

平成23年3月31日現在

機関番号：15301  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20380154  
 研究課題名（和文） 哺乳動物の新たな人工授精システム構築に向けた雌性生殖道内の免疫制御技術の開発  
 研究課題名（英文） Immunological regulation of the female reproductive tract to establish an efficient new artificial insemination system in mammals  
 研究代表者  
 舟橋 弘晃（FUNAHASHI HIROAKI）  
 岡山大学・大学院自然科学研究科・教授  
 研究者番号：50284089

## 研究成果の概要（和文）：

哺乳動物の雌子宮内に交配後に子が入ると、免疫機構が働き、精子を除去する仕組みが存在する。本研究では、この機構が多核白血球という免疫細胞によって行われ、それによる精子の貪食は、血清の存在下で活発に行われるが、運動精子と死滅精子の両方を同様に貪食することを明らかにした。さらに、カフェインやヘパリン、精漿などの存在下で、牛および豚多核白血球の同種精子への走化性と貪食能を抑制することを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

In the female reproductive tracts, immunological system exists to remove sperm from the tract rapidly after mating or artificial insemination. In the present study, we could make clear that both phagocytotic and chemotactic activities of bovine and porcine polymorphonuclear leukocytes (PMNs), which mainly perform in the system, are stimulated in the presence of fresh serum and decreased in the presence of caffeine, heparin, and seminal plasma. Furthermore, PMNs phagocytize equally both active motile and dead sperm.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	7,200,000	2,160,000	9,360,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 応用動物科学

キーワード：多核白血球、精子、ウシ、ブタ、カフェイン、精漿、卵黄、人工授精

## 1. 研究開始当初の背景

家畜種における人工授精技術の開発の歴史は古い。我が国では、ほぼ100%の乳用牛

および肉用牛の繁殖に凍結精液による人工授精技術が適用されている。この技術により、牛の遺伝能力は飛躍的に向上したが、一方で、

我が国の初回人工授精による乳牛受胎率が50%を下回る事態となっている。また、世界的に需要が伸びている豚では、液状保存精液を用いた人工授精技術が欧米で広く普及しているが、商用利用に堪える凍結精液による人工授精技術は、種雄豚間の耐凍能の差や産子数で改善の余地を残す。一方、我が国では、液状保存精子を用いた人工授精が大規模農場を中心に補助的な繁殖手段として利用されているに過ぎず、雄豚の飼養が大きな経営圧迫要因となる小規模養豚経営において、衛生管理が容易な人工授精技術を普及させることが急務である。

最近ヨーロッパ諸国で、豚の子宮体部や子宮角に授精可能な人工授精器が開発され、比較的少量の豚精液でも高い受胎率が得られるようになり、精子利用効率が飛躍的に向上した。それにともなって、世界的に豚人工授精技術の利用率が急速に高まっており、ベルギー・ノルウェー・スペインでは80%を超えている。一方、1980年代以降、人工授精技術の開発から受精卵移植技術、さらには胚操作技術へと、受精卵関係の研究に研究費を重点的に投入した我が国では、精子の液状・凍結保存を含む人工授精に関する研究が現在極めて手薄となっている。上述のごとく、技術自体の顕著な改良は海外での技術革新に依存しているのが現状で、豚における人工授精技術の利用率は2006年度で32.8%に留まっている。現場の精液検査も、精液の肉眼的検査と精子の運動性などの顕微鏡的検査だけに頼っているのが現状である。人工授精が実用化されている牛で実際に人工授精による受胎率が低下していることを考えると、我が国の効率的な家畜生産のために、人工授精技術における早急なブレイクスルーが必要である。

上述のとおり、人工授精技術は、精子の保存法や評価法、さらには新たな人工授精器の開発などの方面から改良が加えられてきた。しかし、牛での受胎率の低下や豚での低い精

子利用効率と普及率の低さの原因を鑑みると、人工授精によって注入された精子を如何に効率よく排卵後まで正常な機能を持ったまま生存させ、卵管膨大部で卵母細胞に侵入させるかという観点からの改良が必要である。すなわち、精子の受精能に影響しない形で、雌性生殖道の精子除去機能を人為制御する手法の開発が不可欠であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、哺乳動物の人工授精前後における雌性生殖道内での免疫システムによる精子除去機構とその制御手法を明らかにし、得られた知見を用いて家畜種の人工授精技術の飛躍的な革新を目指す。特に本プロジェクトでは、実験動物（ラット）を用いた体内実験系だけでなく、豚・牛から採取した多核白血球を利用した体外実験系を用いて、豚および牛精子への多核白血球の結合・貪能に影響を及ぼすとともに、精子の受精能や生存能に影響を及ぼさない物質の検索を実施する。

