

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23658245

研究課題名（和文） ポジトロン断層法を駆使した牛不受胎性素因の解明

研究課題名（英文） Analysis of infertility in cattle using positron emission tomography

研究代表者

佐々田 比呂志 (SASADA HIROSHI)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：90158931

研究成果の概要（和文）：牛では現在、人工授精により産子を作成しているが、近年、受胎成績が低下していることから、その素因を解明するために、精子側の要因を解析した。人工授精後精子は受精場である卵管膨大部まで到達しなければならず、その過程を理解するために精子の移動を追跡する可能性および受精場で起こると考えられる要因を解析した結果、精子走化性が牛でも役割を果たしている可能性が本研究で初めて明らかにされ、今後、牛における低受胎性素因として精子走化性を考慮する重要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Artificial insemination (AI) has been carried out in cattle production, but it is announced that the fertility rate after AI has been decreasing in the latest decade. To understand a fundamental factor on low fertility, the present study aimed to demonstrate sperm movement and mechanism for its movement. As a result, this study showed that sperm chemotaxis may have a role for sperm movement to a site of fertilization with ovulated eggs, suggesting that an ability for sperm chemotaxis should be considered when sperm quality be assessed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：生理、精子、受胎能、精子走化性、人工授精、ウシ

1. 研究開始当初の背景

牛では現在、人工授精により産子を作成しているが、近年、受胎成績が低下していることが問題となっている。人工授精用の精液は凍結され保存されているが、これまでの精液性状検査では精子活力、濃度及び奇形率などには大きな変動は認められておらず、新たな精子生理学の理解をする必要があると考えられる。

2. 研究の目的

人工受精後の低受胎性の素因を解明するために、精子側の要因を解析した。人工授精後精子は受精場である卵管膨大部まで到達しなければならず、その過程を理解するため

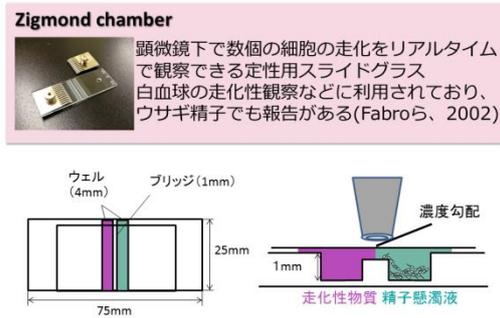
に精子の移動を追跡する可能性および受精場で起こると考えられる要因を解析した。

3. 研究の方法

精子が雌ウシに注入された後、精子の移動を追跡する方法として、精子の代謝機能から解糖系経路を考慮し、ポジトロン断層法を利用することにより精子に蓄積するグルコース代謝の量を把握することで可能と発想したが、本学にある装置では小動物対象としておりウシでの使用が許可されないことから、最終的に排卵卵子と受精するまでに影響する素因として精子走化性について解析することにより、新たな精子生理学的知見を明らかにすることとした。その方法として、

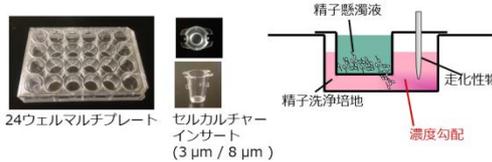
(1) Zigmond chamber 法によるケモタック率を算出することにより、精子走化性因子の解析を行った(図 1)。

図1.Zigmond chamber 法による精子走化性の解析



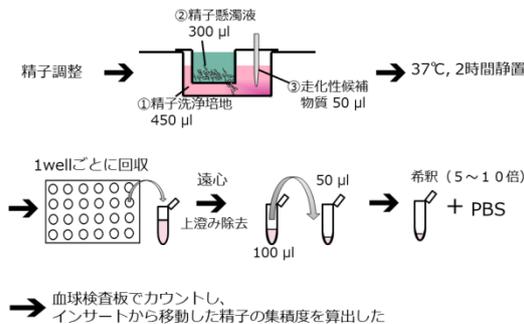
(2) さらに、集積度による精子走化性解析をTwo chamber 法で行った(図 3-1 および 3-2)。

図3-1. Two chamber 法による精子走化性の解析



- ・インサート底部には孔径 3 あるいは 8 µm の孔がランダムに開いており、そこを通過した精子がウェルへと移動できる
- ・一定時間経過後、ウェル内に集積した精子数を計数することで、走化性を評価する

図3-2. Two chamber 法による精子走化性の解析



(3) また、精子代謝に関する解糖系酵素として乳酸脱水素酵素(LDH)および TCA 回路酵素としてマレイン酸脱水素酵素(MDH)を酵素組織学的に解析した。同時に、走化性物質との関係を調べた。

