

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	ムスラ ウッディン アハマド
題 目	ニワトリ (<i>Gallus domesticus</i>) の雌卵管における精子の長期生存機構に関する研究 (Studies on mechanisms underlying the prolonged survival of fowl sperm in the oviduct of domestic chicken (<i>Gallus domesticus</i>))
<p>雄鶏において精巣を去った精子が雄性生殖道の各部位で如何なる成熟変化を遂げるかについてほとんど知られていない。本研究では精子生産場所である精巣、精巣を去った精子の通路となる精巣上体および精管の 3 部位から精子を採取し、それらの運動性、膜透過性、酵素活性および受精能力などについて調べ、併せて雌生殖道に注入された精子が受精するまで雄とは異なる雌生殖器官の環境下で精子の生存性および受精率が如何に修飾されるのか、さらには受精時における精子の形態的变化について電顕的に観察し、ニワトリの雄性生殖器官内の精子の生理的变化から雌生殖器官に移行後の精子の動態を通してニワトリ精子生理学を探求することを目的とした。</p> <p>精巣、精巣上体および精管の 3 部位から採取した精液について運動性、酵素活性、卵子卵黄膜内層への透過および受精率はいずれも精巣を最小値にして、精巣上体から精管へ移動するにしたがい順次増加した。さらにこれら 3 部位の精子を体内条件下で培養したのち雌性生殖道に注入し、子宮・膈移行部 (SST) の細胞に結合した精子数を DAPI 蛍光染色法によって調べたところ、精巣、精巣上体および精管精子の順に増加した。精子生存性についてもその値は精巣、精巣上体および精管の順に増加することが SYBR-14/PI 蛍光染色法によって明らかになり、雄生殖器官における精子成熟は精子が精巣を去って射精部位に到達するまでに機能的な変化を続け、その成熟程度は精管末端部で最高に達するものと思われた。</p> <p>精子と可溶化した卵子卵黄膜内層を試験管内で培養したのち培養片を電顕的に観察したところ、内層との接触によって先体反応を引き起こした精子の先体頭部には哺乳類に見られる先体内外膜の融合による胞状化は見られず、先体刺状突起を残して頭帽が先体から遊離するという、ニワトリ受精時の精子の特異的な現象であると思われた。</p> <p>産卵鶏の子宮部の分泌相が非分泌、プランピング液および高カルシウム液のとき子宮部に注入した精子の SST における充足率、そこに存在する精子の生存期間および受精率はプランピング液の存在時に注入された場合が高かった。この値は子宮部が非分泌時の注入に比べ有意に高い値であった ($P < 0.05$)。産卵活動の高いニワトリと低いニワトリにおいてもプランピング液時に注入された精子の充足率、生存期間および受精率はそれ以外の時期に比べ高い値であった。一方、両者、すなわち産卵率の高いものと低いものとの比較では前者が有意に高かった ($P < 0.05$)。これらの結果は卵管子宮部で分泌される子宮液は精子の生存性、子宮・膈移行部における結合の促進ならびに受精率の向上に寄与していると思われた。</p>	

