

氏名 (本 (国) 籍)	Quzi Sharmin Akter (バングラデシュ人民共和国)		
主指導教員氏名	岐阜大学 教授 村瀬 哲磨		
学位の種類	博士 (獣医学)		
学位記番号	獣医博甲第537号		
学位授与年月日	平成31年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	岐阜大学		
学位論文題目	Studies on the Effect of Magnesium and Polymyxin B on Liquid-stored Boar Spermatozoa (ブタ液状保存精子へ及ぼすマグネシウム及びポリミキシン B の効果に関する研究)		
審査委員	主査	岐阜大学 准教授	齋藤 正一郎
	副査	帯広畜産大学 教授	松井 基純
	副査	岩手大学 教授	高橋 透
	副査	東京農工大学 教授	渡辺 元
	副査	岐阜大学 教授	村瀬 哲磨

#### 学位論文の内容の要旨

豚の繁殖において人工授精技術が普及してきているが、夏季不妊症が古くから世界的に知られている。夏季に採取される豚精子は、カルシウム及びカルシウムイオノホア A23187 ( $\text{Ca}^{2+}/\text{A23187}$ ) に反応して誘起される先体反応が過敏に発生し、このことと夏季に精漿中のマグネシウムイオン ( $\text{Mg}^{2+}$ ) 濃度が低くなる傾向があること及び人工授精後の分娩率が低下することが関連していることが報告されている。また、夏季には細菌の増殖が早くなることが考えられる。夏季の受胎成績が低下することを阻止することを目的とし、本研究は冷蔵保存精液へ添加剤、 $\text{Mg}^{2+}$  及び抗生物質である硫酸ポリミキシン B (PMB), を添加することにより過敏な先体反応誘起を抑制するか否か及び PMB の精子の先体反応へ及ぼす影響があるか否かについて解析した。先体反応は受精における必要不可欠なプロセスであるので、 $\text{Mg}^{2+}$  及び PMB が直接精子機能へ及ぼす影響を調べた後、両者の冷蔵保存精液への添加が保存後の精子の一般性状及び先体反応へ及ぼす影響を解析した。

カルシウムの流入が先体反応の開始に必須であるが、 $\text{Mg}^{2+}$  はカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) の生理的な拮抗剤である。第2章第1節の研究は、 $\text{Ca}^{2+}/\text{A23187}$  により誘起される先体反応へ及ぼす  $\text{Mg}^{2+}$  の影響を調べた。冷蔵保存したブタ精子を洗浄し、種々の異なる  $\text{MgCl}_2$  あるいは  $\text{MgSO}_4$  の存在下で  $\text{Ca}^{2+}/\text{A23187}$  にて刺激した。0–3 mM の  $\text{MgSO}_4$  あるいは  $\text{MgCl}_2$  の存在下で、精子を 10 及び 15 分間刺激後の先体反応誘起率は、いずれの時間においても他の濃度と比べて 0.1 mM の  $\text{MgCl}_2$  あるいは  $\text{MgSO}_4$  で有意に低下した。精子を 0–0.1 mM  $\text{MgSO}_4$  の存在下で  $\text{Ca}^{2+}/\text{A23187}$  により 60 分間まで刺激した結果、 $\text{Ca}^{2+}/\text{A23187}$  により誘起された先体反応は  $\text{MgSO}_4$  により濃度依存的に抑制され、その抑制は 0.1 mM で最大であった。同様に 0.1–3 mM の  $\text{MgSO}_4$  存在下で精子を刺激した結果、

その抑制は 0.1 mM で最大であった。以上より  $\mu\text{M}$  レベルの  $\text{Mg}^{2+}$  により mM レベルの  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で  $\text{Ca}^{2+}/\text{A23187}$  により誘起される先体反応は抑制されることが示唆された。

第 2 章第 2 節の研究では、希釈液で希釈したブタ精液に  $\text{Mg}^{2+}$  を添加して保存した場合の保存後の精子の運動性及び先体反応へ及ぼす影響を調べた。 $\text{MgSO}_4$  (0–8 mM) の添加では保存後の精子の運動性に影響しなかったが、保存した精子の先体反応を洗浄後  $\text{Ca}^{2+}/\text{A23187}$  により刺激した結果、刺激の 10 及び 15 分においてそれぞれ 4 mM 添加の精子において他の濃度に比べ有意に先体反応誘起率が低下した。刺激終了後の精子の運動率と生存率は  $\text{MgSO}_4$  添加による変化が見られなかったことから、誘起された先体反応は変性による先体の喪失ではないことが確認された。以上の結果は、夏季不妊症に特徴的である精子の過剰な先体反応誘起を緩和できる方法の開発に有用な情報を提供している。

