1. マウス精子におけるTLR2 (*Tlr2*)およびTLR4 (*Tlr4*)の発現と局在

A: westernblottingによるマウス精子におけるTLR2とTLR4の発現解析

マウス脾臓を陽性コントロールとして用いた。

Acrosome reacted sperm; 先体反応誘起後の精子

マウス精子でのTLR2およびTLR4の発現が認められた。

B: 免疫蛍光染色法によるマウス精子のTLR2とTLR4の局在解析

青; DAPI (核)

緑; TLR2/TLR4

マウス精子の先体部にTLR2およびTLR4の局在が認められた。

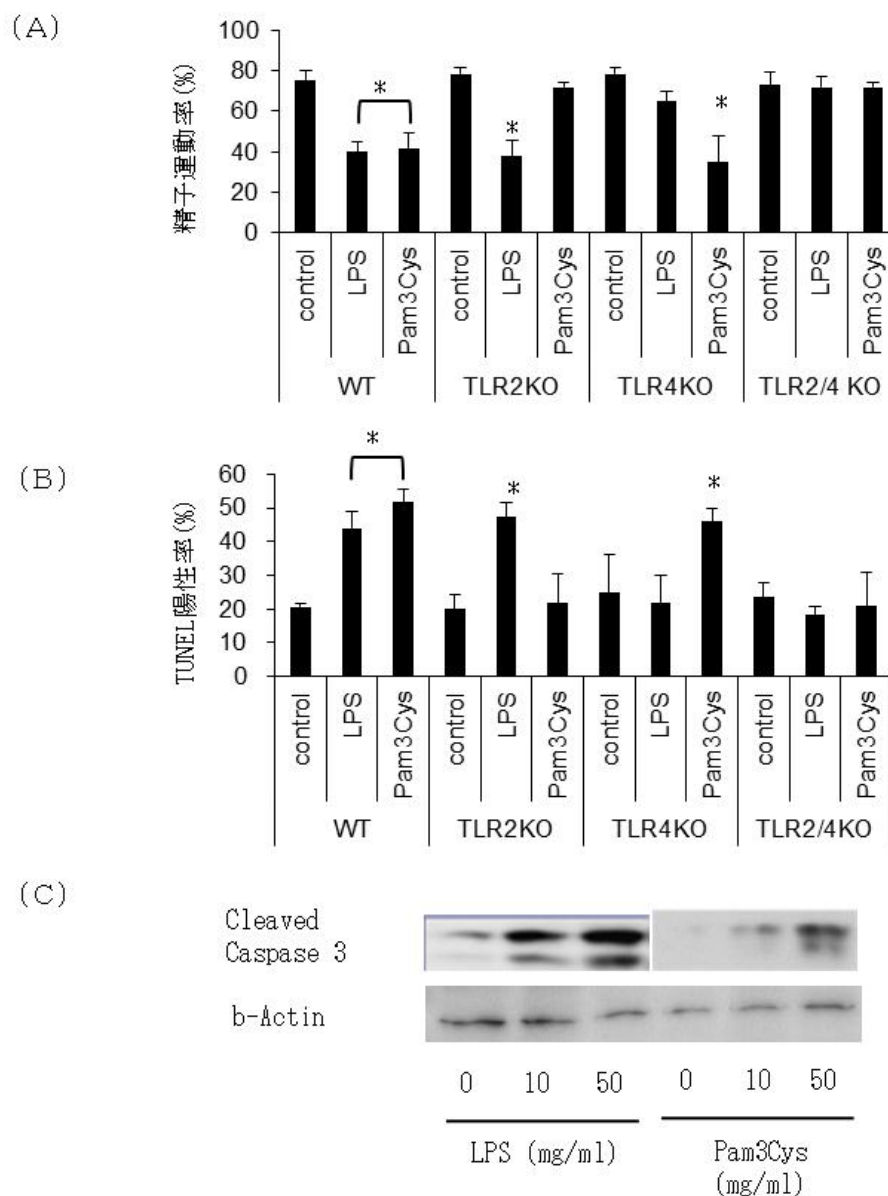


図3-2. 遺伝子欠損マウス精子を用いた、精子機能性への内毒素の影響

- A ; WT型, *Tlr2*^{-/-}, *Tlr4*^{-/-}, *Tlr2*^{-/-} *Tlr4*^{-/-}マウス精巣上体精子に100 ng/mlのLPS, 10 mg/mlのPam3Cysをそれぞれ添加し, 3時間培養後の精子運動性の比較.
WT型ではLPS, Pam3Cys処理によって運動性の低下が認められた.
Tlr2^{-/-}ではPam3Cysによる, *Tlr4*^{-/-}ではLPSによる運動性の低下は認められず, *Tlr2*^{-/-} *Tlr4*^{-/-}ではどちらの刺激に対しても運動性の低下は認められなかった.
- B ; WT型, *Tlr2*^{-/-}, *Tlr4*^{-/-}, *Tlr2*^{-/-} *Tlr4*^{-/-}マウス精巣上体精子に100 ng/mlのLPS, 10 mg/mlのPam3Cysをそれぞれ添加し, 6時間培養後のTUNEL陽性率の比較.
WT型ではLPS, Pam3Cys処理によって精子DNA断片化率の上昇が認められた.
Tlr2^{-/-}ではPam3Cysによる, *Tlr4*^{-/-}ではLPSによるTUNEL陽性率の上昇は認められず, *Tlr2*^{-/-} *Tlr4*^{-/-}ではどちらの刺激に対してもTUNEL陽性率の上昇は認められなかった.

C ; LPS, Pam3Cys添加による活性化型Caspase-3

数値は平均値 \pm SD

同一項目内において*はコントロールに対して有意差あり($P < 0.05$).

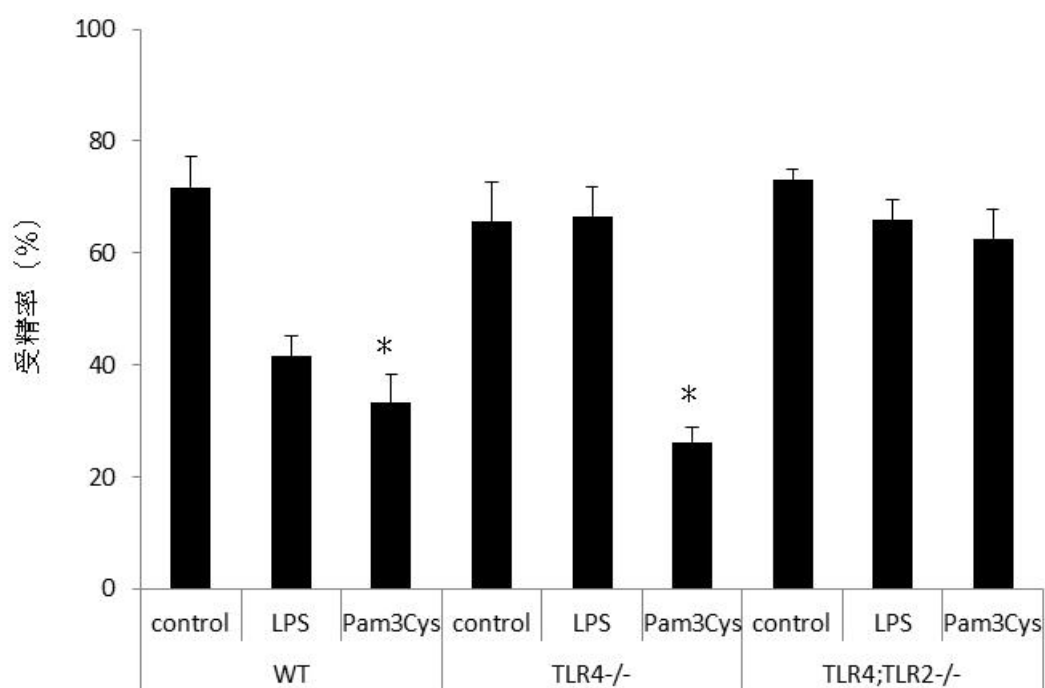


図3-3. 遺伝子欠損マウス精子を用いた体外受精での精子受精能への内毒素の影響

WT型, $Tlr2^{-/-}$, $Tlr4^{-/-}$, $Tlr2^{-/-} Tlr4^{-/-}$ マウス精巢上体精子をそれぞれLPS, Pam3Cys添加により60分間処理を行なった後, 受精培地中の最終濃度が1000個/ μ lになるよう調整し, 体外受精を行なった. 受精確認は, 媒精12時間後, 顕微鏡下で前核を観察した.

WT型ではLPS, Pam3Cys処理によって受精率の低下が認められた.
 $Tlr4^{-/-}$ ではLPSによる受精率の低下は認められず,
 $Tlr2^{-/-} Tlr4^{-/-}$ ではどちらの刺激に対しても受精率の低下は認められなかった.

数値は平均値 \pm SD
 同一項目内;*はコントロールに対して有意差あり($P < 0.05$).

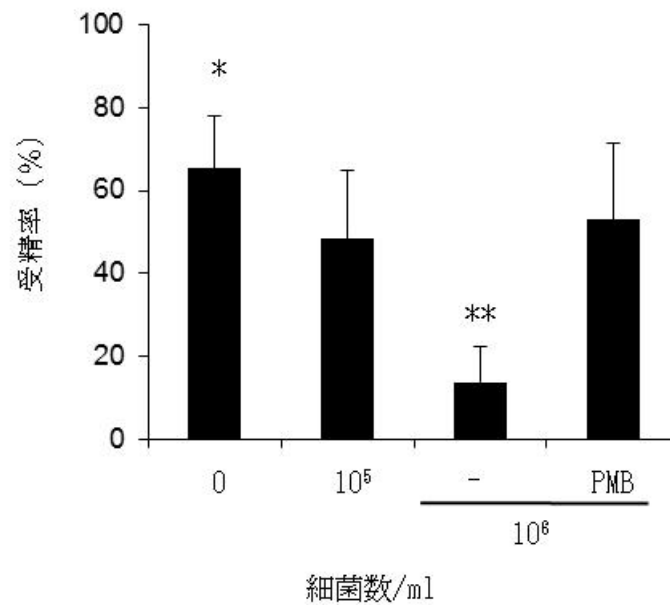


図3-4. 遺伝子欠損マウス精子を用いた人工授精での精子受精能への内毒素の影響

人工授精に用いる精子を 1×10^5 /mlもしくは 1×10^6 /mlの細菌存在下で1時間培養を行った。

また、 1×10^6 /mlの細菌培養群では、LPSの中和剤であるPMB添加処理を行った。培養後、それぞれ50 μ lをhCG刺激12時間後の雌マウス子宮内に注入した。受精確認は、媒精から12時間後に顕微鏡下で前核の形成を確認した。

高濃度の細菌で培養した精子を用いた人工授精の受精率は、コントロール群と比較して有意に高い値となり、その受精率の低下はPMB処理を行うことにより、抑制された。

数値は受精率の平均値 \pm SD

*,**間に有意差あり($P < 0.01$)。

第四章

ヒト精液中の細菌感染と内毒素の ART への影響と、 内毒素の影響を抑制する精液処理法の開発

序論

第三章により、マウス精子には TLR2 および TLR4 が発現し、それぞれのリガンドを特異的に認識することによって、精子の機能性および受精能に影響を与えることが明らかとなった。このことから、精液中の細菌は、免疫細胞を集積させ、それが分泌するサイトカインを介した間接的な影響だけでなく、細菌から放出される内毒素を精子の TLRs が直接認識する免疫様反応を引き起こすことが示された。また、ヒト精子にも TLR2 および TLR4 が発現しており、外因性のペプチドグリカンや LPS を認識すると、精子 DNA の断片化を誘起した。さらに、ヒト精液中にはグラム陽性菌やグラム陰性菌などの細菌感染症例が認められ、細菌が放出する内毒素が高濃度に存在することが明らかとなった。

上記の結果は、精液中の内毒素が高濃度に存在する症例では、精子 DNA 断片化率が上昇することを示唆している。高頻度に精子 DNA の断片化が認められる症例では、体外受精による受精率の低下のみでなく着床した場合でも高い流産率となることから (Borni et al., 2006)、精子における TLRs を介した精子 DNA の断片化の誘起が、精子の受精能やその後の胚発生に影響を与えていると推測された。したがって、精液中の内毒素による精子への負の影響を抑えるため、ART に用いる精液から内毒素の影響を排除する必要がある。

ART に用いる精液の処理は、精漿中から運動精子を回収することである (Henkel et al., 2003)。精子を回収する最も簡便な方法は遠心処理法であり、ヒトの体外受精の聡明期から用いられてきた (Edwards et al., 1969 ; Lopata et al., 1978 ; Edwards et al., 1980)。この方法は、抗生物質の含んだ培養液と精液を混合し、遠心分離器にて精子やその他の細胞を沈降させる方法である。細菌類は、抗生物質の溶菌作用により密度が低下することから、精子を得るための 500~700 g 程度の遠心処理では沈降しない。しかし、死滅精子や精液中の白血球などの細胞は、運動精子と共に回収されるという問題がある。死滅した細胞は、細胞の崩壊により活性酸素や細胞内タンパク質を放出する (Narita et al., 1998)。活性酸素は細胞膜を構成するリン脂質がペルオキシドへと変換し、これがタンパク質や DNA を酸化させることで細胞機能を低下させる (Son et al., 2009 ; Gavella et al., 2010)。また、放出された細胞内タンパク質の中には、ヒートショックプロテインや核内タンパク質が TLR4 のリガンドとなり、アポトーシスを

誘導すると報告されている (Luong et al., 2012; Zhang et al., 2012). 精子において, 酸化ストレスは運動性を低下させ, 本研究で示された TLR4 は DNA の断片化を誘導することから, 抗生物質存在下においても遠心操作は良好な精子を得る手段とはなり得ないと考えられる.

