



# 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             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/70482">https://hdl.handle.net/2115/70482</a>                                                                                              |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/</a>                                                            |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                                                |
| File Information    | Chihiro_KANNO_review.pdf, 審査の要旨                                                                                                                                                |



## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：菅 野 智 裕

|      |        |           |
|------|--------|-----------|
| 審査委員 | 主査 教授  | 片 桐 成 二   |
|      | 副査 教授  | 坪 田 敏 男   |
|      | 副査 講師  | 坂 本 健 太 郎 |
|      | 副査 准教授 | 永 野 昌 志   |

## 学位論文題名

### 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）

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ているが、凍結融解過程で精子は傷害を受け、受精能が低下することが知られている。一方、精子の受胎性には多くの精子機能が複雑に関連するため、従来行われてきた顕微鏡下における運動性の主観的検査のみでは受胎性を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、近年、フローサイトメトリー（FCM）や精子運動能自動解析装置（CASA）が用いられるようになった。しかし、これらの機器を用いても、精子受胎性の正確な予測方法は未だ確立されていない。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。SYBR-14、ヨウ化プロピジウム（PI）、PE-PNA および MitoTracker Deep Red により精子を染色（4重染色）し、FCM を用いて細胞膜正常性、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。その結果、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、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で精子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。本章ではヘキスト 33342、PI、FITC-PNA および JC-1 を用いて、蛍光顕微鏡下で精子機能を評価した。その結果、凍結前の冷却過程でミトコンドリア活性の低下する精子の増加が認められ

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、冷却過程におけるミトコンドリア機能低下の後に先体傷害および細胞死が誘起されることが示唆された。

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。CASA により同一採精日の第 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）中の精子の運動様式を比較した結果、精子は 4 群に分類された。精子サブポピュレーション構成を射出順序間で比較したところ、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を示し寿命が短いと推察される精子群、および頭部を細かく頻繁に振動する、雌生殖道内での寿命が長いと考えられる精子群の割合に差異を認めた。これらの精子群の割合が精液の受胎性に関与すると考えられた。

第 IV 章では、精液の受胎性予測へのクラスター解析の応用を検討した。まず、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、受精能獲得処理群 (A23187 添加) および非処理群の精子運動性を、撮影速度 150 フレーム/秒 (fps) で評価した。その結果、A23187 添加 BO 群においてハイパーアクチベーション様の運動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。また、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、精子運動をより正確に捉えることが示された。次に、低受胎性モデルとして、通常精液より受胎率が 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を 150 fps で撮影した運動性データをリファレンスとして、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精子群の割合が高く、直進運動精子群は少なかった。また、4 重染色により、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示された。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を直接傷害し、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加するため、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は、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可能であり、精子の受胎性予測および精液保存方法の改良・開発に寄与すると考えられた。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者 菅野 智裕 氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。