PMB はエンドトキシンを中和することによりブタ精液の保存に有効であることが報告されている。しかし、体細胞においてはシグナル変換機構に関与する反応経路を調節することが知られている。第 3 章第 1 節の実験では、PMB が直接精子へ及ぼす影響を調べた。冷蔵保存した精子を洗浄し、0–100  $\mu\text{M}$  の PMB の存在下で精子を培養した結果、運動率と生存率は 0–50  $\mu\text{M}$  の範囲で変化しなかったが、75  $\mu\text{M}$  及び 100  $\mu\text{M}$  の PMB 添加で有意に低下した。直進運動率は 25  $\mu\text{M}$  以上の、活発さは 75  $\mu\text{M}$  以上の PMB 添加によりそれぞれ有意に低下したが、凝集はいずれの濃度においても影響を受けなかった。一方、同様に洗浄した精子を運動率と生存率に影響しなかった濃度である 0–50  $\mu\text{M}$  の PMB 存在下で前培養した後、 $\text{Ca}^{2+}/\text{A23187}$  により先体反応を刺激した結果、0.01–0.5  $\mu\text{M}$  及び 1–50  $\mu\text{M}$  の添加でそれぞれ刺激の 10 分及び 15 分で誘起された先体反応が増強された。

第 3 章第 2 節の研究では、種々の濃度 (0–75  $\mu\text{M}$ ) の PMB を添加して希釈後保存した精子の運動性を調べると共に PMB 添加が先体反応へ及ぼす影響を調べた。保存した精子の運動率は PMB の添加によっては有意な影響を受けなかったが、直進運動率が PMB の添加濃度の上昇と共に上昇した。保存した精子を洗浄後、同様に 30 分まで  $\text{Ca}^{2+}/\text{A23187}$  存在下で培養し先体反応を刺激した。培養終了後、確認の目的で、精子の運動率、直進運動率、生存率、活発さ及び凝集を調べた。培養 15 分及び 30 分においてそれぞれ 50 及び 75  $\mu\text{M}$  の PMB 添加により  $\text{Ca}^{2+}/\text{A23187}$  により誘起された先体反応が増強された。25  $\mu\text{M}$  の PMB の添加により運動率及び生存率が他の濃度に比べて有意に低下したが、これらの以外の精子の性状は PMB 添加により影響を受けなかった。以上より、ブタ精液を PMB 存在下で保存することができ、これにより運動率と生存率は不変で直進運動率が上昇し先体反応の誘起が増強されることが示された。

以上より、マグネシウムは運動性を損なうことなくブタ冷蔵保存精液へ添加することができ、また、添加により先体反応の誘起が抑制されることから過剰な先体反応の誘起を緩和し、夏季に採取される精子の受精能力を高められる可能性が考えられた。一方、PMB を保存精液へ添加することにより受精部位までの精子の移行に必要な不可欠な運動である直進運動率を高めることができ、同時に卵子への侵入に必要な不可欠な先体反応誘起能力が高められ、受精能力を上昇させ得る可能性が考えられた。しかし、夏季に採取される精子へ添加することにより、過剰に誘起される先体反応をさらに増強する可能性があり、夏季に使用する際には考慮が必要と思われた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

豚の繁殖において人工授精技術が普及してきているが、本研究は古くから世界的に知られている夏季不妊症の改善を本研究の最終目標として行われた。夏季の受胎成績が低下することを阻止することを目的とし、本研究は冷蔵保存精液へ添加剤、 $\text{Mg}^{2+}$  及びエンドト

キシンを中和する抗生物質である硫酸ポリミキシン B (PMB), を添加することにより過敏な先体反応誘起を抑制するか否か及び PMB の精子の先体反応へ及ぼす影響があるか否かについて解析した。先体反応は受精における必要不可欠なプロセスであるので,  $Mg^{2+}$  及び PMB が直接精子機能へ及ぼす影響を調べた後, 両者の冷蔵保存精液への添加が保存後の精子の一般性状及び先体反応へ及ぼす影響を解析し, 両者を比較した。

第 2 章第 1 節では,  $Ca^{2+}/A23187$  により誘起される先体反応へ及ぼす  $Mg^{2+}$  の影響を調べた。0–3 mM の  $MgSO_4$  あるいは  $MgCl_2$  の存在下で, 精子を刺激した後の先体反応誘起率は, いずれの時間においても他の濃度と比べて 0.1 mM の  $MgCl_2$  あるいは  $MgSO_4$  で有意に低下した。精子を 0–3 mM  $MgSO_4$  の存在下で  $Ca^{2+}/A23187$  により 60 分間まで刺激した結果,  $Ca^{2+}/A23187$  により誘起された先体反応は  $MgSO_4$  により濃度依存的に抑制され, その抑制は 0.1 mM で最大であった。以上より  $\mu M$  レベルの  $Mg^{2+}$  により mM レベルの  $Ca^{2+}$  存在下で  $Ca^{2+}/A23187$  により誘起される先体反応は抑制されることを示した。