Swim-up 法は良好な運動精子のみを選別する方法であり, 遠心処理法と同様に培養液と混合後遠心処理を行い, その沈降精子を新しい培養液で再懸濁し, 上向してきた精子を回収する方法である (Mahadevan et al., 1984). Swim-up 法においても, 抗生物質を含んだ培養液で培養を行うことにより, 精液中の細菌が溶菌し, 処理の過程において内毒素濃度が上昇する. さらに, 精子が上向する間, 死滅した精子や白血球から放出される因子に精子は曝露された環境にある.

これらのことから, 精液と培養液を混合する前に精子を速やかに精漿から分離し, 運動良好で DNA が断片化していない正常精子を集める必要がある. 密度勾配遠心法は, 浸透圧を変えることなく密度調整が可能な polyvinyl pyrrolidone などを用いて成熟度の高いヒト精子の密度である 1.11~1.12 g/ml に合わせ, 回収する方法である. この密度勾配遠心法では, 精漿中に含まれる細菌や白血球などの混入した細胞のみでなく, 死滅精子を除去することができる (Colleu et al., 1996; Golan et al., 1997; Angelopoulos et al., 1998; Larson et al., 1999; Sakkas et al., 2000). さらに, 水溶性物質から精子のみを抽出することができることから, ART 精液の処理過程において, TLR が刺激されることでアポトーシスによる DNA 断片化が生じていない良好な精子を得ることが可能と考えた.

これらのことから, 精液中の細菌混入や, 細菌から放出される内毒素濃度の ART 結果へ与える影響を検討し, 精子への影響を排除する精子処理法を開発することを目的とした. 実験 1 では, 精液中の細菌混入の有無と媒精方法別受精率, Day3 での良好胚到達率と良好胚盤胞での凍結融解胚移植後の妊娠率, 妊娠継続率を後方視的に検討した. 実験 2 では, ヒト精液中の細菌として多く検出されたグラム陽性菌の内毒素であるペプチドグリカン濃度による媒精方法別受精率, Day3 での良好胚到達率と良好胚盤胞での凍結融解胚移植後の妊娠率, 妊娠継続率の検討を行った. 実験 3 では, 精液の処理法による, ペプチドグリカン濃度の変化を検討し, それぞれの処理法を用いたときの ART 妊娠率を後方視的に検討した.

材料および方法

精漿中のペプチドグリカン濃度の測定は第二章と同様に行った。すべての治療，研究への検体の使用には患者へインフォームドコンセントの後行った。

成熟卵の回収，媒精，胚の培養，凍結，融解，胚移植

成熟卵は症例により，各種卵巣刺激法である GnRH アゴニスト-ロング法，GnRH アゴニスト-ショート法，GnRH アンタゴニスト法のいずれかを施行した。方法については以下の通りである。

① Gn-RH アゴニスト-ロング法

採卵前周期の高温期中期から GnRH アゴニスト(セトロタイド;日本化薬株式会社)を連続投与する。月経開始後 3 日目より FSH (フォリルモン;富士製薬株式会社)もしくは hMG (hMG フジ;富士製薬株式会社, hMG コーワ;興和株式会社)を投与し，卵巣の発育状況により投与量を調節する。主席卵胞径が 18mm に達した時点で hCG (hCG モチダ筋注用;富士製薬株式会社)を投与し，34~35 時間後に採卵を行う。

② Gn-RH アゴニスト-ショート法

月経開始とともに GnRH アゴニスト(セトロタイド;日本化薬株式会社)を連続投与する。月経開始後 3 日目より FSH (フォリルモン;富士製薬株式会社)もしくは hMG (hMG フジ;富士製薬株式会社, hMG コーワ;興和株式会社)を投与し，卵巣の発育状況により投与量を調節する。主席卵胞径が 18mm に達した時点で hCG (hCG モチダ筋注用;富士製薬株式会社)を投与し，34~35 時間後に採卵を行う。

③ Gn-RH アンタゴニスト法

月経 3 日目より FSH (フォリルモン;富士製薬株式会社)もしくは hMG (hMG フジ;富士製薬株式会社, hMG コーワ;興和株式会社)を投与し，卵胞径が 14mm に達した時点で GnRH アンタゴニスト(ブセレキュア点鼻用;富士製薬株式会社)を併用する。主席卵胞径が 18mm に達した時点で hCG (hCG モチダ筋注用;富士製薬株式会社)を投与し，34~35 時間後に採卵を行う。

採卵は各卵巣刺激後，主席卵胞径が 18 mm 以上に達した時点で hCG 投与もしくは GnRH-analogue で LH サージを誘起し，34~35 時間で超音波ガイド下にて行った。採卵で吸引した卵胞液内から，卵丘細胞卵子複合体 (cumulus-oocyte complex; COC) を回収し，媒精まで 5% (w/v) Human serum albumin (Irvine scientific) 添加 human follicular fluid (HFF99; 扶桑薬品株式会社) で 37°C, 5%CO₂ 環境下にて培養を行った。媒精は精液所見等により決定し，それぞれ通常体外受精 (以下 con-IVF) もしくは顕微授精 (以下 ICSI) を行った。媒精後，19~20 時間で受精確認を行い 2 前核が確認できたものと，42~44 時間後までに分割が確認できたものを受精と判定した。Day1 から Day3 胚の培養

は cook cleavage medium (COOK) にて 25 μ l のドロップを作製し、ミネラルオイル (扶桑薬品工業) でカバーしたものを用い、個別培養を行った。Day3 胚のグレード分類は、Veck の分類を用いて行い、6 細胞以上かつグレード 2 以上を良好胚とした。ここで受精率とは、媒精に用いた卵における Day1 にて前核形成もしくは分割を確認した胚の割合とした。良好胚到達率は、受精した胚における Day3 にてグレード 2 以上の胚の割合とした。Day3 以降の胚の培養には、cook blastocyst medium (COOK) にて 25 μ l のドロップを作製し、ミネラルオイル (扶桑薬品工業) でカバーしたものを用い、個別培養を行った。Day5 胚のグレード分類は、Gardner の分類を用いて行い、サイズ 3 以上かつグレード B 以上を良好胚とした。良好胚盤胞の凍結と融解はそれぞれ、VITRIFICATION KIT (北里バイオファルマ) の vitrification media と Thawing media を用い、既存のプロトコールに準じて行った (Kuwayama et al., 2007)。凍結-融解胚移植は、ホルモン補充周期にて内膜を同調させ、胚盤胞胚移植を行った。良好胚盤胞到達率は、胚盤胞培養を行った胚におけるグレード B 以上で凍結可能な胚盤胞に達した割合とした。臨床的妊娠率は、胚移植を行った症例における胎嚢確認症例の割合とし、妊娠継続率は、胎嚢確認後、12 週まで妊娠継続した症例の割合とした。

精液処理

提出された精液は、第 2 章と同様に所見の測定を行った。

実験 1, 2 の精液は Swim-up 法のみで処理したものを用いた。Swim-up 法は、所見測定後の精液に 5% Human serum albin 添加 HFF99 を混合し、200 x g で 10 分間遠心処理を行った。遠心後、上清を捨て、回収した精子懸濁液を 1 ml の 5% Human serum albin 添加 HFF99 の下底に沈め、37°C, 5%CO₂環境下にて 30 分間培養を行った。培養後、最上層より運動精子を回収した。回収後の精子の精子数、運動率、奇形率、Krüger の strict criteria による正常形態率を測定し、原精液の値が WHO の基準を上回る、もしくは、Swim-up 回収後の運動精子数 1000 万 ml 以上、strict criteria の値が 4.0%以上は con-IVF もしくは split 法の対象とし、それ以下の場合は ICSI とした。

実験 3 で用いた Isolate 法は、50%, 90% Isolate (Irvine scientific) を用い、2 層 Isolate 法にて行った。液化した精液の全量を 1 ml の 90% Isolate, 1 ml の 50% Isolate の上に重層し、400 g で 15 分間遠心分離を行った。遠心後、上清を捨て、回収した精子懸濁液を 1 ml の 5% Human serum albin 添加 HFF99 の下底に沈め、37°C, 5%CO₂環境下にて 30 分間培養を行った。培養後、最上層より運動精子を回収した。回収後の精子の精子数、運動率、奇形率、Krüger の strict criteria による正常形態率を測定し、原精液の値が WHO の基準を上回る、もしくは、Swim-up 回収後の運動精子数 1000 万/ml 以上、strict criteria の値が 4.0%以上は con-IVF の対象とし、それ以下の場合は ICSI とした。

媒精方法は医師、培養士が説明し、患者とその家族の同意のもと決定した。

実験計画

【実験1】 ヒト精液中の細菌感染の有無と swim-up 法による ART への影響

実験1では、Swim-up 法にて精子を回収し、射出精液中の細菌の有無による受精率、Day3における良好胚到達率、臨床的妊娠率、妊娠継続率を媒精方法別に検討した。

【実験2】 ヒト精液中のペプチドグリカン濃度と swim-up 法による ART への影響

実験2では、Swim-up 法にて精子を回収し、射出精液中のペプチドグリカン濃度による受精率、Day3における良好胚到達率、良好胚盤胞到達率、臨床的妊娠率を媒精方法別に検討した。ペプチドグリカン濃度が検出限界以下の症例を低濃度群とし、それ以外を高濃度群とした。

【実験3】 精液の処理法によるペプチドグリカン濃度の変化

実験3では、精液処理法別のペプチドグリカン濃度の変化を、Isolate 処理の前後と、培養液中の抗生物質の有無での培養前後を比較することにより検討した。また、Swim-up 法のみと、Isolate/Swim-up 処理法による ART での妊娠率を、媒精方法別に比較した。

統計処理

各実験の結果は、Statcel(The Useful Addin forms on Excel)を用いて統計分析を行った。

受精率、Day3における良好胚到達率、良好胚盤胞到達率、臨床的妊娠率、妊娠継続率は、カイ二乗独立性の検定、2×2 分割表を用いて、2 方向要因の関連性を検定した。また、平均値の比較は、多重比較検定により平均値と標準偏差を算出し、判定した。それぞれ 5%水準で有意差を評価した。

結果

【実験1】精液中の細菌の有無とART成績との関係を明らかにするため、con-IVFとICSI施行症例に分け、それぞれにおいて細菌陽性症例と陰性症例の受精率、Day3における良好胚到達率、臨床的妊娠率、妊娠継続率を後方視的に解析した。なお、解析した症例は、精液をSwim-up法で回収したもののみとした。con-IVFおよびICSIともに、受精率、Day3における良好胚到達率において、細菌混入による影響は認められなかった。しかし、臨床的妊娠率では、con-IVFにおいて細菌陰性症例で37.3%、細菌陽性症例で25.8%、ICSIにおいては細菌陰性症例で35.0%、細菌陽性症例で16.0%であり、有意差はないものの、細菌陽性症例では臨床的妊娠率が低下する傾向を示した。さらに、妊娠継続率でも、con-IVFにおいて細菌陰性症例で32.8%、細菌陽性症例で19.4%、ICSIにおいて細菌陰性症例で30.0%、細菌陽性症例で12.0%であり、有意差はないものの、細菌陽性症例では臨床的妊娠率が低下する傾向を示した（図4-1A,B）。

