

雄馬の繁殖生理に関する研究

菊池 元宏

平成27年度

Study of reproductive physiology in stallion.

Motohiro Kikuchi

2016

目 次

緒 言	1
第1章 雄馬の血中テストステロンとジヒドロテストステロンの日内変動ならび に24時間平均濃度に対する年齢と季節の影響	6
序 論	7
材料および方法	9
1. 供試馬	9
2. 採血計画	9
(1) 採血時期および採血間隔	9
(2) 採血方法	10
3. 末梢血中テストステロンおよびジヒドロテストステロンの測定	10
4. 統計処理	11
5. 実験期間	11
結 果	12
1. 血中テストステロンおよびジヒドロテストステロン濃度の日内変動	12
(1) 11～17歳群	12
(2) 20～21歳群	13
2. 血中テストステロンおよびジヒドロテストステロン24時間平均濃度	13
(1) 11～17歳群	13
(2) 20～21歳群	14
考 察	15
要 約	18
付表・付図	20

第2章 雄馬の精漿中無機物濃度と精液性状との関連性について	26
序 論	27
材料および方法	29
1. 供試馬	29
2. 供試精液と精液検査	29
3. 精漿の無機物濃度の測定	30
4. 統計処理	30
5. 実験期間	31
結 果	32
1. 供試精液の一般性状	32
2. 精漿の無機物濃度	32
3. 各検査項目間の相関	33
(1) 精液の一般性状と精漿無機物濃度の相関	33
(2) 精漿無機物濃度間の相関	34
考 察	35
要 約	38
附表・付図	40
第3章 馬精漿蛋白質の電気泳動による分画	43
序 論	44
材料および方法	45
1. 供試材料	45
2. 精液採取と処理方法	45
3. 実験 I : ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(Native-PAGE 法) による精漿蛋白質の分画	46

4. 実験Ⅱ: Sodium Dodecyl Sulphate-ポリアクリルアミドゲル 電気泳動法(SDS-PAGE)法)による精漿蛋白質の分画	47
5. 実験期間	48
結 果	49
1. 実験Ⅰ	49
(1) 精液の一般性状	49
(2) Native-PAGE 法による精漿蛋白質の分画結果	49
2. 実験Ⅱ	51
(1) 精液の一般検査結果	51
(2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による精漿蛋白質の 分析結果	51
1) 精漿蛋白質の分画結果	51
2) 主要蛋白分画の蛋白濃度の測定結果	52
考 察	53
要 約	55
付表・付図	57
第4章 馬精漿中トランスフェリンおよびラクトフェリンの年齢および季節による 違い並びに精液性状との関連性	66
序 論	67
材料および方法	69
1. 供試馬および供試精液	69
2. 検体の区分	69
3. 精液採取、検査および処理	69
4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE 法)	69

(1) 試薬	69
(2) SDS-PAGE 法	70
5. イムノブロッティング	71
(1) 試薬	71
(2) ウェスタンブロット法	72
6. 精漿中 Tf および Lf の測定	72
(1) 試薬および器具	72
(2) サンドイッチ ELISA	73
7. 蛋白質定量	74
(1) 試薬	74
(2) Lowry 法	75
8. 実施期間	75
9. 統計処理	75
結 果	77
1. 季節区分および年齢区分別精液性状	77
(1) 精液量、精子濃度および総精子数	77
(2) 運動精子率、精子生存指数および不染精子率	78
(3) 精子奇形率、頭部奇形精子率、尾部奇形精子率および 未熟精子率	78
2. SDS-PAGE およびイムノブロッティングの結果	79
3. 季節区分および年齢区分別精漿 Tf 値	80
4. 季節区分および年齢区分別精漿 Lf 値	80
5. 季節区分および年齢区分別精漿蛋白質値	81
6. 精漿 Tf 値、精漿 Lf 値および精漿蛋白質値と精液性状との関係	81
(1) 精漿 Tf 値と精液性状との関係	81