学 位 論 文 要 旨

氏 名	MUSLAH UDDIN AHAMMAD
題 目	Studies on mechanisms underlying the prolonged survival of fowl sperm in the oviduct of domestic chicken (<i>Gallus domesticus</i>) (ニワトリ (<i>Gallus domesticus</i>) の雌卵管における精子の長期生存機構に関する研究)
<p>It is well recognized that fowl sperm following a natural mating or a single artificial insemination (AI) first undergo a process of vaginal selection based on their fertility potential, then enter into the utero-vaginal junction (UVJ) sperm storage tubules (SST) to which they remain bound by their acrosomal cap and retain their potential for survival and fertility for a period of 21-28 days during which secretion from the uterus bathes them for most of the time of a day. However, there is no study addressing whether sperm- and uterine fluid (UF)-associated factors are responsible for the prolongation of sperm survival in the oviduct. Therefore, the present study examined fowl sperm for maturational changes in survivability, fertility and binding capacity to the SST as well as investigated the physiological significance of UF secretion in the vicinity of the UVJ-SST, with an aim to elucidate the underlying mechanisms of prolonged survival of sperm in the hen oviduct.</p> <p>Sperm recovered from the testis, epididymis, and proximal, middle and distal vas deferens exhibited a gradually increased survivability under both <i>in vitro</i> and oviductal storage conditions ($P < 0.05$), as detected by SYBR-14/PI fluorescent staining and evaluated by duration of fertile egg production following <i>in vitro</i> liquid storage and intrauterine AI, respectively. Motility, acrosomal proteolytic activity, and the capacity for penetration into the inner perivitelline layer and fertilization were also progressively increased ($P < 0.05$) as the sperm passed gradually through the descending tract of the male reproductive organ. Furthermore, when those sperm were simultaneously subjected to incubation with the mucosal epithelium of the SST under <i>in vitro</i> conditions and intrauterine AI, the number of sperm bound to the SST was increased gradually from the testicular to vas deferens samples ($P < 0.05$), as detected by the DAPI fluorescent staining of the SST. There was no difference ($P > 0.05$) between the vas deferens sperm and ejaculated sperm in the capacity for survival, fertilization and binding to SST-epithelium.</p> <p>Sperm inseminated artificially into the uterus of hens with regular secretion of UF survived longer and fertilized more eggs than those inseminated into the uterus of hens with irregular secretion of UF ($P < 0.05$). In particular, AI of sperm during either of the non-secretory, calcifying secretory and plumping secretory phases of the uterus and exposure of sperm to Lake' solution (LS), calcifying fluid (CF) and plumping fluid (PF) at 41°C <i>in vitro</i> resulted in minimal, medium and maximal life-span of sperm, respectively ($P < 0.05$). Sperm stored in LS alone <i>in vitro</i> at 4°C survived for only 2 days. In contrast, sperm stored in the presence of 25% PF in LS survived for 10 days.</p> <p>In conclusion, the present study revealed that fowl sperm simultaneously acquire the capacity for survival, fertilization and binding to the SST during their passage through the male reproductive tract as a means to undergo a process prolonged survival in the hen oviduct, whereas the uterine secretion especially secretion of the PF provides an environment suitable for the resident sperm to retain their maximal potential for survival.</p>	

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	MUSLAH UDDIN AHAMMAD (ムスラ ウッディン アハマド)
審査委員	主査 琉球 大学 教授 川本 康博
	副査 琉球 大学 教授 建本 秀樹
	副査 鹿児島 大学 教授 岡本 新
	副査 佐賀 大学 教授 尾野 喜孝
	副査 鹿児島 大学 准教授 三好 和睦
審査協力者	
題 目	ニワトリ (<i>Gallus domesticus</i>) の雌卵管における精子の長期生存機構に関する研究 (Studies on mechanisms underlying the prolonged survival of fowl sperm in the oviduct of domestic chicken (<i>Gallus domesticus</i>))
<p>鶏精子は雌卵管の子宮—膣移行部腺腔(UVJ-SST)において長期間にわたって生存し、受精能を有している。これまで鶏精子の卵管における長期生存の仕組みについてかなり報告されているが、UVJ-SSTへ到達する前の精子、すなわち雄性生殖器から射出された精子の生理的機能については殆ど知られていない。本研究においては、雄性生殖器の各部位における精子および射出精子の諸生理的機能を明らかにすると共に、それらの精子とUVJ-SSTとの結合能、さらに卵管子宮部から分泌される子宮液の精子に対する影響などを通して、鶏雌卵管における精子の長期生存機構を追究した。</p> <p>雄性生殖器官の精巣、精巣上体および精管の先端部、中片部、末端部の3部位からそれぞれ採取された精子の生存性について比較すると、<i>in vitro</i> およびSYBR-14/PI蛍光染色による<i>in vivo</i> (卵管内)実験のいずれにおいても精巣精子が最も短く、精巣上体精子は精巣精子に比べて長く($P<0.05$)、精管精子はいずれの3部位においても精巣精子および精巣上体精子に比べて長かった($P<0.01$)。精管の3部位で比較すると、末端部の精子が最も長い生存性を示した。また、これらの傾向</p>	