【実験2】精液中に細菌混入が認められない症例においても、ペプチドグリカンが高濃度に検出される症例が存在する。このことから、精液中内毒素とART成績との関係を明らかにするため、con-IVFとICSI施行症例における受精率、Day3における良好胚到達率、良好胚盤胞到達率、臨床的妊娠率と精液中ペプチドグリカン濃度との関係を解析した。実験1と同様にswim-up法で精子を回収した症例を後方視的に解析した。その結果、con-IVF、ICSIともに、受精率、Day3における良好胚到達率、良好胚盤胞到達率において、ペプチドグリカン濃度による影響は認められなかった。しかし、臨床的妊娠率では、con-IVFにおいてペプチドグリカン低濃度症例で50.0%、ペプチドグリカン高濃度症例で8.3%であり、ペプチドグリカン高濃度症例で有意に低い値を示した（ $P<0.05$ ）。ICSIにおいても、ペプチドグリカン低濃度症例で28.0%、ペプチドグリカン高濃度症例で12.5%であり、有意差はないものの、ペプチドグリカン高濃度症例では臨床的妊娠率が低下する傾向を示した（図4-2A,B）。

【実験3】実験2において、精液中のペプチドグリカンが高濃度になると、ARTの予後に影響を与えることが示された。さらに、精液処理中には細菌の溶菌によりペプチドグリカン濃度が上昇すると考えられる。このことから、培養液に添加する抗生物質の有無による培養前後のペプチドグリカン濃度を測定した。さらに、細菌を除去するIsolate法での培養前後のペプチドグリカン濃度を比較した。

培養液に抗生物質を添加した時、3時間後のペプチドグリカン濃度は有意に上昇した。しかし、抗生物質フリーの培養液を用いた場合と、Isolate法にて処理を行った場合では、3時間培養後のペプチドグリカン濃度の上昇は認められなかった（図4-3）。次に、

ART 精液処理として Swim-up 法のみと Isolate/Swim-up 法を用いた場合，処理法別に臨床的妊娠率へ影響が認められるか検討した．con-IVF において，Isolate/Swim-up 法による臨床的妊娠率は 33.9%であり，Swim-up 法の 36.5%と比較して差は認められなかった．しかし，ICSI では，Isolate/Swim-up 法による臨床的妊娠率は 37.1%であり，Swim-up 法の 23.5%と比較して有意に高い値を示した（図 4-4）．

考察

マウス精子において、TLR2 および TLR4 を介して内毒素を認識することにより、受精率が低下する。また、ヒト精子にも TLR2 および TLR4 が発現しており、細菌が放出する内毒素を認識すると、精子の運動性が低下し DNA の損傷が増加することを示した。そこで、精液中の細菌や内毒素の有無によるヒト ART における受精率、胚発生、臨床的妊娠率の比較検討を行った。

本章実験 1, 2 において、精液中に細菌感染や細菌から放出される内毒素が高濃度に検出される症例では、con-IVF, ICSI のいずれにおいても臨床的妊娠率が低下した。しかし、マウスにおいて認められた受精率の低下は、本研究症例の con-IVF では認められなかった。ヒトにおいて、精子の頭部を染色し強拡大にて正常形態率を測定する strict criteria の値は、con-IVF の受精率を予測する基準となる。正常形態率が 4.0%以上の検体を正常とするが、基準値以下の症例では、受精率が低下する。このような低受精率が予測される体外受精において、精子濃度を高くした con-IVF を行っている。しかし、受精率は精子濃度依存的に有意に高い値となるが、一般的に良好胚率と着床率の上昇は認められないとの報告がある (Oehninger et al., 1996)。また、体外での受精では、すでに先体反応を起こし囲卵腔内に侵入した精子でも受精することが可能であるとの報告から、先体を損傷した精子であっても受精しうると推察される (Inoue et al., 2011)。本研究症例では、受精率を高めるために十分な精子濃度の体外受精を実施していることから、後方視的な細菌およびペプチドグリカン濃度と con-IVF の成功率に受精では差がでなかったものと考えられる。また、その受精率を高めたために異常精子が受精に使われ、その後の発生率の低下が引き起こされた可能性が高い。すなわち、高濃度な媒精精子の環境下では、精液中の細菌や内毒素によってアポトーシスを起こしている精子でも卵内に侵入し受精を完了するため、受精率には差は認められないが、その後の臨床的妊娠率に影響が現れると考えられた。ICSI においては、低倍率で運動性のある形態良好と判断できる精子を用い、人為的に卵内へ注入していることから、その影響を con-IVF 以上に受けやすいと推察される。これらのことから、媒精方法が con-IVF, ICSI のどちらにおいても、精液中の内毒素を除去し、精子のアポトーシスを抑制した条件で ART に用いる必要性が示唆された。

そこで実験 3 において、精子処理過程でペプチドグリカン濃度の上昇を抑制する方法の検討を行った。その結果、抗生物質非添加の培養液を用いた時、あるいは Isolate 法による精液の処理時では、ペプチドグリカン濃度が上昇しないことが明らかとなった。溶菌性の抗生物質は、細胞を死滅させる際に細菌の内毒素を菌体外に放出させることから (Appelmeik et al., 1994)、精子処理に用いる培養液を抗生物質非添加にすると溶菌せずに内毒素濃度が上昇しない。しかし、抗生物質非添加条件下では、グラム陰性菌な

どの重篤な細菌が体外受精およびその後の培養時に増殖し、受精卵移植時に子宮内へ混入する危険性がある。さらに、その増殖過程で培養液中の酸素や栄養素が用いられ、受精卵に悪影響をもたらすことも考えられることから、精子処理過程で細菌を死滅させ、かつ内毒素を除去する必要がある。Swim-up 法では、精液を遠心後、精子懸濁液を培養液中で培養する。このため、精液中の細菌は懸濁液中に残り、培養液中の抗生物質によりペプチドグリカン濃度が上昇すると考えられる。一方、Isolate 法は、培養液と混合することなく、射出後のより早い段階で細菌が混入している精漿中から精子を分離することができる。したがって、その後の精子懸濁液中の内毒素濃度は低値となり、精子が内毒素に曝される危険性を最小限に抑えることが可能となる。さらに本法は、高い運動性や良好形態の精子を死滅精子や白血球などと密度の違いにより分離することが可能である (Tomlinson et al., 2001 ; Morrell et al., 2004)。これらのことから、ART 用の精子処理には Isolate 法を行い、細菌が混入している精漿中からすみやかに精子を分離し、内毒素の影響を抑えることが必要と考えられる。実際に、実験 4 において、Isolate 処理を行うことにより ICSI 症例で有意に高い臨床的妊娠率を示した。ICSI 症例においては、con-IVF と比較して、精液所見が低い症例が多いことから、Isolate 処理を行うことによる効果がより大きく ART 結果に反映された可能性が考えられる。Isolate 法は人工授精などの施行時には用いられているが、本研究結果から、Swim-up 法に加え ART に用いる精子の処理法をとすべきであると考えられた。

受精卵における精子由来の遺伝子発現は、4~8 細胞期以降に発現することが報告されている (Seli et al., 2004)。マウスにおいては、単為発生由来胚が妊娠 10 日目までしか生存しないことが報告された (Witkowska et al., 1973)。さらに、前核置換により雌核発生胚および雄核発生胚を作出し、両者の発生能を検討したところ、いずれも 10 日目までしか生存しないことが示された (Surani et al., 1986)。つまり両性ゲノムの発現は移植胚である胚盤胞期への発達には必要なく、着床、その後の発生において必須である。また、この胚盤胞期胚までの発達では、雌核発生胚では良好であるのに対し、雄核発生胚では内部細胞塊の形成不全となる。一方、雄核由来胚では、栄養外胚葉細胞の増殖が顕著となることから、着床を左右する胚盤胞の栄養膜細胞ゲノムは、父性遺伝子に由来していることが示唆された。したがって、精子が高頻度に DNA の断片化を起こしている症例では、DNA 異常の精子が受精することにより、着床と胎盤形成に影響が現れると考えられる。これらのことから、媒精に用いた精子が細菌感染や細菌から放出される内毒素により精子 DNA の断片化を高頻度に起こしている場合、DNA 異常の精子が受精することによって、胚の後期から影響が認められ、胚盤胞に到達はするものの栄養膜細胞の発生に負の影響を与えることにより、臨床的妊娠率や妊娠継続率の低下を引き起こすと考えられる。

以上の結果から、①ヒト精液中の細菌混入は、ART へ負の影響を与えること、②ヒト精液中のペプチドグリカン高濃度が、ART へ負の影響を与えること、③精液中のペプチ

ドグリカン濃度の上昇を抑制するためには Isolate 法が効果的であること、④Isolate 法を行うことにより ART における臨床的妊娠率が上昇することが明らかとなり、ART の精液処理には Isolate 法が必要であることが示された。

要約

第三章より、マウス精子に発現している TLR2 および TLR4 は、それぞれのリガンドを認識することによって、体外、体内のいずれにおいても受精能を低下させることが明らかとなった。そこで、ヒト ART の成績と精液中の細菌の有無、内毒素濃度との関連を検討した。さらに、精液中の内毒素濃度の変化を測定し、より内毒素を除去することが可能な精液の処理法を検討した。

本章実験 1, 2 において、Swim-up 法にて精子を回収し、精液中の細菌の有無もしくはペプチドグリカン濃度と ART 予後を媒精方法別に検討した。その結果、細菌陽性症例やペプチドグリカン高濃度症例において、受精率には差は認められないものの、妊娠継続率が低くなることが明らかとなった。このことから、ヒト ART においても、精液中の細菌感染や細菌から放出されるペプチドグリカンに曝され、DNA 断片化を誘起した精子を用いることによって、ART の予後へ負の影響を与えることが示された。細菌の内毒素は溶菌時に細菌から放出されるものであり、経時的に増加することが推察されたため、実験 3 では、精液処理法別に内毒素濃度の変化を比較した。培養液に抗生物質を添加し精液と混合して培養すると、培養前と比較して内毒素濃度の増加が認められた。しかし、抗生物質を非添加もしくは、培養液と混合前に Isolate 法により精子と精漿を分離し培養を行うと、内毒素濃度の増加は認められなかった。このことから、内毒素濃度の増加を抑制するためには、Isolate 法での精液処理が有効であることが明らかとなった。そこで、ART の精液処理として Swim-up 法のみ行った症例と Isolate/Swim-up 法を行った症例において、ART 臨床的妊娠率を比較した。その結果、con-IVF では両群に差は認められなかったが、ICSI においては、Isolate/Swim-up 法を行った症例が有意に高い臨床的妊娠率を示した。以上のことから、精液中の細菌や内毒素を効率良く除去することがヒト ART を成功させるために必要であることが明らかとなった。

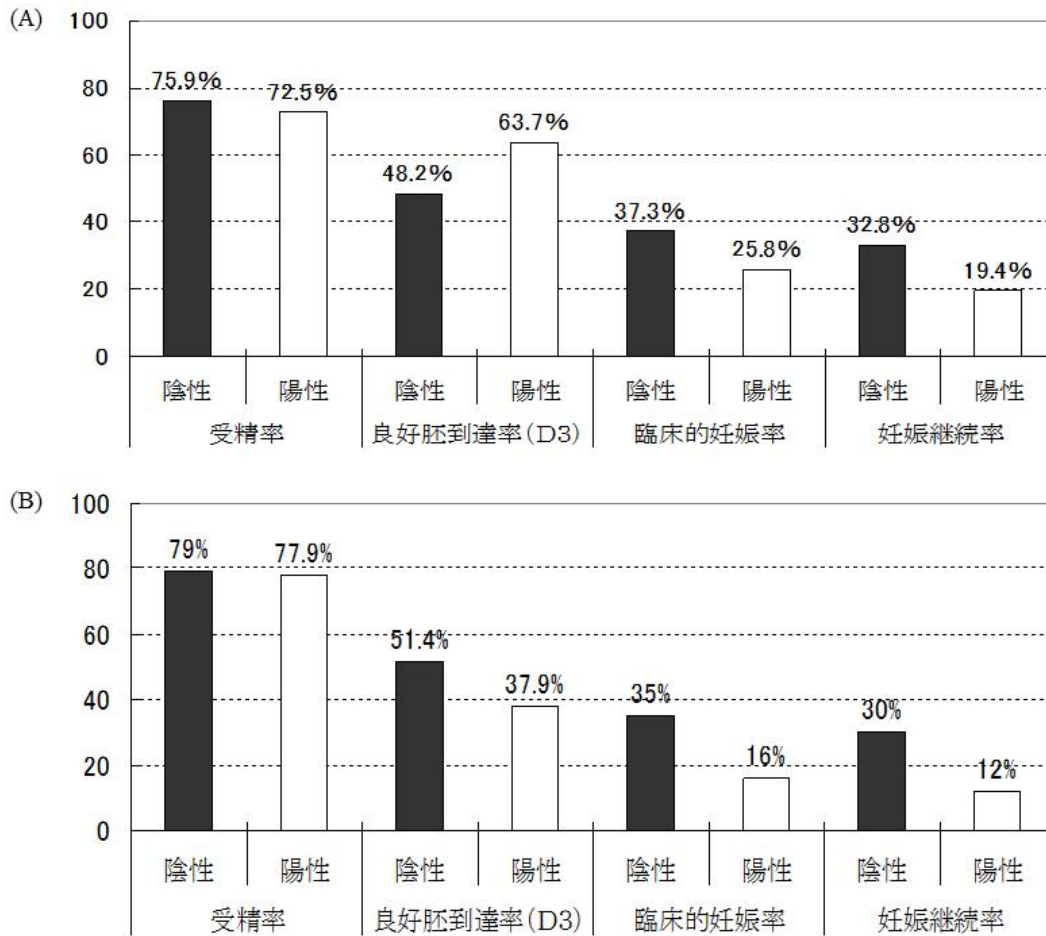


図 4-1. 細菌感染陽性／陰性別ART結果への影響

A: swim-up法にて精子を回収し, con-IVFを行なった周期での受精率, Day3での良好胚到達率, 臨床的妊娠率, 妊娠継続率を細菌混入が陽性/陰性別に比較した.

