HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Evaluation of bovine semen quality based on sperm organelle functions and motility subpopulation structures [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	菅野, 智裕
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第13063号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70482
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Chihiro_KANNO_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：菅野　智裕
Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Evaluation of bovine semen quality based on sperm organelle functions and motility subpopulation structures
（精子の細胞小器官機能および運動様式を指標にした牛精液品質評価法の検討）

わが国において、乳牛および肉牛のほとんどは凍結融解精液を用いた人工授精により生産される。しかし、精液の凍結融解過程における運動性低下や先体傷害および受精能獲得様変化によって精子の寿命および受精能は低下する。従来これらの精子機能評価は、顕微鏡下における主観的検査によってなされてきた。しかし、精子の受胎性には多くの機能が複雑に関連し、単一項目の検査では正確に評価することは困難である。このため、複数の精子機能を同時に評価できる方法の開発が求められている。近年、客観的な精子機能評価法として、フローサイトメトリー（FCM）を用いた蛍光染色や精子運動能自動解析装置（CASA）が活用されるようになった。しかし、FCM で複数の項目を評価するためには、蛍光波長の異なる色素の組み合わせが必要であり、2 項目の同時評価が一般的である。さらに、CASA における精子運動性評価は、精子個々について運動様式を解析できるものの、精子運動様式と受胎性の関係を評価するために必要な基礎データが得られていない。そこで本研究では、精子の細胞小器官機能および運動様式を指標とした精子の品質評価方法を検討した。

第 I 章では、牛精子において複数の細胞小器官機能、すなわち細胞膜および先体の正常性とミトコンドリア活性を客観的かつ同時に評価する手法を検討した。まず、SYBR-14、ヨウ化プロピジウム（PI）および PE-PNA により精子を染色し、蛍光顕微鏡および FCM を用いて細胞膜および先体正常性を評価した。その結果、目視と

FCM による検査結果は同等であったが、FCM はより多くの精子について短時間で検査可能であった。次に、上記染色法に加え、ミトコンドリア機能評価のために MitoTracker Deep Red（MTDR）による 4 重染色を行った。その結果、細胞膜正常性、先体正常性およびミトコンドリア活性を同時に評価した場合も単染色により個々の機能を別々に評価した場合と同様の結果が得られることが分かった。以上の結果から、本研究で検討した 4 重染色法は従来の染色方法と同程度以上の検査精度を有し、かつ精子毎の複数の細胞小器官機能を同時に評価できることが示された。

第 II 章では、凍結過程における精子細胞小器官機能の傷害を 4 重染色により同時に評価した。本章では蛍光顕微鏡下で精子機能を評価するため、ヘキスト 33342、PI、FITC-PNA および JC-1 を用いた。その結果、凍結前の冷却過程においてミトコンドリア活性の低下する精子割合の増加が明らかになった。凍結過程は精子を直接的に傷害すると報告されてきたが、この結果は、冷却過程において最初にミトコンドリア機能が低下し、引き続いて先体傷害および細胞死が誘起されると考えられた。

第 III 章では、クラスター解析を用いて運動様式の異なる精子サブポピュレーション構成と受胎性との関係を検討した。同一日に連続採取した精液では、射出順序により精子運動性および受胎性が異なると報告されている。そこで、第 1 射出精液（高運動・低受胎性）と第 2 射出精液（低運動・高受胎性）に含まれる精子の運動様式を比較した。4 頭の黒毛和種雄牛より採取した精液を CASA による精子運動性解析に供した。全ての運動精子について、直線速度（VSL）、曲線速度（VCL）、平均速度（VAP）、頭部振幅（ALH）および頭部振動数（BCF）を用いてクラスター解析を実施したところ、運動精子は次の 4 つのクラスターに分類された；1）高速で直線的に運動する精子、2）高速で曲線的に運動し、頭部振幅が大きいが頭部振動数は少ない精子、3）中程度の速度で、頭部振幅が小さく、頭部振動数が多い精子、および 4）運動性の乏しい精子。精子サブポピュレーション構成を射出順序によって比較したところ、射出順序はクラスター1 および 4 の割合に影響しないものの、第 1 射出精液は第 2 射出精液よりクラスター2 が多くクラスター3 が少なかった。クラスター2 精子は頭部振幅が最も大きく、受精能獲得精子に特徴的なハイパーアクチベーション様の運動と考えられ、その寿命は短いと考えられた。また、クラスター3 精子は頭部振幅が小さく振動回数が多かったことから、雌生殖道内での寿命が長いと推察された。以上の結果から、クラスター2 および 3 の割合が精液の受胎性に関与することが示唆された。

第 IV 章では、クラスター解析が精液の受胎性予測に応用可能か検討した。まず、凍結融解精子の寿命を短縮させると考えられるハイパーアクチベーション様運動の評価に適した培地および CASA による撮影速度の影響を検討した。凍結融解精子を体外受精培地（BO）あるいは合成卵管液（SOF）に浮遊させ、カルシウムイオノフォアによる受精能獲得処理群（A23187 添加）および非処理群について、添加前および添加直後より 5 分ごとに 30 分後まで、撮影速度を 150 フレーム/秒（fps）で

精子運動性を評価した。その結果、A23187 添加 BO 群において VSL と BCF が小さく、VCL と ALH が大きいハイパーアクチベーション様の運動性を示す精子の割合が増加したが、SOF では A23187 添加の場合もその割合は低かった。この結果から、BO がハイパーアクチベーション様運動の評価に適していると考えられた。A23187 添加 BO 群について、30、50、75 および 150 fps で撮影した精子運動性を解析したところ、撮影速度が高いほど VCL および BCF は高くなり、直進性（VSL/VCL）および ALH は低くなった。すなわち、撮影速度を 150 fps とすることで精子本来の運動を正確に捉えることが可能であると考えられた。次に、受胎性の低い精子モデルとして通常精子より受胎率が 10%程度低いと報告されている性選別精液の機能評価を行った。BO に浮遊させた A23187 添加群と非添加群の通常精子について、150 fps で撮影した運動性データをクラスター解析に供し、そのクラスター解析値をリファレンスとして同一雄牛から採取された通常精液と性選別精液の精子サブポピュレーション構成を比較した。その結果、性選別精液では融解直後にハイパーアクチベーション様の運動性を示す精子クラスターの割合が高く、直進運動精子クラスターは少ないことが分かった。また、4 重蛍光染色により、性選別精液にはミトコンドリア活性は高いものの細胞膜および先体に傷害を受けた精子が多く含まれることが明らかになった。以上の結果から、性選別過程はミトコンドリアではなく精子膜に直接傷害を与え、これによりハイパーアクチベーション様の運動が誘起された寿命の短い精子が増えることで人工授精後の受胎率が通常精液よりも低くなることが示唆された。

本研究の結果から、細胞小器官機能および運動様式に着目した精子品質評価方法により、凍結保存過程における精子の傷害や性選別精液等の低受胎精液における精子機能の変化を客観的かつ詳細に評価できることが示された。すなわち、蛍光染色および CASA を用いたクラスター解析による評価を組み合わせることにより、精子の受胎性予測に有用であると考えられた。また、これらの方法によって精子機能を詳細に評価することは、精液保存方法の改良・開発に寄与すると考えられた。