第 2 章第 2 節の研究は, 希釈したブタ精液に  $Mg^{2+}$  を添加して保存した場合の保存後の精子の運動性及び先体反応へ及ぼす影響を調べた。 $MgSO_4$  (0–8 mM) の添加では保存後の精子の運動性に影響しなかったが, 保存した精子の先体反応を  $Ca^{2+}/A23187$  により刺激した結果, 刺激の 10 及び 15 分においてそれぞれ 4 mM 添加の精子において他の濃度と比べ有意に先体反応誘起率が低下した。刺激終了後の精子の運動率と生存率は  $MgSO_4$  添加による変化が見られなかったことから, 誘起された先体反応は変性による先体の喪失ではないことを確認した。以上の結果は, 夏季不妊症に特徴的である精子の過剰な先体反応誘起を緩和できる方法の開発に有用な情報を提供した。

PMB は体細胞においてはシグナル変換機構に関与する反応経路を調節することが知られていることから, 第 3 章第 1 節の実験では, PMB が直接精子へ及ぼす影響を調べた。0–100  $\mu M$  の PMB の存在下で精子を培養した結果, 運動率と生存率は, 75  $\mu M$  及び 100  $\mu M$  の PMB 添加で有意に低下した。直進運動率は 25  $\mu M$  以上の, 活発さは 75  $\mu M$  以上の PMB 添加によりそれぞれ有意に低下したが, 凝集はいずれの濃度においても影響を受けなかった。一方, 運動率と生存率に影響しなかった濃度である 0–50  $\mu M$  の PMB 存在下で前培養した後,  $Ca^{2+}/A23187$  により先体反応を刺激した結果, 0.01–0.5  $\mu M$  及び 1–50  $\mu M$  の添加でそれぞれ刺激の 10 分及び 15 分で誘起された先体反応が増強された。

第 3 章第 2 節の研究では, 種々の濃度 (0–75  $\mu M$ ) の PMB を添加して希釈後保存した精子の運動性を調べると共に PMB 添加が先体反応へ及ぼす影響を調べた。保存した精子の運動率は PMB の添加によっては有意な影響を受けなかったが, 直進運動率が PMB の添加濃度の上昇と共に上昇した。保存した精子を洗浄後, 同様に 30 分まで  $Ca^{2+}/A23187$  存在下で培養し先体反応を刺激した。培養終了後, 確認の目的で, 精子の運動率, 直進運動率, 生存率, 活発さ及び凝集を調べた。培養 15 分及び 30 分においてそれぞれ 50 及び 75  $\mu M$  の PMB 添加により  $Ca^{2+}/A23187$  により誘起された先体反応が増強された。25  $\mu M$  の PMB の添加により運動率及び生存率が他の濃度と比べて有意に低下したが, これらの以外の精子の性状は PMB 添加により影響を受けなかった。以上より, ブタ精液を PMB 存在下で保存することができ, これにより運動率と生存率は不変で直進運動率が上昇し先体反応の誘起が増強されることを示した。

以上より, 本研究はマグネシウムは運動性を損なうことなくブタ冷蔵保存精液へ添加することができ, また, 添加により先体反応の誘起が抑制されることから過剰な先体反応の誘起を緩和し, 夏季に採取される精子の受精能力を高められる可能性を指摘した。一方, PMB を保存精液へ添加することにより直進運動率を高めることができ, 同時に卵子への侵入に必要な先体反応誘起能力が高められ, 受精能力を上昇させ得る可能性を示し

たが、夏季に採取される精子へ添加することにより、過剰に誘起される先体反応をさらに増強する可能性があり、夏季に使用する際には考慮が必要であることを指摘した。

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があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Polymyxin B enhances acrosomal exocytosis triggered by calcium and the calcium ionophore A23187 in ejaculated boar spermatozoa  
著 者 名 : Akter, Q. S., Rajabi-Toustani, R., Shimizu, K., Kuwahara, Y. and Murase, T.  
学術雑誌名 : Animal Science Journal  
巻・号・頁・発行年 : In Press

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Effect of calmodulin on the stimulation of capacitation and acrosome reaction of frozen thawed bull spermatozoa  
著 者 名 : Akter, Q. S., Tareq, K. M. A., Hamano, K. and Gilchrist, R. B.  
学術雑誌名 : Bangladesh Journal of Animal Science  
巻・号・頁・発行年 : 45 (3) : 1-9, 2016