臨床的妊娠率, 妊娠継続率において有意差はないものの, 細菌混入が陽性の症例において低くなる傾向を示した.

B: swim-up法にて精子を回収し, ICSIをおこなった周期での受精率, Day3での良好胚到達率, 臨床的妊娠率, 妊娠継続率を細菌混入が陽性/陰性別に比較した.

臨床的妊娠率, 妊娠継続率において有意差はないものの, 細菌混入が陽性の症例において低くなる傾向を示した.

受精率: 媒精に用いた卵における, 2前核確認卵もしくはDay2での分割卵の割合

良好胚到達率: 受精卵における, Day3にて6細胞以上, Veeckの分類を基にしたグレード分類でグレード2以上の胚の割合

臨床的妊娠率: 胚盤胞で凍結, 融解胚移植を行った症例における, 胎嚢確認症例の割合

妊娠継続率: 胚盤胞で凍結, 融解胚移植を行なった症例における, 6週まで妊娠が継続した症例の割合

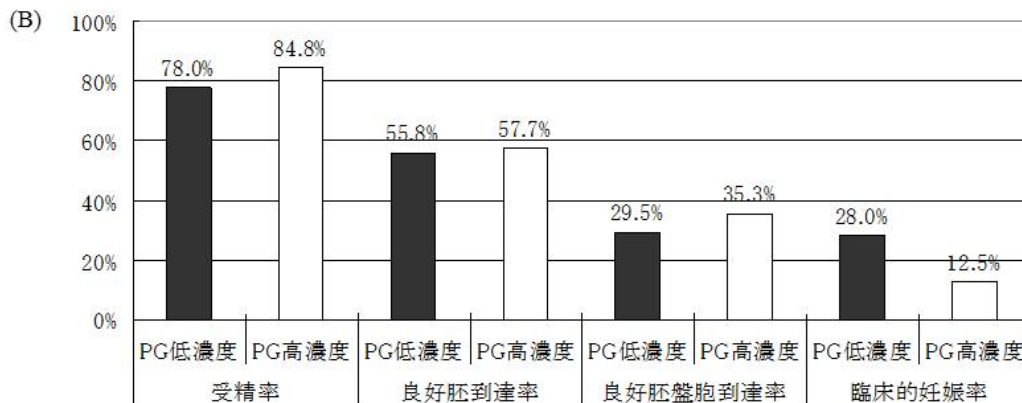
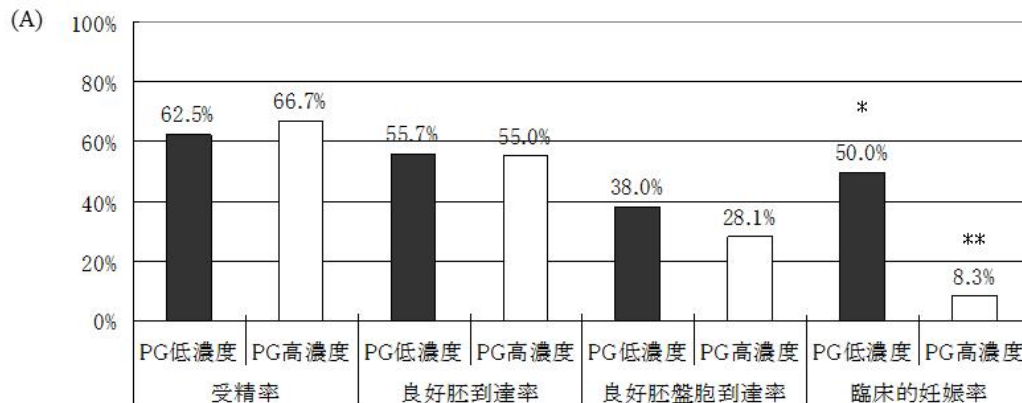


図4-2. ペプチドグリカン高濃度/低濃度別ART結果への影響

A: swim-up法にて精子を回収し、con-IVFを行なった周期での受精率、Day3での良好胚到達率、良好胚盤胞到達率、臨床的妊娠率をペプチドグリカン濃度別に比較した。

臨床的妊娠率においてペプチドグリカン高濃度症例では、低濃度症例と比較して有意に低い値を示した。

B: swim-up法にて精子を回収し、ICSIを行なった周期での受精率、Day3での良好胚到達率、良好胚盤胞到達率、臨床的妊娠率をペプチドグリカン濃度別に比較した。

臨床的妊娠率においてペプチドグリカン高濃度症例では、低濃度症例と比較して有意差はないものの低くなる傾向を示した。

受精率: 媒精に用いた卵における、2前核確認卵もしくはDay2での分割卵の割合

良好胚到達率: 受精卵における、Day3にて6細胞以上、Veeckの分類を基にしたグレード分類でグレード2以上の胚の割合

良好胚盤胞到達率: 受精卵における、Gardnerの分類を基にしたグレード分類で、胚のサイズが3以上、ICM、TEのグレードのいずれかがB以上の胚の割合

臨床的妊娠率: 胚盤胞で凍結、融解胚移植を行った症例における、胎嚢確認症例の割合

*,**間に有意差あり($P<0.05$).

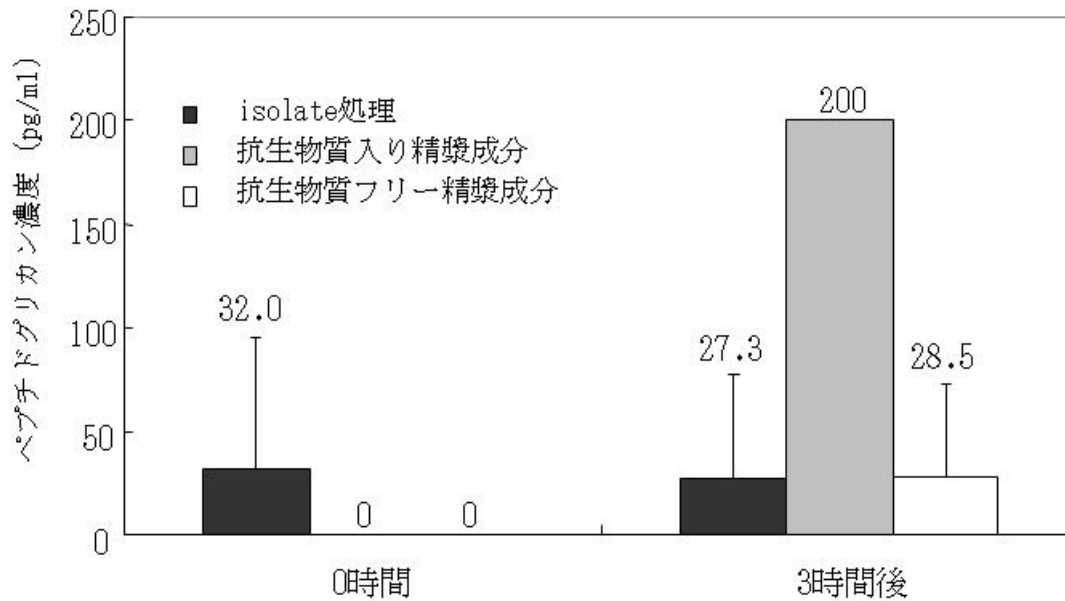


図 4-3. 精液処理法による，培養前後のペプチドグリカン濃度の変化

■ isolate処理

処理前の精漿中のペプチドグリカン濃度と，Isolate処理後のペプチドグリカン濃度の平均値±S.D.を算出し，比較した。
3時間培養後のペプチドグリカン濃度の上昇は認められなかった。

□ 抗生物質入り精漿成分

培養液と混合する前の精漿中のペプチドグリカン濃度と，溶菌性の抗生物質であるゲンタマイシンを含んだHFF mediumを混合し，3時間培養後のペプチドグリカン濃度の平均値±S.D.を算出し，比較した。
3時間培養後のペプチドグリカン濃度は症例差が大きく生じていたため，200pg/mlを最大値とした。
3時間培養後のペプチドグリカン濃度は培養前と比較して大幅に上昇した。

□ 抗生物質フリー精漿成分

培養液と混合する前の精漿中のペプチドグリカン濃度と，抗生物質を含まない培養液を混合し，3時間培養後のペプチドグリカン濃度の平均値±S.D.を算出し，比較した。
3時間培養後のペプチドグリカン濃度の大幅な上昇は認められなかった。

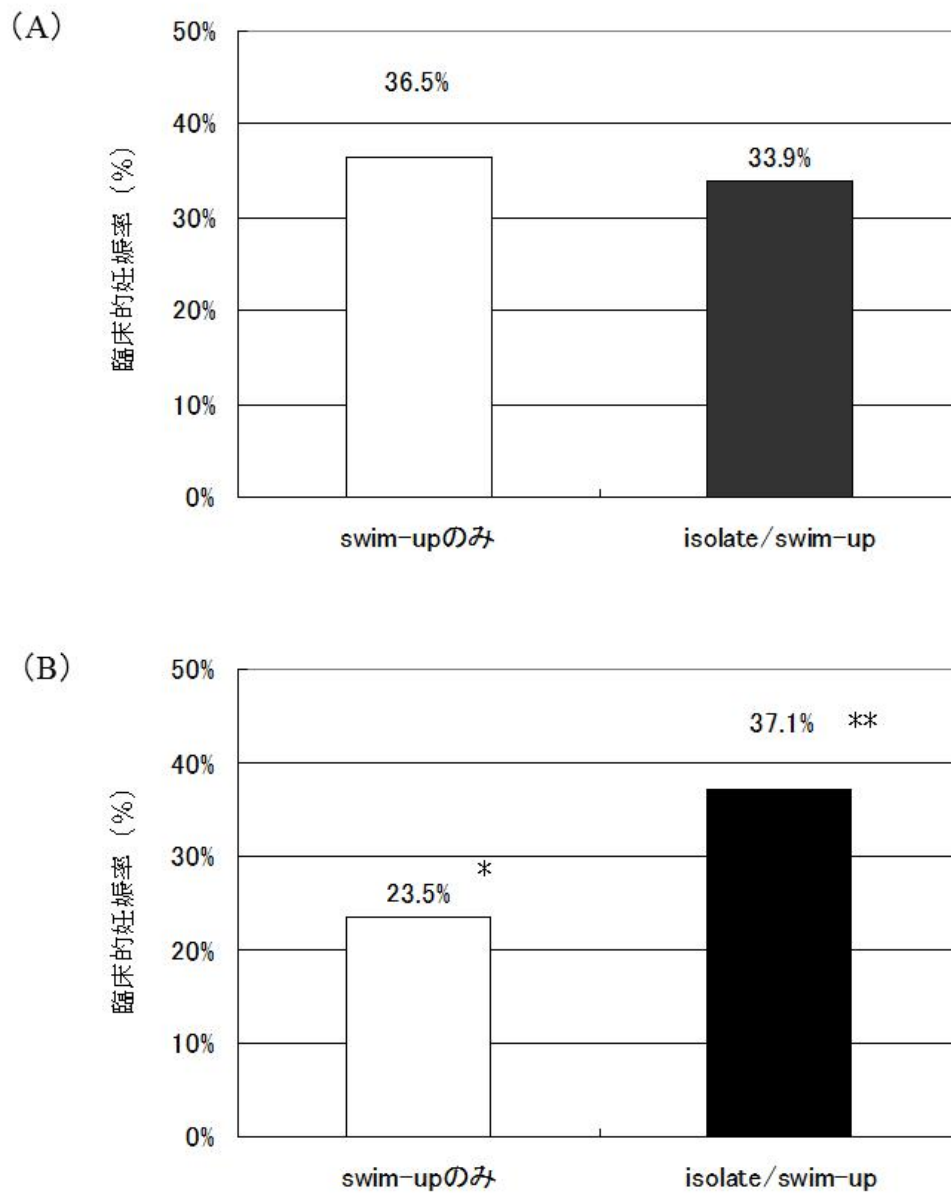


図 4-4. 精液処理法における, con-IVF(A)もしくはICSI(B)症例の臨床的妊娠率の比較
*,**間に有意差あり ($P < 0.05$).