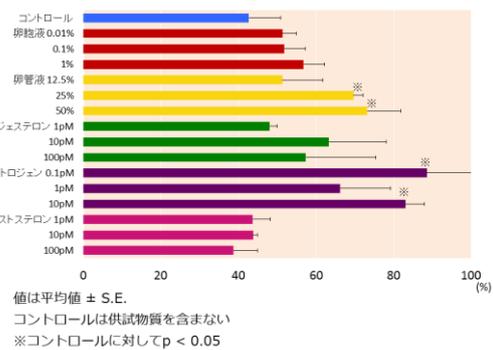
(4) 最後に、精しょう中のタンパク質である。BSP の濃度変化と精液性状との関係を季節的に解析した。

4. 研究成果

(1) Zigmond chamber 法によりケモタック率を卵胞液、卵管液として卵管培養上清液および 3 種のステロイドホルモン、プロジェステロン、エストロジェンとテストステロンを精子走化性候補物質とて、解析した。

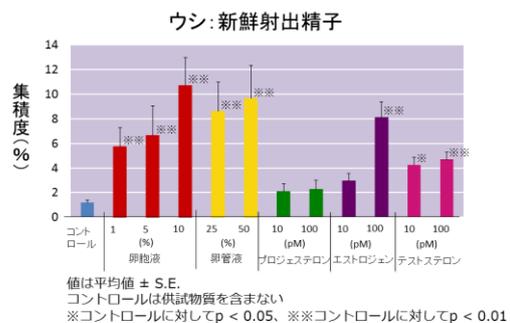
その結果、ウシ凍結精液では卵胞液および卵管培養上清液でコントロールより高いケモタック率が示され、卵管培養上清液で有差がみられた。性ステロイドホルモンでは、プロジェステロンで高い傾向、あるいはエストロジェンで有意に高かった。テストステロンではコントロールと差がみられなかった(図 2)。

図2.ウシ精子におけるChemotactic 率



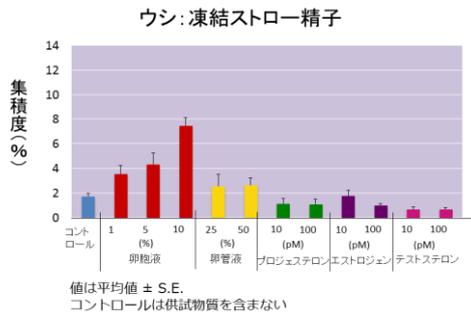
(2) Two chamber 法で精子集積度を評価することで、精子走化性を解析した結果、ウシ新鮮射出精液では卵胞液、卵管培養上清液、エストロジェンおよびテストステロンでコントロールより有意に高かった(図 4)。

図4.走化性候補物質に対する精子の集積度



しかしながら、人工授精用の凍結精液を供試した結果は新鮮射出精液と異なった。すなわち、コントロールより集積度が有意に高い物質は認められず、卵胞液で高い傾向であった(図 5)。

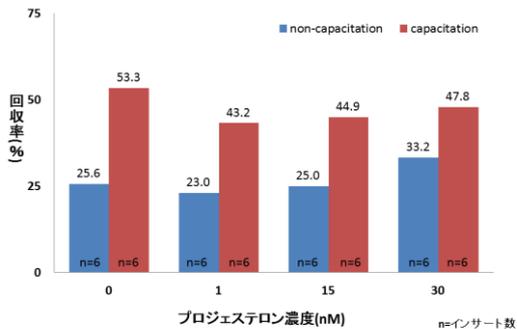
図5. 走化性候補物質に対する精子の集積度



次に、精子は排卵卵子と受精する前に次あらかじめ受精能獲得をしなければならないことが知られていることから、体内での受精現象を理解する条件を設定し、受精能獲得処理を行い、精子走化性を解析した。走化性物質として、排卵卵子とそれを囲む卵丘細胞に高濃度のプロゲステロンが存在し、走化性を示すことがヒトなどで報告されていることから、高濃度及び低濃度のプロゲステロンを供試した。

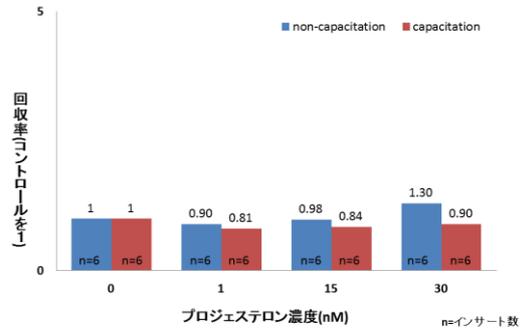
その結果、受精能獲得処理をした精子において、プロゲステロンに対する精子集積度が高いことがわかった(図 6-1)。

