

北里大学大学院獣医学系研究科

論文博士学位論文審査の結果と最終試験及び学力の確認の成績

平成28年2月19日

学位論文題目

雄馬の繁殖生理に関する研究

氏名 菊池 元宏 本務先 北里大学獣医学部・准教授

審査委員 主査 北里大学 教授 渡辺 大作



副査 北里大学 教授 佐々田 比呂志



副査 北里大学 教授 折野 宏一



審査の結果 合格 最終試験の成績 優 学力の確認の成績 合格

論文審査の要旨および担当者

学位申請者	菊池 元宏（北里大学獣医学部・准教授）
学位論文題目	雄馬の繁殖生理に関する研究
担当者	主査 北里大学教授 渡辺 大作 副査 北里大学教授 佐々田 比呂志 副査 北里大学教授 折野 宏一

論文審査の要旨（3,000字以内）

雄馬の繁殖生理をより深く理解し、繁殖能力の判定や疾病の診断の精度をより向上させることを目的として、雄生殖器に直接的な影響を与える男性ホルモンの動態を把握した上で、精漿中に含まれる成分について検討を加えた。

本研究によって得られた成績は以下のように要約される。

1. 内分泌に関する検討

雄馬の血中テストステロン(T)とジヒドロテストステロン(DHT)の日内変動と24時間平均濃度に対する年齢と季節の影響を調べた。11～17歳の雄馬(11～17歳群)では、T濃度は各季節とも明瞭な2つのピークが認められ、第1ピークは昼間、第2ピークは夜間に現れた。第1ピークの出現時刻と日出時の間には有意な相関が認められた。一方、DHT濃度は低値で推移し、明らかなピークはみられなかった。20～21歳の雄馬(20～21歳群)では、T濃度は二相性変化を

示さず、また DHT 濃度は低値で推移し、明瞭なピークはみられなかった。11～17 歳群の両ホルモンの 24 時間平均濃度は夏季が最も高く、秋季が最も低かった。20～21 歳群における T の 24 時間平均濃度は春季が最も高く、秋季が最も低かった。同じ季節について群間の 24 時間平均濃度を比較すると、夏季における 11～17 歳群の T24 時間平均濃度が 20～21 歳群より有意に高かった。しかし、それ以外では有意な差は認められなかった。したがって、雄馬の血中 T 濃度は二相性に変動し、その変動は 24 時間平均濃度とともに年齢と季節に影響されるといえる。

2. 精漿無機物に関する検討

精漿の無機物濃度を測定した。測定した Na、K、Cl、Mg、Ca、無機リン(iP)、Fe および Zn のうち、Na には季節差があり、冬季が夏季に比べ高かった。平均濃度の年齢差をみると、K および Ca は 6～10 歳群が 11～15 歳群より、また Zn は 16～24 歳群が他の 2 群より有意に低値であった。精漿 iP および Zn は精子濃度と有意な正の相関を示し、かつ、精液量と有意な負の相関みられた。このことは iP と Zn の由来が副生殖腺ではなく精子形成の場である可能性を示しており、これらの測定が繁殖障害に陥った雄馬の異常部位の診断に有用なことを示している。

3. 精漿蛋白質に関する検討

蛋白質に関しては、SDS-PAGE 法では分子量約 11,600～101,000 の範囲に 25 の蛋白分画が確認され、検体の 90% 以上に出現したものが 11 分画、逆に 20% 以下の検体にしか出現しないものが 5 分画認められた。一方、Native-PAGE 法では最も多いもので 19 分画が確認された。検体の 70% 以上に認められるものが 13 分画あったが、

これらのうち7分画は射精前に分泌される尿道球腺液に認められる分画と一致した。以上のことから、SDS-PAGE および Native-PAGE 法における馬精漿蛋白質の基本的分画パターンを明らかにすることが出来た。

次に、馬精漿蛋白質のうちトランスフェリン(Tf)およびラクトフェリン(Lf)値の季節および加齢に伴う変動を明らかにするとともに、精液性状との相関性について検討を加えた。精漿 Tf 濃度は年齢との間に有意な正の相関を示したが、精子濃度、総精子数、運動精子率、不染精子率など精巢機能や精子の生存性および運動性に関する検査値との間には相関はなかった。精漿 Lf 濃度と年齢との間に相関はなかったが、造精機能を現す精子濃度および総精子数と強い正の相関が見られた。また、精漿 Lf 濃度は未熟精子率と正の相関が見られ、正常精子率および不染精子率との間には有意な負の相関が見られ、精子成熟過程との関連性も示唆された。これらの結果から、精漿 Tf は加齢(老化)の指標となる可能性が、また精漿 Lf は造精機能および精巢上体機能の指標となる可能性が示唆された。