第五章 総合論議

ヒトをはじめとする獲得免疫をもつ動物では、T 細胞や B 細胞が免疫記憶を誘導し、侵入した異物に特異的に反応する。一方、非特異的に異物を認識する自然免疫系もまた、重要な働きをしていることが明らかとなってきた。自然免疫は主にマクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞によって担われている (Kawai et al., 2006)。マクロファージや白血球が生体内に侵入した異物を認識すると、食作用により異物を細胞内に取り込み、食胞を形成する。食胞内は低 pH で多種類の分解酵素を有しており、その結果、細菌などの異物は分解される。この異物断片により抗原提示が行われ、獲得免疫系を活性化させることから自然免疫応答は初期免疫とも呼ばれている。

自然免疫は、T 細胞や B 細胞などの獲得免疫を持たない昆虫類でその役割と仕組みが研究されてきた。これらの生物種では、細菌などの異物を抗菌ペプチドによる溶菌や増殖抑制あるいは貪食による排除を血液中の細胞が行っている。これらの仕組みは、まず異物を非自己として認識し、その感知によって細胞内シグナル伝達系を活性化させる。この非自己の認識は、pattern recognition receptor として知られている Toll 様受容体 (TLRs) が担っている。TLRs は NF- κ B を活性化させることで抗菌ペプチド類を発現させるとともに、異物を貪食するスカベンジャー受容体の形成を促し、p38MAPK がその貪食形成を促進する (Jiang et al., 2008)。この TLRs は、哺乳動物の白血球においても発現していることが報告され (Medzhitov et al., 1997)、その遺伝子欠損マウス解析から、TLRs による異物認識がサイトカインやケモカインの発現、分泌を介して、獲得免疫機能を活性化させることが示された。この TLRs はヒトでは 11 種類が family を形成し、それぞれが細菌のリポ多糖、ペプチドグリカン、リポペプチドなどを認識する。さらに、1 本鎖 RNA、2 重鎖 RNA、非メチル化 CpG DNA といったウィルスの構成物も TLR により認識されることが知られている。

近年、免疫細胞以外にも TLRs の局在が報告されており、生殖器官においても卵管や子宮、子宮頸部などの上皮細胞の細胞膜で TLRs の発現が検出されている (Wira et al., 2005)。これらの細胞に発現している TLRs は、細菌やウイルス、真菌などを認識することにより、生体外から雌性生殖器内に侵入した異物に対し、抗菌作用を示す (Wira et al., 2010)。雌性生殖器官は性周期により大きく構造と機能を変化させるが、TLRs の発現もまた、性ステロイドによる支配を受け、排卵期にその発現が亢進される。この時期は、子宮口が弛緩し、外部から異物の進入が可能となること、交尾により精子と共にウイルスや細菌が混入する可能性も高まることから、TLRs の発現により感染防御機能が高められていると考えられる。また、ラットにおいて、雄性生殖器である精巣や精巣上体の上皮細胞にも TLRs が発現が認められた (Palladino et al., 2008)。精巣にお

ける TLRs は精細管内のセルトリ細胞に発現している。しかし、精細管内は血液精巣閉門があるため感染は考えられない。したがって、その役割は、アポトーシスを起こした精細胞の除去と考えられる。一方、精巣上体上皮細胞における TLRs の役割は、精子成熟過程で貯蔵された精子の中でアポトーシスを起こしたものの排除とともに、精管を上向してきた異物の除去にも関わっていると推察される。精巣上体における重度の感染は、精巣上体管内への白血球の浸潤による精子の貪食、それによる抗精子抗体形成による精子形成不全を引き起こす。さらに、白血球の産生する TNF- α や活性酸素は精子のアポトーシスを誘導する。したがって、精巣上体の上皮細胞に発現する TLRs は、重篤な感染状態となることを抑制し、精子の生存を担保していると考えられる。このように、管腔を形成する器官の上皮細胞において、TLRs の発現は、より早い段階での異物の認識を可能とすると考えられる。精子は射出後、体内外環境で直接異物と接する特殊な細胞であることから、精子においても TLRs を介する自然免疫応答を持つのではないかと推測した。

そこで、ヒトおよびマウス精子において TLRs の発現解析を行ったところ、ヒトおよびマウス精子には TLR2 および TLR4 が先体部に局在しており、精液中の内毒素を認識し、精子 DNA の断片化を引き起こすことが明らかとなった(図 5-1)。

Palladino et al. (2008) は、ラットの精子においても TLR1-9, 11 が発現することを報告した。さらに鳥類である家禽 (Ozoe et al., 2009 ; Das et al., 2011), 偶蹄目であるブタ (Okazaki et al., 2010) に至るまで精子に TLRs の局在が確認されている。このことから、幅広い動物種において精子に自然免疫応答を担う免疫機能が存在することは明らかであり、これまで報告されていないウシや実験動物として生殖工学技術がさかんに実施されているイヌ、サルなどの精子にも TLRs が発現していると考えられる。したがって、下記に示す本研究で明らかとなった TLRs の機能を考慮した精子処理法は、いずれの動物種の体外受精や人工授精に適応することが必要である。

本研究の第四章において、ヒト精子の TLR2 および TLR4 が内毒素を認識すると、受精率、その後の胚発生には影響は認められないものの、流産率が上昇することが明らかとなった。ART における胚移植では、その発育ステージによって胚のグレード分類を行い、良好胚のみが移植の対象となる。父性遺伝子は、胚の発育後期と、着床を担う栄養膜細胞に影響を及ぼすため、精子 DNA の断片化は胚の着床に負の影響を及ぼす。このことから、内毒素が高濃度の症例において、DNA の断片化を誘起している精子が卵内に侵入す

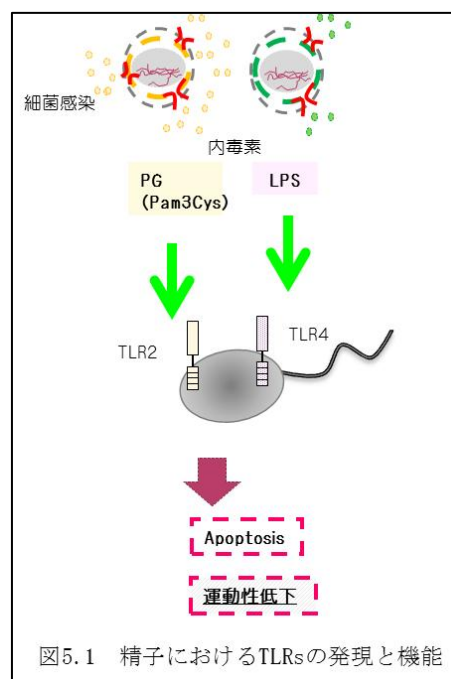


図5.1 精子におけるTLRsの発現と機能

ることにより、受精、分割し、初期胚移植の際にはグレード良好のため移植するが、その後は父性遺伝子の発現がないため、着床に至らないか、着床しても初期の段階で流産してしまうと推測される。流産は母胎への影響も大きく、深刻な問題であり可能な限りその危険性を低下させる必要があるが、グレードが良好であればその時点でその胚の着床能を予測することは困難である。また、マウス精子においては受精能に負の影響が認められた。これらのことから、精子における初期の自然免疫応答は、精子の受精能、その後の父性遺伝子の発現に影響を及ぼすため、ARTに用いる精子から内毒素の影響を軽減することが、生存性の高い胚を作出するために必要であると考えられた。

上記の繁殖障害が起こる可能性を排除する目的で、ヒト精液の至適な処理法を検討し、正常精子の受精率を上げる精液処理法の開発を行った。ヒト精液では、グラム陰性菌検出頻度は低く、グラム陽性菌が多く検出された。このことからグラム陽性菌の内毒素であるペプチドグリカンの影響が大きいと考えられる。しかし、ペプチドグリカンは、タンパク質が混在していない試験管内では、プロテアーゼにより不活化することができるが、生体成分中では中和する薬剤は存在しない。一方、TLR2あるいはTLR4へのリガンド結合を抑制する薬剤、あるいは下流シグナル系を特異的に阻害することは将来応用できる可能性がある。すなわち、TLR2あるいはTLR4に対する中和抗体を精液処理液に添加する方法や(Shimada et al., 2008)、敗血症の治療薬を用いる方法がある。敗血症は細菌感染症の治療時に抗生物質により急激に内毒素が放出され、重篤な症例では死に至る疾患である。現在治療段階にある薬剤はTLR2あるいはTLR4の下流を標的とする化合物であり、これが精液の処理に利用できる可能性はある。しかし、現状では、ペプチドグリカンを精液中で中和する方法はない。したがって、精子とペプチドグリカンを分離することが必要であり、第四章にて精子懸濁液中のペプチドグリカン濃度の上昇抑制に成功した、Isolate法を用いることが有効な手段である。

一方、ブタ精液では、70%以上の個体から細菌感染が認められ、その多くはグラム陰性菌と報告されている。ブタ射出精液をペニシリンGとアミカマイシン添加条件、37°Cで3時間培養を行うと、グラム陰性菌の内毒素であるLPS濃度が精液中で上昇する。しかし、このLPS濃度の上昇とそれに伴う精子運動率低下は、LPSの中和剤であるPMBによって抑制されることが報告されている(Okazaki et al., 2009)。また、ブタ精子を凍結する際、培養液にLPSの中和剤であるPMBを添加すると、融解後の生存性や人工授精による受胎率が向上する(Okazaki et al., 2010)。これらのことから、ブタ精子の機能性維持のためには、PMB処理により内毒素による負の影響を緩和させる必要がある。このようにブタでは、感染細菌は主にグラム陰性菌であることから、LPSの中和剤であるPMBの使用が効果的であると考えられる。また、ブタの精液量は100 ml以上であり、精液を直接Isolate法を行うことは難しいことから、射出精液に直ちにPMBを添加することが最良の手段である。

ウシ精液においても細菌感染は認められ、ブドウ球菌などのグラム陽性菌や、緑膿菌

やプロテオバクテリアなどのグラム陰性菌が検出されている (Akhter et al., 2008 ; Gonzalez et al., 2010). 日本におけるウシの人工授精は, 1961 年の家畜改良法の改正により, 凍結精液の使用へと切り替えられ, 肉牛, 乳牛のいずれにおいてもほぼ 100% の割合で凍結精液を用いた人工授精による種付けが行われている. ウシ精液の処理には細菌の抑制のために抗生物質の複合処理が検討されてきた. 古くからはペニシリンGとストレプトマイシンの複合処理が行われてきたが, ゲンタマイシン, チロシン, リオノマイシン, GTLS の複合処理によって精子保存後の生存性が上昇することが報告されている (Akhter et al., 2008). このように, 抗生物質のコンビネーションによって細菌による精子への間接的影響を抑制しているが, グラム陽性菌から内毒素が放出され, それが精子機能を低下させている可能性は高い. 近年, ウシ精子の人工授精による妊娠率は6割以上となっており, 一つの手段としてヒト精液同様の Isolate 処理を取り入れることが成績向上につながるかもしれない.

