

氏名	李井春
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第4283号
学位授与の日付	平成23年3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Factors affecting the chemotactic and phagocytotic activities of bovine and porcine neutrophils for the homogenous sperm <i>in vitro</i> (ウシおよびブタ好中球の同種精子に対する体外での走化性および貪食能に影響する要因について)
論文審査委員	教授 舟橋 弘晃 教授 近藤 康博 教授 国枝 哲夫

学位論文内容の要旨

Following artificial insemination, polymorphonuclear leukocytes (PMNs) are known to be recruited into the uterine lumen and to phagocytize spermatozoa in the female genital tract of mammals. It has not been well documented what kind of factors control the phagocytotic ability of PMNs in the female reproductive tracts of cows and pigs. This study was aimed at evaluating the factors affecting the chemotactic and phagocytotic activities of bovine and porcine neutrophils for the homogeneous sperm *in vitro*. The work involves three studies as follows.

1. *Effect of blood serum, caffeine and heparin on in vitro phagocytosis of frozen-thawed bull sperm by neutrophils derived from the peripheral blood of cows.*

The objective of this study was to determine the effects of blood serum, caffeine, and heparin on chemotaxis of PMNs for sperm and phagocytosis of sperm by PMNs in cows. From the results, we concluded that the phagocytotic and chemotactic activities of bovine PMNs were significantly stimulated by the presence of fresh serum, and the phagocytotic activity of PMNs for live sperm did not differ from that for dead sperm. Furthermore, the serum-stimulated abilities of PMNs were significantly decreased by the presence of caffeine or heparin.

2. *Caffeine, dibutyryl cyclic-AMP and heparin affect the chemotactic and phagocytotic activities of neutrophils for boar sperm in vitro.*

The objective was to examine the effects of caffeine, dibutyryl cyclic AMP, and heparin on the chemotaxis and/or phagocytosis of PMNs for porcine sperm. We demonstrated in the study that phagocytotic and chemotactic activities of porcine PMNs were stimulated by fresh serum; however, the phagocytotic activity of PMNs was similar for live and dead sperm. Furthermore, the serum-stimulated activities of PMNs were decreased by adding caffeine, dibutyryl cAMP, or heparin.

3. *Effects of porcine seminal plasma and hen's egg yolk on in-vitro chemotactic and phagocytotic activities of neutrophils for sperm in pigs and cows.*

The aim of this study was to determine the effects of porcine seminal plasma and hen's egg yolk on chemotaxis and phagocytosis of porcine and bovine PMNs *in vitro*. The results of the present study demonstrate inhibitory effects of porcine seminal plasma on both chemotactic and phagocytotic activities of porcine and bovine PMNs *in vitro*. Furthermore, we also show here that, in the presence of hen's egg yolk, PMNs from boars and bulls react species-specifically in the chemotactic and phagocytotic activities against porcine seminal plasma. Supplementation of porcine semen extender containing hen's egg yolk with caffeine or porcine seminal plasma may reduce both chemotactic and phagocytotic activities of porcine PMNs for sperm following artificial insemination and consequently may improve the fertility.

The current information could have future applications to increase reproductive and breeding performance for AI in cows and pigs.

論文審査結果の要旨

本提出論文は、家畜の人工受精時に生じる子宮内での多核白血球（好中球）の精子貪食による排除に着目し、その機構の人為的制御を目指すための基礎研究として、多核白血球の精子貪食能や走化性に影響する要因について研究を行い、その成果をまとめたものである。

先ず、ウシ多核白血球の同種精子貪食能や走化性をウシ新鮮血清が促進するが、2mM 以上のカフェインや 500 μ g/mL 以上のヘパリンの追加がそれらの促進効果を抑制することを見出した。これまで、子宮内では死滅精子が優先的に多核白血球の貪食によって除去されていると推察されていたが、本研究で、生存精子と死滅精子に対する多核白血球の貪食の程度に差はなかったことから、多核白血球は、生死に関係なく精子を貪食によって除去している可能性を示した。また、ブタの多核白血球の同種精子貪食能および走化性についても、ブタ新鮮血清存在下で活性化されるが、1mM 以上のカフェイン、100 μ g/mL 以上のヘパリンおよび 0.1mM 以上の dibutyryl cAMP の追加によって、その促進効果を抑制することを見出した。これらのことから、人工受精時にカフェインやヘパリン、dibutyryl cAMP を添加することで子宮内での精子の免疫細胞による消耗を改善できる可能性を示唆した。さらに、現在、凍結精液の人工受精時には、精子と一緒に凍結精液中のニワトリ卵黄が子宮内に注入されているが、ニワトリ卵黄は、多核白血球の走化性をウシおよびブタともに刺激するが、同種精子貪食能については、ブタでのみ刺激することを見出し、ウシに比べて、ブタ凍結精液の人工授精の成功率が低いことの一因を見出した。さらに、卵黄存在下でカフェインやブタ精漿を追加すると、卵黄が刺激したウシ多核白血球の同種精子貪食能や走化性を抑制することも見出し、凍結精液による人工授精時にこれらの供注入が有効である可能性を示した。

以上の知見は、実用的かつ効率的な人工授精技術の確立に係わる基礎資料として、高く評価できる。実際に、これらの知見をもとに、ブタの凍結精液による人工授精成績が改善されている。本提出論文が明らかにした知見は、産業上も極めて意義深いものである。

以上のことから、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。