## 3. 研究の方法

ブタおよびウシの末梢血から採取・分離したPMNsを用いて、種々の体外培養条件下で同一濃度の精子とPMNsを60分間共培養し、どれだけのPMNsが精子を貪食したかを形態学的に調べることでPMNsの貪食能を調べた。

また、Chemotactic Chamberを用いて、8 $\mu$ mの孔の空いたポリカーボネート製の膜を介して下段に精子を上段にPMNsを配置し、90分間同様に培養し、膜の孔を通り抜けているPMNsの数を数えることでPMNsの走化性を評価した。

さらに、子宮内の免疫細胞の種類やその数の変化を調べるために、種々の発情周期や交配後の雌ラットの子宮を灌流して、その回収液中の免疫細胞を細胞学的に観察した。

## 4. 研究成果

ラットの研究で、子宮内に存在する免疫細胞の約90%が多核白血球であり、発情周期によって子宮内の多核白血球数が変動し、発

情前期に最も多く存在することを見出した。交配によって子宮中の多核白血球数は急増し、極めて短時間に子宮内精子数の減少とともに子宮中の多核白血球数が減少することを明らかにした。

一方、牛および豚の血液由来多核白血球を用いて、体外での同種精子貪食能と精子への走化性について検討を行った結果、牛および豚多核白血球は血清の存在下でのみ精子への高い走化性と貪食能を発揮することが明らかになった。また、その貪食能は、活発な運動精子に対しても死滅した精子に対しても同様で差がなかったことから、子宮中では死滅精子のみを貪食しているのではなく、運動精子も死滅精子も同様に貪食していることが示唆された。さらに、カフェインまたはヘパリンの添加は、それらの濃度依存的に牛および豚多核白血球の同種精子への走化性と貪食能を有意に低下させることを明らかにした。

ラットをウシやブタのモデルとして凍結精液希釈液を用いて人工授精した後の子宮腔への多核白血球の出現および貪食能を調べたところ、卵黄を希釈液に添加した場合に有意な多核白血球の出現刺激が認められ、子宮内の多核白血球数は有意に増加した。

そこで、卵黄がウシおよびブタの多核白血球の走化性および貪食能に及ぼす影響について解析したところ、ウシおよびブタの多核白血球の走化性がともに有意に刺激されたものの、貪食能に関しては種差が存在することが明らかになった。

また、細胞内 cAMP の上昇および PKC の刺激がウシ及びブタ多核白血球の走化性及び貪食能に及ぼす影響について調べるために、dibutyryl cAMP および PMA を添加してその後の多核白血球の走化性及び貪食能を体外で評価した。その結果、dibutyryl cAMP の添加

は、多核白血球の走化性及び貪食能をともに低下させ、代わりに PMA 添加による PKC の刺激は、多核白血球の走化性及び貪食能をともに促進した。この結果から、多核白血球の走化性及び貪食能の調節が十分可能であることが示唆された。

ブタ精漿がブタおよびウシ多核白血球による同種精子への走化性におよぼす影響について調べたところ、ブタ精漿を 5% 以上添加することでその走化性は有意に低下し、ウシで 5% 以上、ブタで 10% 以上のブタ精漿を添加することで最大の走化性の低下が認められた。

次に、同様にブタ精漿がブタおよびウシ多核白血球による同種精子の貪食能におよぼす影響について調べたところ、走化性と同様、ブタ精漿を 1% 以上添加することでその貪食能は有意に低下し、ウシで 5% 以上、ブタで 10% 以上のブタ精漿を添加することで最大の貪食能の低下が認められた。

また、ブタ精子およびウシ精子浮遊液への卵黄の添加がブタおよびウシ多核白血球による同種精子への走化性におよぼす影響について調べたところ、有意に走化性を刺激したが、同液へのカフェインまたは精漿の添加は、その走化性の促進を卵黄無添加区と同じ程度にまで低下させることを明らかにした。

一方、ブタ精子およびウシ精子浮遊液への卵黄の添加がブタおよびウシ多核白血球による同種精子の貪食能におよぼす影響について調べたところ、ブタ精子浮遊液への卵黄の添加は、同種多核白血球による貪食能を著しく刺激するが、ウシ精子浮遊液への卵黄の添加は同種多核白血球による貪食能に全く影響しなかった。さらに、卵黄を添加したブタ精子浮遊液へのカフェインまたは精漿の添加は、刺激された同種多核白血球による貪食能を卵黄無添加区と同じ程度にまで低下さ