さらに, Isolate 法は, ウイルス感染にも応用可能である. ウイルス感染した精液においても, 精子は運動性が低く, その受精能も限定的である. Mihara et al. (2010)は, 精子に DNA ウイルス特異的配列である脱メチル化 CpG 配列を認識する TLR9 が発現していることを報告した. この TLR9 は, ウェスタンブロット解析の結果, TLR9 のタンパク質レベルでの発現も検出されたが, 先体反応を誘起した精子では, そのバンドが薄くなっていたことから, TLR9 が精子頭部に局在していると推察された. さらに, TLR9 のリガンドは, 先体の損傷を促し, BSA による受精能獲得誘起を抑制した. 体外受精および人工授精試験の結果, TLR9 リガンドで前培養した精子の体内, 体外における受精能が有意に低下することが示された. これらのことから, 精子にはウイルスの DNA である脱メチル化 CpG 配列を感知する TLR9 が発現し, 精液中のウイルス感染を感知可能であることが示唆された. ヒト精子においても, ウイルス感染により精子機能性が低下することから, ウイルス感染を認識する TLR9 の局在が推測される. TLR9 は, 一般的に細胞表面でなく細胞質内に局在している. 精子が TLR9 を発現し, それが機能していることは, 精子にウイルスが感染しうることを意味している. このような精子が受精した場合, 受精卵はウイルス感染していることから, 発生への影響やウイルス潜伏による将来的な発症リスクにみまわれる. しかし, TLR9 を介したウイルス認識機構は, 先体損傷を引き起こすことから, Isolate 法による形態正常な精子をウイルスや内毒素から分離する処理が, 非感染精子を回収する方法となりうる. 実際に, 密度勾配遠心法は, 精液中の HIV ウイルス除去にも有効な手段であることが報告されている (Politch et al., 2004).

このように, 精子 DNA の正常性は, その精子を用いた体外受精の成功に大きく関与するものである. しかし, 現在の精子の検査では, 第一章に示した通り, 精子数や運動率などの目視できる検査にとどまっており, 一般的に精子 DNA 断片化の検出は行われていない. 特にヒト ART では, 臨床時の精子 DNA 断片化の検査は, コストや検出時間の面で

困難であることが予想される．そこで，精子 DNA の断片化率を示す指標として，ブタ精子における細菌数と精子運動性の関連について示した報告に着目した．これは，細菌が検出される精液を長時間 37℃ で加温した時の精子の運動性低下を測定した報告であり，採精直後には精液中の細菌数と精子運動性との間に統計的な関連性はない．しかし，抗生物質存在下にも関わらず，6 時間後の運動性では，培養前の細菌数との間に負の相関が認められる．さらに 6 時間後の精子 DNA の断片化率にも培養前の細菌数との間に正の相関が検出された (Okazaki et al., 2010)．すなわち，運動性の値を射出直後では細菌による影響は検出できないが，長時間の培養後ではじめて，精子の正常性を表すことができることとなる．したがって，通常の精液検査時の運動性ではなく，長時間培養後の精子運動性を比較することによって，精液中の細菌や内毒素の混入による精子 DNA の断片化の頻度を予測することが可能であると考えられた．具体的には以下のような方法で，精液の所見により至適な処理法と媒精方法の選択が可能であると推察される．太線矢印が今回の検討において必要と考えられた検査法を精液処理である．

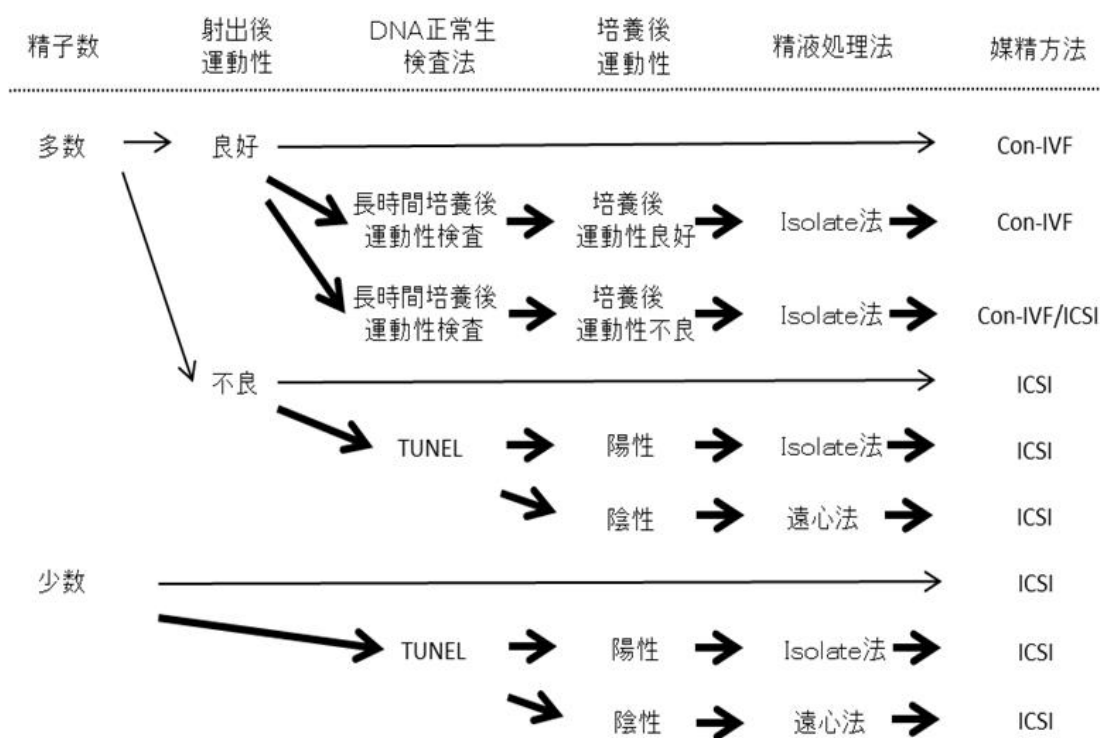


図 5-2. ヒト ART 時の精子 DNA の正常性検査法とそれにより選択された精液調整法，媒精方法

従来，射出精子数が多数であり，運動性が良好である場合は，con-IVF を施行するが，媒精に用いる精子の DNA 正常性を調べるため，長時間精子を培養した後の精子運動性を測定した上で，精液中の内毒素濃度を抑制するため Isolate 法にて精液処理を行う．また，精子数が多数であっても精子運動性が不良な場合や，精子数が少数である場合には，

TUNEL により精子 DNA の正常性を測定した上で精液中の内毒素濃度を抑制するため Isolate 法にて精液処理を行うことが必要であると考えられる。また、Isolate 法での内毒素の除去は、グラム陽性菌が多く、精液量が比較的少量な種に対し行う方法である。しかし、ブタなどのように精液量が多く、グラム陰性菌が多く混入している種にたいしては、Isolate 法の代わりにグラム陰性菌の中和剤である PMB 処理を行うことが最適である。

このように、現在行われている体外受精・ICSI は、受精率や胚発生は高い値であるが、着床率は低く、流産率が高いため、生児を得られる率は低い。このことは精子 DNA の断片化が関与していると考えられる。その原因として、精液中の内毒素が精子に局在する TLR2 および TLR4 を介して、精子が DNA の断片化を起こしていることが明らかとなった。精子 DNA 断片化の誘起に影響する精液中の細菌や内毒素の除去は、精液の特性、精液中に存在する細菌種の傾向などを考慮し、至適な処理法を行う必要がある。特に精子による内毒素の認識は、白血球による自然免疫応答をよりも前の段階での免疫応答であるため、効率よく内毒素の暴露から精子を保護することが必要である。本研究では、精子を精液中の内毒素の影響を速やかに抑制することによって、精子の DNA の断片化を抑制し、受精後の胚の生存性を維持するための精液処理法を開発した。その成果は、精液の処理法を種特異的にを行うことにより、流産率の低下につながり、ヒトの ART のみではなく、家畜繁殖技術に大きく貢献するものであると考えられる。

第六章

総括

体外受精や顕微授精 (ICSI) の技術の進歩により、ヒトを含めて雌雄どちらにおいても繁殖 (生殖) 能力に障害を持った個体で、高い受精率が期待できるようになった。しかし、未だに胚移植後の妊娠率は低く、流産率は自然妊娠よりも高い。このような胚の発育停止には、胚の染色体異常が高率に起きていることが原因であると考えられている。胚の染色体異常には、卵子側、精子側それぞれの因子が考えられている。両者において、減数分裂過程における染色体分配異常がその原因として挙げられるが、精子においては、射出後に DNA 断片化が生じると報告されている。父性由来の遺伝子は、桑実胚以降に急速に発現が上昇し、栄養膜細胞における胎盤形成に関与していることが知られており、精子処理過程における DNA の断片化は、桑実胚以降の胚発生の停止、胚盤胞形成不全や栄養膜細胞の機能低下による着床不全と流産を引き起こすと推測される。精子 DNA の断片化を引き起こす要因として、酸化ストレスや細菌感染などが推察されるが、その詳細は不明である。本研究では、精子の DNA 断片化が起こる仕組みとして、細菌が放出する内毒素の精子に与える影響に着目し、精子の自然免疫能の分子生物学的解析とそれをコントロールする精子処理法の開発を試みた。

ヒト精子における TLR2 と TLR4 の発現とその生理的役割の解明

生殖器に細菌が感染すると精液中にも細菌が混入し、その結果白血球が増加し、精子の機能が悪化する。これらの細菌による精子への影響は、白血球の TLRs による自然免疫応答により TNF- α が分泌され、それが精子 DNA の断片化を誘起すると考えられる。一方、精子を含む生殖細胞にも免疫細胞様の機能があることが報告されていることから、白血球増加以前の初期の段階で精子が直接異物を認識している可能性が考えられた。そこで、ヒト精液中の細菌種の同定と内毒素であるペプチドグリカン、LPS 濃度の測定を行った。その結果、ヒト精液中にはグラム陽性菌とペプチドグリカン、LPS が高濃度で存在した。さらに、ヒト精子においてこれらの内毒素を認識する TLR2 および TLR4 の局在が認められ、内毒素を添加すると、精子運動性の低下と TUNEL 陽性率の上昇が認められた。以上の結果から、精子に存在する TLR2 および TLR4 が内毒素を認識することで、精子 DNA の断片化を誘起すること、精子運動性が低下することが明らかとなった。

TLR2 および TLR4 遺伝子欠損マウスを用いた精子に発現する TLRs の機能解析

第二章において、精液中のペプチドグリカンや LPS は、ヒト精子に発現する TLR2 および TLR4 を介して、精子の機能性に負の影響を及ぼした。しかし、ヒト精子では、射

出直後にはすでに精漿に曝され、内毒素の影響を受けている可能性があることから、精漿に曝されていない精巣上体精子でさらに遺伝子欠損個体を使用可能なマウスをモデルとし、TLR2 および TLR4 の詳細な作用機序の検討が必要であると考えた。まず、マウス精子における TLR2 および TLR4 の発現を検出した結果、ヒト精子と同様に先体部に両者とも局在していた。次に、ペプチドグリカンあるいは LPS 添加培地でマウス精巣上体精子を培養した結果、精子運動性の低下と TUNEL 陽性率の上昇が認められた。また、体外受精の受精率においても、内毒素を添加すると受精率は低下した。一方、TLR2 および TLR4 の遺伝子欠損マウスにおいては、LPS やペプチドグリカンの精子に対する負の作用は特異的に消失していた。さらに、人工授精においても、細菌と前培養した精子を用いた時、受精率は低下し、これは内毒素の中和剤であるポリミキシン B により完全に抑制された。以上の結果から、精子に存在する TLR2 および TLR4 はそれぞれの内毒素を特異的に認識し、精子への負の影響は体内および体外での精子受精能を低下させることが明らかとなった。

ヒト精液中の細菌感染と内毒素の ART への影響と、内毒素の影響を抑制する精液処理法の開発

これまでの検討により、精子の TLR2 および TLR4 は精液中の内毒素を特異的に認識し、精子運動性の低下や TUNEL 陽性率を上昇させることによって、受精能に直接的に影響を与えることが明らかとなった。そこで本章では、ヒト高度生殖医療(ART)の成績と精液中の細菌感染の有無とペプチドグリカン濃度との関係について後方視的に検討した。その結果、細菌感染陽性症例、ペプチドグリカン高濃度症例において、受精率や胚発生率に影響はなかったが、臨床的妊娠率の低下、流産率の上昇が認められた。これらの検討症例では、精液の処理が swim-up 法のみであり、精子が精液処理の過程で内毒素濃度の上昇により負の影響を受けると考えられたことから、精液中の内毒素濃度の上昇を抑制する精液処理法の検討を行った。実際に swim-up 過程で処理液中のペプチドグリカン濃度は上昇していた。そこで、射出精液を抗生物質入りの培養液に懸濁する前に速やかに Isolate 処理を行うことによって、内毒素の上昇を抑制し、その処理法を行った ART では臨床的妊娠率が高くなることを示した。以上の結果から、精液中の内毒素による精子への負の影響は ART の予後にも悪影響を及ぼすため、ART の精液処理には細菌や内毒素を速やかに除去する Isolate 法を用いることが有効であることが示された。