は受精率においても同様に、精管精子、精巢上体精子、精巢精子の順に高い値であった。精子の運動性、先体酵素活性および膜透過性はいずれも精巢、精巢上体、精管の先端部、中片部、末端部の順にそれらの値が増加した($P<0.05$)。さらに、これらの部位から採取された精子の一定量を雌生殖道に注入した後、UVJ-SSTの上皮細胞に結合する精子数についてDAPI蛍光染色法で調べたところ、その結合数は精巢精子、精巢上体精子、精管内精子の順に高い値を示した($P<0.05$)。精管内精子と射出精子との比較では結合数に有意な差は認められなかった。

次に、産卵鶏の卵管子宮部における分泌相を非分泌、プランピング液分泌、および高カルシウム液分泌の三相に大きく分類し、これら各相において膈内に人工授精を施した後、UVJ-SSTにおける精子侵入率、侵入精子の生存期間、および人工授精後に放卵された受精卵数について調べた。その結果、プランピング液相で人工授精されたときのUVJ-SSTにおける精子侵入率が最も高く($P<0.01$)、次いで、高カルシウム液、非分泌相の順に低くなった。一方、プランピング液25%を含むLake氏液とプランピング液を含まないLake氏液に精子を投入し、4°C下で精子生存期間を調べたところ、プランピング液含有Lake氏液がLake氏液単独より有意に高い値を示した($P<0.05$)。一方、高い産卵率を示す鶏と低産卵率鶏のプランピング液相時に人工授精を施すと、UVJ-SSTにおける精子生存期間および放卵された卵の受精卵数はいずれも高産卵率鶏が低産卵率鶏に比べて高い値を示した($P<0.05$)。

これらの結果から、雌卵管UVJ-SSTにおいて精子生存が延長されるためには、精子が雄生殖器官において活発な運動性の獲得、先体酵素の活性化、膜透過性などの能力を獲得することによって雌卵管UVJ-SSTへの侵入が可能となり、次いで、卵管子宮部から供給される子宮液がUVJ-SST内の精子生存期間の延長および受精能を促進していることが推察された。

以上の結果から、鶏の精子は形成から射精の過程で成熟に伴って受精に必要な種々の能力を獲得し、授精後、雌卵管での長期生存のための生存能力、受精能力及び結合能を獲得することが明らかになった。特に、受精能の高い精子の長期生存のためには、初期の子宮液(プランピング液)が提供する環境と結びつくことが重要であり、このことにより、従来までの鶏精子の低温保存期間の延長と精子性状の向上が可能となる。本研究の成果は、鶏精子の長期生存機構を明らかにすると共に、実用面でも多くの重要な知見を提供している。よって、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として十分に価値あるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	MUSLAH UDDIN AHAMMAD (ムスラ ウッディン アハマド)
審査委員	主査 琉球 大学 教授 川本 康博
	副査 琉球 大学 教授 建本 秀樹
	副査 鹿児島 大学 教授 岡本 新
	副査 佐賀 大学 教授 尾野 喜孝
	副査 鹿児島 大学 准教授 三好 和睦
審査協力者	
実施年月日	平成 24 年 12 月 22 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input type="checkbox"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成24年12月22日の公開審査会において学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。</p> <p>具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	MUSLAH UDDIN AHAMMAD (ムスラ ウッディン アハマド)
<p>質問 1: 鶏精子の成熟にはどれくらいの時間を要すると考えているか?</p> <p>回答 1: 精巣から精管基部まで通過するのに1日から2日を要します。ほ乳類の2週間に比べて極めて早いです。</p> <p>質問 2: 子宮液 (クランピング液) には、カルシウムが 5mM 含まれている。哺乳類の場合、カルシウムは受精能獲得に必要である。しかし、カルシウムがあるとエージングが進行し保存性は低下する。保存性を高めるために、カルシウムフリーの状態にすることが必要である。今回の研究では、鶏精子が長期保存するためには、クランピング液が有効であるとしているが、このカルシウムと長期保存の関係を哺乳類の場合に照らして、どのように説明するか?</p> <p>回答 2: 本研究で明らかになったことは、プランピング液でもカルシウムを含むカルシファイン液でも長期保存が可能であるということです。確かに、アクロゾーム反応において、哺乳類ではカルシウムが重要な働きをしていると考えられています。そのため、鶏のアクロゾーム反応へのカルシウムの影響をハロサイズで比較しましたが、結果は同じ値になりました。このことから、鶏精子のエージングには、カルシウムの影響はないと考えます。また、プランピング液はカルシファイン液を比べると、亜鉛、マグネシウム、カルシウムが低く、浸透圧が高くなっています。このような要因がエージングを抑えると考えています。</p> <p>質問 3: 鶏精子の長期保存性を調べるために、インビトロでは、プランピング液で 10 日間生存しています。しかし、カルシウムを 5mM 含むプランピング液では 5 h, 15mM 含むカルシファイン液では 12~22h となっている。このことを考えると、カルシファイン液を用いた方が長期保存に効果的という結果にはならないか?</p> <p>回答 3: このことについて、実験 6 のところでも述べましたが、プランピング液の分泌時期に人工授精を行うと、受精卵の生産期間、精子の生存性および受精能を最も高めることが明らかになりました。これに対し、カルシファイン液は精子の運動性を高めましたが、長期保存性と言う点では、プランピング液には劣るという結果になりました。</p> <p>質問 4: 哺乳類では精漿があると受精獲得能がなくなるが、鶏の精漿あるいは副生殖腺液を取り除いて人工授精をしている。インビボでの精子の長期保存には、精漿が関与するか否かを検討する必要性はないか?</p>	