4. 精子運動促進因子に関する検討

馬の精巢上体尾精子は精漿と混合すると運動が促進され、これには精漿に含まれる精子前進運動促進因子が関与していると考えられているが、その物質は特定されていない。そこで馬精漿から様々な成分を抽出し、灌流して得た精巢上体尾精子に添加することで、馬精漿中の精子前進運動促進因子の検討を行った。実験には馬精巢上体尾をスキムミルク液(SM液)で灌流して得た精子を使用した。また、馬精漿は15頭の種牡馬の精漿を混合したものを扱い、これを遠心処理した精漿を馬全精漿(HWsp)として、HWsp から除蛋白精漿分画、

限外濾過による分子量 30,000 以上の分画と 30,000 以下の分画、エーテル抽出による精漿脂質分画および脱脂精漿分画を作製して試験に用いた。灌流した精子に HW_{sp} を添加した陽性対照を、SM 液を添加した陰性対照と比較した結果、全てで ++ 以上の運動性を示す精子率(活発運動精子率)の上昇が見られ、両者に有意差がみられた。これと同様に有意な活発運動精子率の上昇が見られたのは限外濾過分画と脱脂精漿分画であり、精子前進運動促進因子として分子量 30,000 以下の蛋白質が考えられた。さらに分子量を絞り込み、精子の運動性に対する影響を確かめた結果、活発運動精子率の有意な上昇は $\leq 3K$ でも認められた。また、プロテアーゼ処理により精子の運動性の有意な増強は見られず、精子前進運動促進因子が蛋白質である可能性が確認できた。さらに、この効果は加熱処理によっても失活しなかったことから、精子前進運動促進因子は分子量 3,000 以下の熱耐性蛋白質である可能性が示唆されたが、物質を特定することは出来なかった。

以上の結果から、雄馬の繁殖活動も雌と同様に季節変動を伴う事象が多く認められ、繁殖能力の判定や疾病の診断に際してはこれらの特徴を把握することが重要であることが明らかになった。また、馬精子の運動性を直接的に反映する物質は少なく、精漿に含まれている物質のうち精子前進運動促進因子として作用するのは分子量 3,000 以下の熱耐性蛋白質である可能性が示唆された。

本論文において著者が、雄馬の血中テストステロン濃度が二相性に変動し、その変動が年齢と季節に影響されることを明らかにしたことは高く評価できる。精漿無機物の分析では、精漿中無機リンおよび亜鉛濃度は精子濃度と正の相関を示し、雄馬の繁殖障害の診断に有用なことを示唆したことは評価できる。さらに馬精漿蛋白質の

基本的分画パターンを明らかにし、トランスフェリンは加齢(老化)の指標となる可能性が、また精漿ラクトフェリン濃度は造精機能および精巢上体機能の指標となる可能性があることを示したことは評価できる。馬精漿中の精子前進運動促進因子について分子量 3,000以下の熱耐性蛋白質である可能性を明らかにしたことも評価できる。

この研究は雄馬の繁殖生理について季節、年齢の影響を明らかにし、雄馬の繁殖生理の理解および繁殖障害の診断に資するための基礎的研究として新知見を含む重要な報告である。この成果は著者の繁殖学に対する高い学識と真摯な研究姿勢および不断の努力がもたらしたものであり、研究者として十分な資質を備えていると判断した。よって審査員一同は、本論文が博士(獣医学)の学位を受けるに相応しいものと判断し、合格と判定した。

最終試験の結果の 要旨および担当者

学位申請者	菊池 元宏（北里大学獣医学部・准教授）
学位論文題目	雄馬の繁殖生理に関する研究
担当者	主査 北里大学教授 渡辺 大作 副査 北里大学教授 佐々田 比呂志 副査 北里大学教授 折野 宏一

成績：優

最終試験の結果の要旨

審査員一同は、論文提出者に対し、平成28年2月19日、その論文内容および関連事項について詳細な質疑を行った。その結果、論文提出者は博士（獣医学）の学位を受けるに相応しい学識と能力を有するものと認め、優と判定した。

試験（学力確認）の結果の 要旨および担当者

学位申請者	菊池 元宏（北里大学獣医学部・准教授）
学位論文題目	雄馬の繁殖生理に関する研究
担当者	主査 北里大学教授 渡辺 大作 副査 北里大学教授 佐々田 比呂志 副査 北里大学教授 折野 宏一

成績：合格

試験（学力確認）の結果の要旨

審査員一同は、平成28年2月19日、「北里大学大学院獣医学系研究科論文博士の学位に関する取扱内規」第6条第2項 学力確認の方法第1号および第3号の規定に基づき、論文提出者は本学大学院修士課程を修了、同大学院博士後期課程を中退したことを確認、修士課程在学期間中の成績および修了後の研究業績を審査し、第6条第2項第1号による学力の確認をもって学力確認の全部とすることを確定、合格と判定した。

よって、論文提出者は本大学院博士課程修了者と同等以上の学力を有するものと認めた。