本研究により、

- 1, 精子に存在する TLR2 および TLR4 は精液中の内毒素を特異的に認識し、精子機能性に負の影響を与える
- 2, 精子に存在する TLR2 および TLR4 が内毒素を認識することにより、精子受精能

が低下し、その後の胚の生存性に影響を与える

3, 精子への内毒素の影響を抑制するためには、射出後速やかに除去することが必要であり、その方法は Isolate 法が有効である

ことが明らかとなった。これは、マウスを用いた基礎研究結果からヒトの臨床で用いることができる最適な精液処理法を開発したものである。ヒト以外の大型家畜においても精液中に細菌が検出されることから、ウシやブタといった精液処理から人工授精が行われている家畜にも本法を応用することができると期待される。そのためには、精液中の細菌種を同定することと、精液の性状によって、中和剤の添加とともに最適な処理法を選択する必要があると考えられる。本研究の成果は、精子に存在する免疫様機能を生理的に解明し、その基礎的知見を基にした新しい技術の開発であり、ヒト ART 成功率の上昇に寄与するものである。この技術を広く大型家畜などに応用することにより、その生産性向上が期待できると考えられる。また、本研究の基礎的知見は、家畜やヒトの生殖工学技術の発展にも貢献するものと思われる。

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科学研究科 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 教授 前田照夫 博士に深く感謝申し上げます。

また、本研究を取りまとめるにあたりご協力して頂いた生物圏科学研究科 教授 古澤 修一 博士，教授 田辺 創一 博士，准教授 西堀 正英 博士には，御礼申し上げます。

さらに，本研究にあたり，KOマウスに関して共同研究を行い，多大なるご指導とご助言を頂きましたBaylor Colledge 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である大分県農林水産研究センター 研究員 岡崎 哲司 博士，さらに家畜生殖学研究室の皆様には，本研究を行うにあたり，研究に対する討論や実験を共に行い，完結する上で多大な協力を頂きましたことを深く感謝申し上げます。

私が博士課程への社会人入学にあたり，賛同し，研究へ多大なる援助と協力を頂きました，医療法人レニア会 武谷 典子 副理事長に感謝の意を表します。

また，ウイメンズ・クリニック大泉学園 根岸 広明 院長ならびに堀川 道晴 医師には本研究について理解していただき，臨床の面からご指導頂きました。培養室の池田 千秋 女史，櫛野 鈴奈 女史，下中 麻奈美 女史，池田 玲奈 女史には，研究に関する検体収集の協力や，ミーティングの場での討議，さらには広島大学での研究や学会発表などで培養室を空ける際には，日頃多忙な業務がさらに多忙になるにも関わらず，快く協力していただきました。ここに深く感謝の意を表します。

最後に，社会人入学を快く賛同し，本研究の遂行，論文のとりまとめの際に暖かく応援し，精神的な支えとなってくれた家族に感謝致します。

引用文献

- Adams CE, Chang MC. Capacitation of rabbit spermatozoa in the Fallopian tube and in the uterus. *J. Exp. Zool.* 1962; 151: 159–165.
- Agarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 745–756.
- Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 1999; 284: 696-704.
- Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 1993; 35: 302-315.
- Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, Irvine S. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol. Reprod.* 1997; 47: 468-482.
- Akhter S, Ansari MS, Andrabi SM, Ullah N, Qayyum M. Effect of antibiotics in extender on bacterial and spermatozoal quality of cooled buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Reprod. Domest. Anim.* 2008; 43: 272-278.
- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutiérrez-Mateo C, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Wells D. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil. Steril.* 2011; 95: 520-524.
- Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett 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.
- 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.
- Altman SA, Zastawny TH, Randers-Eichhorn L, Cacciuttolo MA, Akman SA, Dizdaroglu M, Rao G. Formation of DNA-protein cross-links in cultured mammalian cells upon treatment with iron ions. *Free. Radic. Biol. Med.* 1995; 19: 897-902.
- Anderson DJ, Hill JA. Cell-mediated immunity in infertility. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 1988; 17: 22–30.
- Angelopoulos T, Moshel YA, Lu L, Macanas E, Grifo JA, Krey LC. Simultaneous assessment of sperm chromatin condensation and morphology before and after separation procedures: effect on the clinical outcome after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 1998; 69: 740-747.
- Appelmelk BJ, An YQ, Thijs BG, MacLaren DM, De Graaff J. Recombinant human

- bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI23) is a universal lipopolysaccharide-binding ligand. *Infect. Immun.* 1994; 62: 3564-3567.
- Austin CR. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res.* 1951; 4: 581–589.
- Bavister BD. How animal embryo research led to the first documented human IVF. *Reprod. Biomed.* 2002; 4: 24-29.
- Bianchi PG, Manicardi GC, Urner F, Campana A, Sakkas D. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 1996; 2: 139-144.
- 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.
- Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum. Reprod.* 2007; 22: 174-179.
- Carlson AE, Hille B, Babcock DF. External Ca²⁺ acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. *Dev. Biol.* 2007; 312: 183-192.
- Chang MC. Fertilising capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian tubes. *Nature.* 1951; 168: 697-698.
- Chang MC. Development of fertilising capacity of rabbit spermatozoa in the uterus. *Nature.* 1955; 175: 1036–1037.
- Chang MC. Fertilisation of rabbit ova in vitro. *Nature.* 1959; 179: 466–467.
- Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, Buck J. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science.* 2000; 289: 625-628.
- Chandley AC, Speed RM. A reassessment of Y chromosomal behaviour in germ cells and Sertoli cells of the mouse as revealed by in situ hybridisation. *Chromosoma.* 1995; 104: 282-286.
- Chun J, Prince A. Activation of Ca²⁺-dependent signaling by TLR2. *J. Immunol.* 2006; 177: 1330-1337.
- Cohen J, Debache C, Pez JP, Junca AM, Cohen-Bacrie P. Transvaginal sonographically controlled ovarian puncture for oocyte retrieval for in vitro fertilization. *J. In. Vitro. Fert. Embryo. Transf.* 1986; 3: 309-313.
- Colleu D, Lescoat D, Gouranton J. Nuclear maturity of human spermatozoa selected by swim-up or by Percoll gradient centrifugation procedures. *Fertil. Steril.* 1996; 65: 160-164.
- Cross NL. Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm. *Biol. Reprod.* 2004; 71: 1367-1373.

- Das SC, Isobe N, Yoshimura Y. Expression of Toll-like receptors and avian β -defensins and their changes in response to bacterial components in chicken sperm. *Poult. Sci.* 2011; 90: 417-425.
- Davis BK, Gergely AF. Studies on the mechanism of capacitation: changes in plasma membrane proteins of rat spermatozoa during incubation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1979; 88: 613-618.
- Delhanty JD, Griffin DK, Handyside AH, Harper J, Atkinson GH, Pieters MH, Winston RM. Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent in situ hybridisation,(FISH). *Hum. Mol. Genet.* 1993; 2: 1183-1185.
- Darveau RP, Hancock RE. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *J. Bacteriol.* 1983; 155: 831-838.
- Diemer T, Ludwig M, Huwe P, Hales DB, Weidner W. Influence of urogenital infection on sperm function. *Curr. Opin. Urol.* 2000; 10: 39-44.
- Diemer T, Huwe P, Michelmann HW, Mayer F, Schiefer HG, Weidner W. Escherichia coli-induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis. *Int. J. Androl.* 2000; 23: 178-186.
- Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature.* 1969; 221: 632-635.
- Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1980; 87: 737-756.
- Eggert-Kruse W, Buhlinger-Gopfarth N, Rohr G, Probst S, Aufenanger J, Naher H, Runnebaum B. Antibodies to chlamydia trachomatis in semen and relationship with parameters of male fertility. *Hum. Reprod.* 1996; 11: 1408-1417.
- 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, Lundberg WB, Schmidt PJ. Evaluation of bacterial contamination in blood processing. *Transfusion.* 1975; 15: 260-265.
- Eidhin DN, Mouton C. A rapid method for preparation of rough and smooth lipopolysaccharide from *Bacteroides*, *Porphyromonas* and *Prevotella*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 1993; 110: 133-138.
- Ermolaeva MA, Michallet MC, Papadopoulou N, Utermöhlen O, Kranidioti K, Kollias G, Tschoop J, Pasparakis M. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nat. Immunol.* 2008; 9: 1037-1046.

- Esposito G, Jaiswal BS, Xie F, Krajnc-Franken MA, Robben TJ, Strik AM, Kuil C, Philipsen RL, van Duin M, Conti M, Gossen JA. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2004; 101: 2993-2998.
- Fang ZF, Xu HT, Wu D, Zhuo Y, Lin Y, Luo XL. Vitamin a supplements alleviate inflammatory responses in reproductive tracts of male mice infected with pseudorabies virus. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2010; 80: 117-130.
- Flesch FM, Brouwers JF, Nievelstein PF, Verkleij AJ, van Golde LM, Colenbrander B, Gadella BM. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J. Cell. Sci.* 2001; 114: 3543-3555.
- Fournier B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18: 521-540.
- Fragouli E, Wells D, Thornhill A, Serhal P, Faed MJ, Harper JC, Delhanty JD. Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. *Hum. Reprod.* 2006; 21: 2319-2328.
- Gavella M, Garaj-Vrhovac V, Lipovac V, Antica M, Gajski G, Car N. Ganglioside GT1b protects human spermatozoa from hydrogen peroxide-induced DNA and membrane damage. *Int. J. Androl.* 2010; 33: 536-544.
- Garrett LJ, Revell SG, Leese HJ. Adenosine triphosphate production by bovine spermatozoa and its relationship to semen fertilizing ability. *J. Androl.* 2008; 29: 449-458.
- Ginsburg I. The role of bacteriolysis in the pathophysiology of inflammation, infection and post-infectious sequelae. *APMIS.* 2002; 110: 753-770.
- Go KJ, Wolf DP. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol. Reprod.* 1985; 32: 145-153.
- Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Int. J. Androl.* 1998; 21: 81-94.
- Golan R, Shochat L, Weissenberg R, Soffer Y, Marcus Z, Oschry Y, Lewin LM. Evaluation of chromatin condensation in human spermatozoa: a flow cytometric assay using acridine orange staining. *Mol. Hum. Reprod.* 1997; 3: 47-54.
- Gonzales GF, Kortebani G, Mazzolli AB. Hyperviscosity and hypofunction of the seminal vesicles. *Arch. Androl.* 1993; 30: 63-68.
- Gonzalez DD, Mozgovoij MV, Bellido D, Rodriguez DV, Fernandez FM, Wigdorovitz A, Parreño VG, Dus Santos MJ. Evaluation of a bovine rotavirus VP6 vaccine efficacy in the calf model of infection and disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010; 137: 155-160.

- Gordon JW, Grunfeld L, Garrisi GJ, Talansky BE, Richards C, Laufer N. Fertilization of human oocytes by sperm from infertile males after zona pellucida drilling. *Fertil. Steril.* 1988; 50: 68-73.
- Goto K, Kinoshita A, Takuma Y, Ogawa K. Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. *Vet. Rec.* 1990; 127: 517-520.
- Guttenbach M, Engel W, Schmid M. Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations. *Hum. Genet.* 1997; 100: 1-21.
- 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.
- Harrouk W, Codrington A, Vinson R, Robaire B, Hales BF. Paternal exposure to cyclophosphamide induces DNA damage and alters the expression of DNA repair genes in the rat preimplantation embryo. *Mutat. Res.* 2000; 461: 229-241.
- Hereng TH, Elgstøen KB, Cederkvist FH, Eide L, Jahnsen T, Skålhegg BS, Rosendal KR. Exogenous pyruvate accelerates glycolysis and promotes capacitation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 2011; 26: 3249-3263.
- Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003; 1: 108.
- 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.
- Hosoi Y, Iritani A. Rabbit microfertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 1993; 36: 282-284.
- Inoue N, Satouh Y, Ikawa M, Okabe M, Yanagimachi R. Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2011; 108: 2008-2011.
- Iritani A, Niwa K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.* 1977; 50: 119-121.
- Iritani A, Niwa K, Imai H. Sperm penetration in vitro of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.* 1978; 54: 379-383.
- Ito K, McGhee JD, Schultz GA. Paternal DNA strands segregate to both trophectoderm and inner cell mass of the developing mouse embryo. *Genes. Dev.* 1988; 2: 929-936.
- Iwamatsu T, Chang MC. Factors involved in the fertilization of mouse eggs in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 1971; 26: 197-208.
- Iwarsson E, Lundqvist M, Inzunza J, Ahrlund-Richter L, Sjöblom P, Lundkvist O, Simberg N, Nordenskjöld M, Blennow E. A high degree of aneuploidy in frozen-thawed human preimplantation embryos. *Hum. Genet.* 1999; 104: 376-382.

