

氏名（本籍）	佐藤昌子（静岡県）		
学位の種類	博士（獣医）		
学位記番号	獣医博乙第50号		
学位授与年月日	平成14年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位論文題目	シャトルボックス高および低回避ラット (Hatano ラット) の雄性生殖機能に関する研究		
審査委員	主査	東京農工大学	教授 田谷一善
	副査	帯広畜産大学	教授 山田純三
	副査	岩手大学	教授 三宅陽一
	副査	東京農工大学	教授 加茂前秀夫
	副査	岐阜大学	教授 坪田敏男

## 論文の内容の要旨

太田らにより、財団法人食品薬品安全センター秦野研究所において Sprague-Dawley 系ラットからシャトルボックス条件回避学習試験の成績を基にして、近交系ラットが作出された。これが、Hatano ラットであり、良好な成績の動物を Hatano 高回避ラット、劣悪な成績の動物を Hatano 低回避ラットと称し、現在まで 40 世代を超えて維持されている。この Hatano ラットは、シャトルボックス条件回避学習試験以外にも、視床下部—下垂体—副腎軸に関する内分泌系や、母性行動および泌乳量などの雌性生殖機能に関する特徴が見出されている。本研究では、Hatano ラット両系の雄性生殖機能について比較研究を行った。

第1章では、緒論として、シャトルボックス試験およびラットの雄性生殖機能について記述し、本研究の目的を述べた。

第2章では、本研究に共通する材料および方法について記述した。

第3章では、性成熟に関する系統差に関する知見をまとめた。

雄動物の春機発動および性成熟に関して調べた結果、春機発動の指標とされている陰茎包皮分離の日齢は、高回避ラットが、低回避ラットより約7日早いことが判明した。また、初回精子形成を精巣の遺残体観察から調べた結果、初回精子形成も高回避ラットの方が約3日早く起こることが判明した。日齢に伴う血中ホルモン濃度の変化を調べた結果、高回避ラットの血中性腺刺激ホルモンレベルは低回避ラットより早期

に高いレベルを示し、幼若期ではこの差が維持されることが明らかとなった。また、高回避ラットで包皮分離が起こる時期に相当する 42 日齢時の血中テストステロン濃度は、高回避ラットが低回避ラットより高い値を示した。

以上の結果から、幼若雄 Hatano ラットに認められた血中性腺刺激ホルモン濃度の系統差が、初回精子産生の日齢差となり、さらに、テストステロン分泌の系統差となつて、春機発動の指標である包皮分離完成日の系統差として発現したものと推察された。

第 4 章では、精子運動性の特徴に関する知見をまとめた。

Hatano ラット両系の精子に関して比較検討を行った結果、精子数は、成熟後には系統間で差が認められなかった。しかし、Hatano ラット両系の精巣上体尾精子の運動性を精子運動能自動解析装置にて解析したところ、高回避ラットの精子は、運動精子率が高いこと、精子遊泳速度が速いこと、さらに、精子遊泳パターンは精子頭部の振幅が大きいことが判明した。この精子運動性の系統差は、9 週齢から 18 ヶ月齢まで一貫して認められた。精子運動のエネルギー源であるアデノシン 3 リン酸 (ATP) の産生を阻害する  $\alpha$ -クロロヒドリンを投与して精子運動性の変化を調べたところ、 $\alpha$ -クロロヒドリンを投与した高回避ラット精子の遊泳速度は、正常な低回避ラットの精子と同レベルまで減少した。この  $\alpha$ -クロロヒドリン投与実験から、Hatano ラット両系の精子遊泳速度の系統差に関しては、ATP の関与が推察された。

第 5 章では、精子の形態観察に関する知見をまとめた。

光学顕微鏡による精子塗沫標本の観察結果から、高回避ラット精子の異常精子率は 3 から 5%であったが、低回避ラット精子の異常精子率は 10%を超える高い値を示した。低回避ラットに認められたこの形態異常精子の増加が、運動精子率の低下に相関するものと考えられた。電子顕微鏡による精子の微細構造観察から、低回避ラットの精子尾部の頸部 (結合部) および中間部にリボゾーム様粒子の貯留が多いことが判明した。この低回避ラット精子の中間部に認められた粒子の異常貯留が、精子中間部の柔軟性を物理的に障害し、精子遊泳パターンの指標である精子頭部振幅を減少させるものと推察された。

Hatano ラット両系を交雑して得られた F1 動物の精子運動性および精子奇形率は、父動物および母動物を代えてもいずれも高回避ラット精子の特徴を有することが判明した。この結果から、低回避ラット精子に認められた精子の特徴は、いずれも常染色体性の劣性ホモ遺伝子により支配されている形質である可能性が示唆された。