図6-1. 受精能獲得処理が精子集積度に及ぼす影響



しかしながら、コントロールを1として比較したところ、受精能獲得処理が精子集積度の及ぼす影響はほとんどないことが示された(図 6-2)。

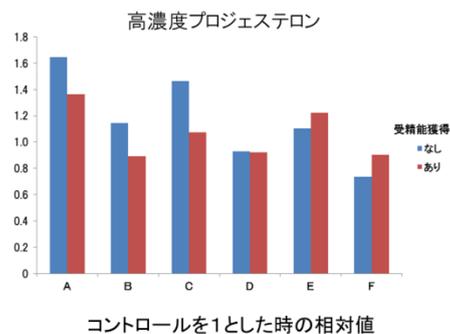
図6-2. 精子集積度へ及ぼすプロゲステロンの影響



続いて、人工授精用に配布されている精液の提供を受け、種雄牛間で精子走化性がどのように異なるかを、Two chamber 法で精子集積度を解析した。

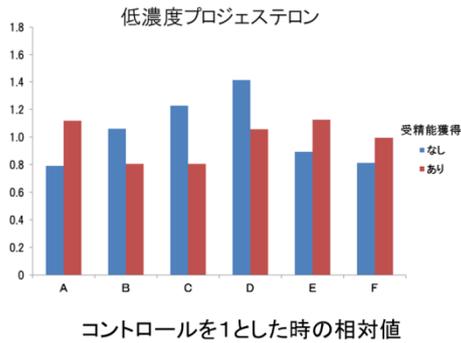
その結果、種雄牛間で精子集積度が異なることが示された(図 7-1 および 7-2)。

図7-1. 種雄牛間の精子集積率の比較



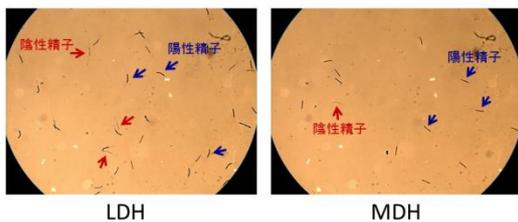
この場合、高濃度のプロゲステロンに対する精子集積度が低濃度に対する結果と異なったことから、最終的に排卵卵子に受精する際に精子によって卵子に向かって移動する能力に差があることが示唆された。

図7-2.種雄牛間の精子集積率の比較



(3)精子代謝に関係する解糖系および TCA 回路に関与する代謝酵素として、LDH および MDH を酵素組織化学的に解析した結果、いずれも精子中片部に局在していることがわかった (図 8)。

図8.ウシ精子LDHおよびMDHの酵素組織化学による検出



次に、LDH および MDH に及ぼす走化性物質の影響を解析した結果、卵胞液、卵管培養上清液、プロゲステロンおよびエストロゲン間で LDH および MDH 酵素陽性率に差は認められなかった (図 9-1 および 9-2)。

図9-1.LDH陽性率に及ぼす走化性候補物質の影響

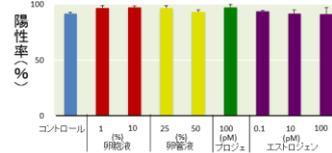
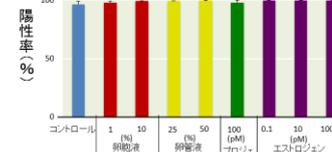


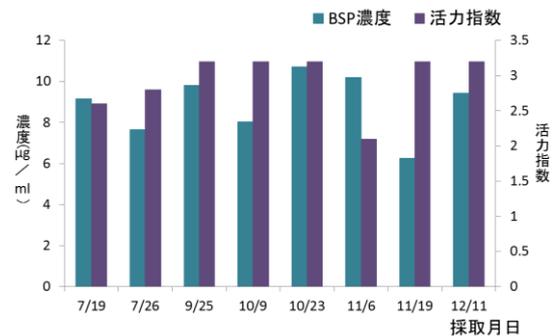
図9-2.MDH陽性率に及ぼす走化性候補物質の影響



値は平均値 ± S.E., コントロールは供試物質を含まない

(4) 精液中に含まれる精しょうタンパク質 BSP 濃度を時間分解蛍光免疫測定法で測定した結果、高濃度の BSP が精しょう中に存在することがわかった。さらに、季節的変動を調べたこと、少なくとも夏から冬にかけてはほとんど変動がないことが示され、精液性状との関係では精子活力との相関を解析した結果、一定の傾向は認められなかった (図 10)。

図10.ウシBSP濃度と精子活力の関係



以上、人工授精後精子は受精場である卵管膨大部まで到達しなければならず、その過程を理解するために精子の移動を追跡する可能性および受精場で起こると考えられる要因を解析した結果、精子走化性が牛でも役割を果たしている可能性が本研究で初めて明らかにされ、今後、牛における低受胎性素因として精子走化性を考慮する重要性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々田 比呂志

(SASADA HIROSHI)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：90158931