- Jiang Y, Chen G, Zheng Y, Lu L, Wu C, Zhang Y, Liu Q, Cao X. TLR4 signaling induces functional nerve growth factor receptor p75NTR on mouse dendritic cells via p38MAPK and NF-kappa B pathways. *Mol. Immunol.* 2008; 45: 1557-1566.
- Kawai T, Akira S. TLR signaling. *C. Differ.* 2006; 13: 816-825.
- Kamiguchi Y, Rosenbusch B, Sterzik K, Mikamo K. Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation-air drying method. *Hum. Genet.* 1993; 90: 533-541.
- Kengatharan KM, De Kimpe S, Robson C, Foster SJ, Thiemermann C. Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J. Exp. Med.* 1998; 188: 305-315.
- Kimura Y, Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.* 1995; 52: 709-720.
- Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature.* 2006; 439: 737-740.
- Kondoh G, Tojo H, Nakatani Y, Komazawa N, Murata C, Yamagata K, Maeda Y, Kinoshita T, Okabe M, Taguchi R, Takeda J. Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. *Nat. Med.* 2005; 11: 160-166.
- Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology.* 2007; 67: 73-80.
- Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, Slusser J, Hodgen GD, Rosenwaks Z. A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil. Steril.* 1988; 49: 835-842.
- Larson KL, Brannian JD, Timm BK, Jost LK, Evenson DP. Density gradient centrifugation and glass wool filtration of semen remove spermatozoa with damaged chromatin structure. *Hum. Reprod.* 1999; 14: 2015-2019.
- Lefrancier P, Bricas E. Synthesis of the peptidic subunit of cell wall peptidoglycan of 3 gram positive bacteria and of peptides of analogous structure *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1967; 49: 1257-1271.
- Lopata A, Brown JB, Leeton JF, Talbot JM, Wood C. In vitro fertilization of preovulatory oocytes and embryo transfer in infertile patients treated with clomiphene and human chorionic gonadotropin. *Fertil. Steril.* 1978; 30: 27-35.
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 896-900.
- Luong M, Zhang Y, Chamberlain T, Zhou T, Wright JF, Dower K, Hall JP. Stimulation of TLR4 by recombinant HSP70 requires structural integrity of the HSP70 protein itself. *J.*

- Inflamm. 2012; 9: 11.
- Mahadevan MM, Trounson AO. The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 1984; 42: 400-405.
- 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.
- Marquez B, Suarez SS. Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca²⁺ influx. *Biol. Reprod.* 2007; 76: 660-665.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997; 388: 394-397.
- Mihara T, Fukumoto K, Okazaki T, Simada M. Murine sperm expresses toll-like receptor (TLR) family that responds to the pathogens released from virus and decreases fertilization ability by the stimuli. *Mamm. Ova. Res.* 2010; 27: 136-143.
- 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.
- Miyamoto E, Petzold GL, Harris JS, Greengard P. Dissociation and concomitant activation of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase by histone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1971; 44: 305-312.
- Miyamoto H, Chang MC. In vitro fertilization of rat eggs. *Nature.* 1973; 241: 50-52.
- Miyamoto H, Chang MC. Fertilization of rat eggs in vitro. *Biol. Reprod.* 1973; 9: 384-393.
- Morrell JM, Moffatt O, Sakkas D, Manicardi GC, Bizzaro D, Tomlinson M, Nilsson H, Holmes PV. Reduced senescence and retained nuclear DNA integrity in human spermatozoa prepared by density gradient centrifugation. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2004; 21: 217-222.
- 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.
- Muller MR, Pfannes SD, Ayoub M, Hoffmann P, Bessler WG, Mittenbühler K. Immunostimulation by the synthetic lipopeptide P3CSK4: TLR4-independent activation of the ERK1/2 signal transduction pathway in macrophages. *Immunology.* 2001; 103: 49-60.
- Mori Y, Yoshimura A, Ukai T, Lien E, Espevik T, Hara Y. Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. *Oral. Microbiol. Immunol.* 2003; 18: 54-58.
- Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998; 95: 14681-14686.

- Ness RB, Markovic N, Carlson CL, Coughlin MT. Do men become infertile after having sexually transmitted urethritis? An epidemiologic examination. *Fertil. Steril.* 1997; 68: 205-213.
- Ng SC, Bongso A, Chang SI, Sathananthan H, Ratnam S. Transfer of human sperm into the perivitelline space of human oocytes after zona-drilling or zona-puncture. *Fertil. Steril.* 1989; 52: 73-78.
- Ochsendorf FR. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum. Reprod.* 1999; 5: 399-420.
- Ochsendorf FR. Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia.* 2008; 40: 72-75.
- Odet F, Duan C, Willis WD, Goulding EH, Kung A, Eddy EM, Goldberg E. Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (*Ldhc*) is required for male fertility. *Biol. Reprod.* 2008; 79: 26-34.
- Oehninger S, Kruger TF, Simon T, Jones D, Mayer J, Lanzendorf S, Toner JP, Muasher SJ. A comparative analysis of embryo implantation potential in patients with severe teratozoospermia undergoing in-vitro fertilization with a high insemination concentration or intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 1996; 11: 1086-1089.
- Okazaki T, Abe S, Yoshida S, Shimada M. Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology.* 2009; 71: 491-498.
- Okazaki T, Mihara T, Fujita Y, Yoshida S, Teshima H, Shimada M. Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar sperm during liquid storage and cryopreservation. *Theriogenology.* 2010; 74: 1691-1700.
- Olinski R, Nackerdien Z, Dizdaroglu M. DNA-protein cross-linking between thymine and tyrosine in chromatin of gamma-irradiated or H₂O₂-treated cultured human cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992; 297: 139-143.
- Ozoe A, Isobe N, Yoshimura Y. Expression of Toll-like receptors (TLRs) and TLR4 response to lipopolysaccharide in hen oviduct. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009; 127: 259-268.
- Palladino MA, Savarese MA, Chapman JL, Dughi MK, Plaska D. Localization of Toll-like receptors on epididymal epithelial cells and spermatozoa. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008; 60: 541-555.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992; 340: 17-18.
- Palermo GD, Munné S, Colombero LT, Cohen J, Rosenwaks Z. Genetics of abnormal human fertilization. *Hum. Reprod.* 1995; 10: 120-127.
- Pasqualotto FF, Pasqualotto EB. Reactive oxygen species and oocyte fertilization. *Hum. Reprod.*

- 2007; 22: 901-902.
- 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.
- Purvis K, Christiansen E. Infection in the male reproductive tract. Impact, diagnosis and treatment in relation to male infertility. *Int. J. Androl.* 1993; 16: 1-13.
- Politch JA, Xu C, Tucker L, Anderson DJ. Separation of human immunodeficiency virus type 1 from motile sperm by the double tube gradient method versus other methods. *Fertil. Steril.* 2004; 81: 440-447.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998; 282: 2085-2088.
- Porter RN, Smith W, Craft IL, Abdulwahid NA, Jacobs HS. Induction of ovulation for in-vitro fertilisation using buserelin and gonadotropins. *Lancet.* 1984; 2: 1284-1285.
- Rives N, Saint Clair A, Mazurier S, Sibert L, Siméon N, Joly G, Macé B. Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Hum. Genet.* 1999; 105: 266-272.
- Rosado A, Hicks JJ, Reyes A, Blanco I. Capacitation in vitro of rabbit spermatozoa with cyclic adenosine monophosphate and human follicular fluid. *Fertil. Steril.* 1974; 25: 821-824.
- Sakkas D, Tomlinson M. Assessment of sperm competence. *Semin. Reprod. Med.* 2000; 18: 133-139.
- Seitz HM Jr, Brackett BG, Mastroianni L Jr. In vitro fertilization of ovulated rabbit ova recovered from the ovary. *Biol. Reprod.* 1970; 2: 262-267.
- Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 2004; 82: 378-383.
- Shadan S, James PS, Howes EA, Jones R. Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biol. Reprod.* 2004; 71: 253-265.
- Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free. Radic. Biol. Med.* 2000; 28: 529-536.
- 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; 35: 2001-2011.
- Si Y, Okuno M. Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. *Biol. Reprod.* 1999; 61: 240-246.
- Son YO, Jang YS, Heo JS, Chung WT, Choi KC, Lee JC. Apoptosis-inducing factor plays a critical role in caspase-independent, pyknotic cell death in hydrogen peroxide-exposed cells. *Apoptosis*. 2009; 14: 796-808.
- Suarez SS, Dai X. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol. Reprod.* 1992; 46: 686-691.
- Suarez SS, Varosi SM, Dai X. Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1993; 90: 4660-4664.
- Surani MA, Barton SC, Norris ML. Nuclear transplantation in the mouse: heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome. *Cell*. 1986; 45: 127-136.
- Suzuki F, Yanagimachi R. Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-reactive membrane sterols during in vitro capacitation of golden hamster spermatozoa. *Gamete. Res.* 1989; 23: 335-347.
- Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 2004; 16: 3-9.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 2005; 17: 1-14.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 1999; 11: 443-451.
- Tamba S, Yodoi R, Segi-Nishida E, Ichikawa A, Narumiya S, Sugimoto Y. Timely interaction between prostaglandin and chemokine signaling is a prerequisite for successful fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105: 14539-14544.
- Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum. Reprod.* 2001; 16: 2160-2165.
- Toyoda Y, Chang MC. Capacitation of epididymal spermatozoa in a medium with high K-Na ratio and cyclic AMP for the fertilization of rat eggs in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 1974; 36: 125-134.
- Trum JW, Mol BW, Pannekoek Y, Spanjaard L, Wertheim P, Bleker OP, van der Veen F. Value of detecting leukocytospermia in the diagnosis of genital tract infection in subfertile men. *Fertil. Steril.* 1998; 70: 315-319.
- Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 76: 514-519.

- Uehara T, Yanagimachi R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol. Reprod.* 1976; 15: 467-470.
- Visconti PE, Ning X, Fornés MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA, Kopf GS. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev. Biol.* 1999; 214: 429-443.
- Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R, McBain J. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil. Steril.* 2003; 80: 860-868.
- 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, Ghosh M, Patel MV, Hickey DK, Ochiel DO. Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63: 544-565.
- Witkowska A. Parthenogenetic development of mouse embryos in vivo. I. Preimplantation development. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1973; 30: 519-545.
- World Health Organization. Laboratory manual of the WHO for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction *Ann Ist Super. Sanita.* 2001; 37: 1-123.
- Walter CA, Intano GW, McMahan CA, Kelner K, McCarrey JR, Walter RB. Mutation spectral changes in spermatogenic cells obtained from old mice. *DNA Repair.* 2004; 3: 495-504.
- Xie F, Garcia MA, Carlson AE, Schuh SM, Babcock DF, Jaiswal BS, Gossen JA, Esposito G, van Duin M, Conti M. Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Dev. Biol.* 2006; 296: 353-362.
- Yanagimachi R. In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.* 1969; 18: 275-286.
- Yanagimachi R. In vitro capacitation of golden hamster spermatozoa by homologous and heterologous blood sera. *Biol. Reprod.* 1970; 3: 147-153.
- Yanagimachi R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote.* 1994; 2: 371-372.
- Zalata AA, Christophe AB, Depuydt CE, Schoonjans F, Comhaire FH. White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 1998; 21: 154-162.
- Zhang Z, Zhang ZY, Wu Y, Schluesener HJ. Immunolocalization of Toll-like receptors 2 and 4 as well as their endogenous ligand, heat shock protein 70, in rat traumatic brain injury.

Neuroimmunomodulation. 2012; 19: 10-19.