第 6 章では、ATP および cAMP が精子運動性に及ぼす影響に関する知見をまとめた。

Hatano ラット精子の運動性の系統差には ATP の関与が考えられたため、精子の ATP 含有量を調べた。培養 5 分後の精子 ATP 含有量は、高回避ラット精子が低回避ラット精子より多いことが判明した。さらに、Triton X-100 を用いて除膜精子モデルを作製し、培養液に ATP およびサイクリック AMP (cAMP) を加えその際に活性化された動きを観察した。ATP の存在下で cAMP の濃度を変えて培養した場合、両系統ラットの精子共に cAMP の濃度に依存して遊泳速度の増加が認められたが、同濃

度の cAMP 存在下では、高回避ラット精子の遊泳速度は低回避ラット精子より速いことが判明した。これらの結果から、Hatano ラット両系に認められた精子遊泳速度の系統差は、両系精子の ATP 含量あるいは ATP 産生量に差があること、さらに、cAMP に対する反応性が異なることに起因するものと推察された。

以上の結果から、雄性 Hatano ラット両系には、春機発動と性成熟、および精子の運動性と精子の形態に明らかな系統差が存在することが判明した。この様に、精子の運動速度に明らかな差異があるにもかかわらず、妊孕性に差のない精子を有するラットの系統は、初めての例であることから、Hatano ラット両系は、精子の受精能や雄性不妊症に関する研究のモデル動物として有用であろうと考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

太田らにより Sprague-Dawley 系ラットからシャトルボックス条件回避学習試験で良好な成績を示した動物、あるいは劣悪な成績を示した動物をそれぞれ選抜し、近交系の Hatano ラットが作出された。良好な成績の動物を Hatano 高回避ラット、劣悪な成績の動物を Hatano 低回避ラットと称し、現在まで 40 世代を超え維持されている。この Hatano ラットは、シャトルボックス条件回避学習試験以外にも、副腎皮質刺激ホルモン分泌等の様々な内分泌学的特徴が見出されている。本研究は、Hatano ラット両系の雄性生殖機能について比較研究を行ったものである。

### 1. 性成熟

雄動物の春機発動および性成熟に関して調べた結果、春機発動の指標とされている陰茎包皮分離および初回精子形成の日齢が高回避ラットで早く起こることが判明した。また、血中性腺刺激ホルモンおよびテストステロン濃度は、高回避ラットが低回避ラットより高い値を示した。以上の結果から、幼若雄 Hatano ラットに認められた血中性腺刺激ホルモン濃度の系統差が、初回精子生産の日齢差となり、さらに、テストステロン分泌の系統差となって、春機発動の指標である包皮分離完成日の系統差として発現したものと解釈された。

### 2. 精子運動性

精子の運動性を解析した結果、高回避ラットの精子は、運動精子率が高く、精子遊泳速度が速いこと、また、精子頭部の振幅が大きいことが判明した。さらに、Hatano ラット両系の精子遊泳速度の系統差に関しては、ATP の関与が示唆された。

### 3. 精子の形態

低回避ラット精子の異常精子率は、高回避ラットに比べて高く、この形態異常精子の増加が、運動精子率の低下に相関すると考えられた。また、精子の微細構造観察から、低回避ラットの精子は、尾部の頸部（結合部）および中間部にリボゾーム様粒子の貯留程度が多いことが判明した。この低回避ラット精子に認められた粒子の異常貯留が、精子中間部の柔軟性を物理的に障害し、精子遊泳パターン指標である精子頭

部振幅を減少させる可能性が示唆された。

#### 4. 精子運動性に及ぼす ATP および cAMP の影響

Hatano ラット精子の運動性の系統差には ATP の関与が考えられたため、精子の ATP 含有量を調べた。培養 5 分後の精子 ATP 含量は、高回避ラット精子が低回避ラット精子より多いことが判明した。これらの結果から、Hatano ラット両系に認められた精子遊泳速度の系統差は、両系精子の ATP 含量あるいは ATP 産生量に差があること、さらに、cAMP に対する反応性が異なることに起因する可能性が示唆された。

#### 5. Hatano ラット両系の F1 動物の精子の特徴

Hatano ラット両系を交雑して得られた F1 動物の精子運動性および精子奇形率は、父動物および母動物を代えてもいずれも高回避ラット精子の特徴を有することから、低回避ラット精子に認められた精子の特徴は、いずれも常染色体性の劣性ホモ遺伝子により支配されている形質である可能性が示唆された。