せることを明らかにした。

以上の結果から、ウシと比較してブタでは、凍結精液に添加される卵黄の存在に対する多核白血球の貪食能おける感受性が極めて高いことを明らかにした。この差が、凍結精液による人工授精後の受胎成績の差に反映している可能性が示唆される。さらに、ブタ凍結精液へのカフェインや精漿の添加は、この多核白血球の卵黄に対する感受性を低下させるのに有用であることを明らかにした。これらの知見を活用することで、効率的な人工授精を実施可能な雌性生殖道の免疫制御技術システムの構築の可能性が明らかになった。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Jing-Chun Li, Shoichiro YAMAGUCHI, Yasuhiro KONDO and **Hiroaki FUNAHASHI**, Caffeine, dibutyryl cyclic-AMP and heparin affect the chemotactic and phagocytotic activities of neutrophils for boar sperm in vitro. *Theriogenology*. 査読有, 75:1336-1345 (2011)
- ② Jing-Chun LI and **Hiroaki FUNAHASHI**, Effect of blood serum, caffeine and heparin on in vitro phagocytosis of frozen-thawed bull sperm by neutrophils derived from the peripheral blood of cows. *Theriogenology*, 査読有, 74, 691-698 (2010).
- ③ **舟橋弘晃**、グローバルな視点での人工授精の技術開発動向。養豚の友、査読無、2010年5月号、12-17 (2010)。
- ④ Yamaguchi, S., **Funahashi, H.** and Murakami, T. Improved fertility in gilts and sows after artificial insemination of frozen-thawed boar semen by supplementation of semen extender with caffeine and CaCl<sub>2</sub>. *Journal of Reproduction and Development*. 査読有, 55, 645-649 (2009)

[学会発表] (計8件)

- ① Jing-chun Li, **Hiroaki Funahashi**, The effect of pig seminal plasma and egg yolk on chemotaxis and phagocytosis of neutrophils derived from peripheral blood of pigs and cows. International Embryo Transfer Society, 37th Annual conference, 2011.1.8-12. Orlando, FL, USA.
- ② Jing-Chun Li, **Hiroaki Funahashi**, The influence of caffeine or heparin on chemotaxis and phagocytosis of swine polymorphonuclear leukocytes. The 4th Congress of Asian Pig Veterinary Society. 2009.10.26-28. Tsukuba International Congress Center, Tsukuba
- ③ **Hiroaki FUNAHASHI**, Jing-Chun LI, Shoichiro YAMAGUCHI, Tetsuya MURAKAMI, Reduction of immunological sperm loss following artificial insemination of boar semen. The 4th Congress of Asian Pig Veterinary Society. 2009.10.26-28. Tsukuba International Congress Center, Tsukuba
- ④ 藪崎雅紀, **舟橋弘晃**、卵黄含有希釈液の注入がラット子宮内多核白血球数に及ぼす影響、第102回日本繁殖生物学会大会、2009年9月10日(木)～12日(土)、近畿大学農学部(奈良市)

- ⑤ 李 井春、舟橋弘晃、カフェイン及びヘパリンが豚白血球の走化性と貪食性に及ぼす影響、第 102 回日本繁殖生物学会大会、2009 年 9 月 10 日(木)～12 日(土)、近畿大学農学部(奈良市)
- ⑥ 李井春、藪崎雅紀、舟橋弘晃、牛多核白血球の精子および血清に対する走化性、第 101 回日本繁殖生物学会大会、2008 年 9 月 18～20 日、九州大学医学部(福岡市)
- ⑦ 藪崎雅紀、李井春、舟橋弘晃、ラット子宮内多核白血球の性周期および交配後の変動、第 101 回日本繁殖生物学会大会、2008 年 9 月 18～20 日、九州大学医学部(福岡市)
- ⑧ 藪崎雅紀、舟橋弘晃、ラット雌性生殖道内に射出された精子の多核白血球による貪食、ラット生殖工学ワークショップ、2008 年 7 月 20 日、麻布大学獣医学部(相模原市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

舟橋 弘晃 (FUNAHASHI HIROAKI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：50284089

### (2) 研究分担者

近藤 康博 (KONDOU YASUHIRO)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：90108126

### (3) 連携研究者