回答 4: インビボでは、精子が精漿と共に入っても、子宮—膣移行部腺腔 (UVJ-SST) には精子だけが入り精漿は排出される。このような観点から、精漿は長期保存には関係していないと考えている。しかし、確認のために、一度、実験を行う価値があると考えています。

質問 5: 本研究では、鶏精子は雄性生殖器官で受精能を獲得したことを証明するために、人工授精を行っていますが、この人工授精で雌生殖器官に入った後に受精能を獲得したとは考えられないのか？

回答 5: インビトロでもインビボでも精子の受精能は精巣から精管基部に移動するに伴い受精能が高くなりました。哺乳類と違って、鶏の場合は、雄性生殖器官でのみ受精能を獲得していると判断されます。

質問 6: 精子が雄性生殖器官である程度の受精能を獲得していると考えられるが、もっと直接的に獲得しているか否かを確認するために、体外受精の方法はとれませんか？

回答 6: 鶏の場合、射精後短時間で卵子と結合するため、実際には雌性生殖器官で受精能を付加する必要はないかもしれません。しかし、体外受精の方法については今後検討します。

質問 7: 鶏精子が子宮液によって生存性を高め、長期保存するメカニズムが新知見として提示されているが、逆に、活性の低い精子が侵入してきた時に、それを排除するメカニズムはないか？

回答 7: 受精能力をもつ精子のスクリーニングには、UVJ-SST が重要な役割を持っていると考えていますが、詳細な排除のメカニズムがあるか否かについては不明です。

質問 8: 人工受精された精子が、UVJ-SST から入って、漏斗部-SST に移動して、受精しますが、その間精子は 22 時間生存することになる。運動性をもった精子は徐々に動くのではないかと考える。つまり、精子の成熟の程度の違いが動く順序を決めてはいないか？

回答 8: 鶏の場合、排卵の 30 分前に UVJ-SST から移動した精子は、漏斗部-SST で待機します。すなわち、排卵周期のシグナルを受けた SST の細胞が精子の移動を決めていると考えています。

質問 9: 鶏精子のアクロゾームキャップは卵管壁に結合した後、外れるけれども生きているし、哺乳類のように崩れていない。このような特徴は鳥類に特異的と考えて良いか？

回答 9: そう考えています。