以上の結果から、雄性 Hatano ラット両系には、春機発動と性成熟、および精子の運動性と精子の形態に明らかな系統差が存在することが判明した。この様に、精子の運動速度に明らかな差異があるにもかかわらず、妊孕性に差のない精子を有するラットの系統は、世界でも初めての例であることから、Hatano ラット両系は、精子の受精能や雄性不妊症に関する研究のモデル動物として有用であろうと考えられる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値ある内容であるものと認めた。

### 基礎となる学術論文

1) 題 目 : Utilization of a computer-assisted sperm motion analysis system to examine effects of dinoseb on rat sperm

著 者 名 : Sato Masako, Ohta Ryo, Wada Kazuyoshi, Marumo Hideki, Shirota Mariko and Nagao Tetsuji

学術雑誌名 : Journal of Reproduction and Development

巻・号・頁・発行年 : 46(5) : 279~286, 2000

2) 題 目 : Differences in sperm motion between high and low shuttlebox avoidance rats (Hatano strains)

著 者 名 : Sato Masako, Ohta Ryo, Kojima Kohichi and Shirota Mariko

学術雑誌名 : Journal of Andrology

巻・号・頁・発行年 : 23(2) : 2002 投稿中

3) 題 目 : A comparative study of puberty and plasma gonadotropin and testicular hormone levels in two inbred strains of Hatano rats

著者名 : Sato Masako, Ohta Ryo, Kojima Kohichi, Shiota Mariko, Koibuchi Satoshi,  
Asai Sayaka, Watanabe Gen and Taya Kazuyoshi

学術雑誌名 : Journal of Reproduction and Development

巻・号・頁・発行年 : 48(2) : 2002 投稿中

## 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Congenital malformations in the offspring of male mice treated with ethylnitrosourea at the embryonic stage  
著者名 : Wada Azusa, Sato Masako, Takashima Hiromasa and Nagao Tetsuji  
学術雑誌名 : Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis  
巻・号・頁・発行年 : 14(6) : 271~279, 1994
- 2) 題 目 : Pantothenic acid decreases valproic acid-induced neural tube defects in mice (I)  
著者名 : Sato Masako, Shiota Mariko and Nagao Tetsuji  
学術雑誌名 : Teratology  
巻・号・頁・発行年 : 52(3) : 143~148, 1995
- 3) 題 目 : Carnitine and coenzyme A decrease valproic acid-induced neural tube defects in mice  
著者名 : Nagao Tetsuji, Shiota Mariko and Sato Masako  
学術雑誌名 : Congenital Anomalies  
巻・号・頁・発行年 : 36(2) : 65~74, 1996
- 4) 題 目 : Testicular development and fertility of mice treated prenatally with *N*-nitroso-*N*-ethylurea at various gestational stages  
著者名 : Nagao Tetsuji, Sato Masako, Marumo Hideki, Shibuya Tohru and Imai Kiyoshi  
学術雑誌名 : Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis  
巻・号・頁・発行年 : 16(3) : 183~198, 1996
- 5) 題 目 : Treatment of mouse preimplantation embryos with adriamycin, methyl methanesulfonate and retinoic acid results in congenital defects  
著者名 : Nagao Tetsuji, Shiota Mariko and Sato Masako  
学術雑誌名 : Congenital Anomalies  
巻・号・頁・発行年 : 37(1) : 21~29, 1997
- 6) 題 目 : Effects of prenatal exposure to 5-bromo-2'-deoxyuridine on reproductive function in male mouse offspring

著者名 : Nagao Tetsuji, Sato Masako, Kuwagata Makiko and Saito Yoshiaki

学術雑誌名 : Reproductive Toxicology

巻・号・頁・発行年 : 11(5) : 663~673, 1997

7) 題 目 : Postnatal behavior in Hatano high- and low-avoidance rats following prenatal exposure to low-dose methylazoxymethanol

著者名 : Ohta Ryo, Matsumoto Aki, Sato Masako, Shirota Mariko, Nagao Tetsuji, Tohei Atsushi and Taya Kazuyoshi

学術雑誌名 : Neurotoxicology and Teratology

巻・号・頁・発行年 : 22(3) : 405~413, 2000

8) 題 目 : Influence of corn oil and diet on reproduction and the kidney in female Sprague-Dawley rats

著者名 : Sato Masako, Wada Kazuyoshi, Marumo Hideki, Nagao Tetsuji, Imai Kiyoshi and Ono Hiroshi

学術雑誌名 : Toxicological Sciences

巻・号・頁・発行年 : 56(1) : 156~164, 2000