

氏 名 山口 昇一郎
授与した学位 博士
専攻分野の名称 農 学
学位授与番号 博乙第4399号
学位授与の日付 平成25年 3月25日
学位授与の要件 博士の学位論文提出者

(学位規則第5条第2項該当)

学位論文の題目 子宮内免疫反応制御による豚凍結精液人工授精技術に関する研究
論文審査委員 教授 舟橋 弘晃 教授 国枝 哲夫 准教授 辻 岳人

学位論文内容の要旨

近年、養豚生産現場では、新鮮精液による豚人工授精（以下 AI）の普及が進みつつあるが、精液の保存期間が短いなどの問題がある。一方、半永久的に保存可能な凍結精液の使用は、繁殖成績が低下することなどから実用化までには至っていない。

授精により、子宮内に注入された精子は、子宮内への多形核白血球（以下 PMNs）の流入を特徴とする炎症反応により、多くの精子が PMNs に貪食される。新鮮精液を用いた AI で、精液希釈液にカフェインを添加することで、子宮内への PMNs の増加および PMNs の活性が抑制されることが報告されている。そこで、凍結精液に用いる精液希釈液にカフェイン（以下 CAF）を添加することで、子宮内の炎症反応を制御し、繁殖成績が向上するか否かについて検討を行った。また、CAF は、精子の自発的先体反応を促進させ、受精率の低下を引き起こす恐れもあることから自発的先体反応を抑制する方法についても検討した。

精液希釈液への CAF と塩化カルシウムの添加が豚凍結精液 AI 後の繁殖性に及ぼす影響について検討した。モデナ液(n = 7)または BTS 液に CAF (1.15 mM) と塩化カルシウム (3.97 mM) を添加した液(以下 CAF 添加希釈液, (n = 7))に豚凍結精液を希釈し、未経産豚に子宮頸管注入器で 2 回 AI を行った。モデナ区と添加区の子宮内全 PMNs 数間に差は認められなかった。しかし、子宮内精子数は、モデナ区に比べて添加区で有意に多かった (P<0.05)。モデナ液(n = 21)または CAF 添加希釈液(n = 21)で豚凍結精液を希釈し、未経産豚および経産豚に子宮体部注入器で 2 回 AI を行った。受精率および分娩率は、モデナ区(それぞれ 38.1%, 31.6%)より添加区(それぞれ 71.4%, 59.1%)で有意に高かった(P<0.05)。

上記の 1.15 mMCAF 添加希釈液内に抗酸化物質であるβ-ME を添加して、凍結融解精子の機能、精子に対する PMNs の貪食活性および AI 後の繁殖性に及ぼす影響を検討した。凍結融解精子を CAF 添加基礎培地に 25 μM もしくは 50 μM β-ME を添加した培地で培養した時、受精能獲得と自発的な先体反応が有意に抑制された(P<0.01)。体外での PMNs の精子貪食活性についてβ-ME の影響は認められなかった。離乳後の経産豚にホルモン処理(eCG 400 IU と hCG 200 IU)を行い、その 72 時間後に hCG を授与し、hCG 授与 40 時間後に定時 1 回子宮体部授精を行った。その結果、受精率と分娩率で、50 μMβ-ME 添加の影響は認められなかった。しかし、無添加区に比べ添加区の平均産子数は、多い傾向にあった(10±1.0 頭 vs 5.7±1.5 頭, P<0.07)。

高濃度の CAF を希釈液（モデナ液）に添加して、凍結融解精子の品質と凍結融解精液 AI 後の子宮での炎症性反応に及ぼす影響を検討した。10 mMCAF 添加モデナ液で凍結融解精子を 90 分間培養したところ、無添加区と細胞膜および先体膜へのダメージに差は認められなかった。子宮内 PMNs 数と子宮内膜中の炎症性サイトカイン等の mRNA 発現レベルをリアルタイム定量 RT-PCR 法によって分析した。AI 後の子宮内 PMNs 数は、CAF 無添加区に比べ CAF 添加区が有意に少なかった(P<0.05)。CAF 添加区の子宮内膜中の IL-8 mRNA 発現は、無添加区に比べ有意に低かった(P<0.05)。CAF 添加希釈液で AI した雌豚の受精率(70%, 16/23)は、無添加の場合(46%, 12/26)と比べて高い傾向があった(P<0.1)。

これらの研究により、精液希釈液(モデナ液または BTS 液)への CAF 添加が、豚凍結精液 AI 後の子宮内の免疫反応を制御し、子宮内の精子生存性を改善することで繁殖性を向上させることが明らかになった。また、その制御メカニズムは、白血球の走化性因子である IL-8 の mRNA 発現を抑制したことによるものと推察された。さらに CAF 添加希釈液に抗酸化剤 (β-ME) を添加もしくは基礎培地にモデナ液を用いることによって、CAF の負の影響である自発的な精子の先体反応の促進を抑制できることが明らかとなった。これらの成果は、養豚農家で実証され、特に暑熱期の受精率向上のツールとして現場で活用されている。

論文審査結果の要旨

本提出論文は、家畜の増殖手法として広く利用されている人工授精技術について、ブタでその精子利用効率を格段に改善するための技術開発についての成果をまとめたものである。

まず、人工授精によってブタ子宮内に注入された精子と、それに反応して子宮内に流入する多形核白血球の変化を明らかにし、多形核白血球による精子の貪食が、人工授精液へのカフェイン添加およびカルシウム濃度の補強によって顕著に軽減されることを見出した。また、同法による人工授精で受胎率および分娩率が改善することを明らかにした。次に、人工授精液への抗酸化物質である β -ME 添加によってカフェイン添加による精子の自発的先体反応制御に成功し、離乳後の経産豚への定時人工授精によって平均産子数を若干改善できることを示した。また、高濃度のカフェインの人工授精液への添加によって、凍結融解精子の品質に影響を及ぼすことなく、子宮中の多形核白血球数を減少させ、子宮内精子の生存性を向上させることを明らかにした。また、その制御メカニズムは、白血球の走化性因子である IL-8 の mRNA 発現を抑制したことによることも明らかにした。これらの成果は、養豚農家で実証され、特に暑熱期の受胎率向上のツールとして現場で活用されている。

以上の知見は、実用的かつ効率的なブタの人工授精技術として、さらにそれに係わる基礎資料として、高く評価できる。また、本提出論文が明らかにした知見は、人類にとって重要な肉資源の一つであるブタの改良増殖効率の改善に役立ち、産業上も極めて意義深いものである。

以上のことから、本学位審査委員会は、これらの成果をまとめた本論文の内容および参考文献を総合的に審査し、本論文は、博士（農学）の学位に値すると判断した。