(2) 精漿 Lf 値と精液性状との関係	82
(3) 精漿蛋白質値と精液性状との関係	83
7. 精漿 Tf 値、精漿 Lf 値および精漿蛋白質値の関係	83
考 察	84
要 約	88
付表・付図	91
第5章 馬精漿中精子前進運動促進因子に関する研究	100
序 論	101
材料と方法	103
1. 供試動物	103
2. 実験用ウマ精子の調整	103
(1) スキムミルク液の調整	103
(2) 灌流方法と灌流精子の処理	104
3. 灌流精子の性状検査	104
4. 精漿の処理	105
(1) 馬の精漿蛋白質画分および除蛋白質画分の作製	106
(2) 馬精漿の限外濾過処理画分の作製	106
(3) 馬の精漿脂質画分および除脂質画分の作製	107
(4) 精漿のプロテアーゼ処理試料の作製	108
(5) 精漿の加熱処理試料の作製	108
5. 精漿添加実験	109
(1) 馬精子の運動性に対する精漿蛋白成分の影響	109
(2) 馬精子の運動性に対する精漿脂質成分の影響	110
(3) 馬精子の運動性に対するプロテアーゼ処理精漿の影響	110

(4) 馬精子の運動性に対する加熱精漿の影響	110
結 果	111
1. 実験に用いた精巢上体尾灌流精子の性状	111
2. 馬精子の運動性に対する処理精漿添加の影響	111
(1) 馬精子の運動性に対する精漿蛋白成分の影響	112
1) 馬精漿蛋白画分(Prsp)および馬精漿除蛋白画分 (PrFsp)の添加	112
2) 馬精漿の限外濾過処理画分の添加	112
(2) 馬の精漿脂質画分(Fsp)および除脂質画分(FFsp)の影響	113
(3) 馬精漿の限外濾過処理画分(≦10K および≦3K)添加の影響	114
1) 精子提供馬 I~P の陰性および陽性コントロールに対する反応	114
2) 馬精漿の限外濾過処理画分の添加	115
(4) 馬全精漿のプロテアーゼ処理試料の影響	116
(5) 馬全精漿の加熱処理試料の添加	116
考 察	118
要 約	121
附表・付図	123
引用文献	134
謝 辞	148

緒 言

家畜の繁殖は個体数を増やすことと同時に、それぞれの家畜における育種・改良を念頭に置いて実施されてきた。優れた形質を持つ雄畜を多数の雌畜に交配させれば雄畜側からの家畜改良が促進されるため、多くの家畜種で人工授精が応用されてきた。その効果として、わが国で人工授精が最も普及している乳牛では、1頭あたりの年間平均乳量が最近50年間で5,000 kg増加したことを金川[46]が報告している。

本邦での人工授精に関する研究は馬を対象に行ったものから始まったが[117]、現在馬に関しては肉用馬や乗用馬の一部で人工授精が行われているに過ぎない。第2次世界大戦後、使役馬が急減したことにより、戦前は一時150万頭を越えたわが国の馬飼養頭数が[55]、現在は7万5千頭前後となりその大多数を競走馬が占めている。競走馬の血統登録は閉鎖式であり、繁殖方法として自然交配だけを認めているため人工授精による産駒は競走馬としては登録できない[42]。そのため、人工授精に関する研究も行われず、牛に比べ精子や精漿に関する知見も乏しい状況にある。

馬は季節繁殖動物であり、雌では長日期に卵巣機能が活発となって発情が発現し、短日期に至るとその機能は休止状態となる。しかし、雄馬では精液の採取が周年可能であり、短日期になっても精巣機能が休止状態となることはない。雄においても繁殖機能は視床下部－下垂体－性腺軸が主体となって制御されているが、その内分泌機能の評価を行う場合に指標として用い

られているのは末梢血中のテストステロン値である[78]。性成熟後の雄個体での主なテストステロンの生理作用は、FSHと共同して減数分裂の後半以降の精子形成を正常に維持すること、精巢上体内精子の成熟促進と精巢上体尾部精子の生存期間を延長すること、および雄の副生殖器の発育増殖を促進し、その機能を刺激することである[29]。従って、テストステロンは造精機能と精漿の産生の両方に影響を及ぼす非常に重要な物質であることは言うまでもない。雄畜の精巢由来のステロイドホルモンに関しては、ヒト[11, 87, 89, 93]、赤毛猿[26, 92]、牛[48]、羊[113]、ラット[6]および馬[8, 14, 24, 53, 54, 98, 108-110]などの血中テストステロンについて研究がなされているが、日内変動の存在についても意見の一致を見ていない。

雄馬の繁殖能力には各個体に固有な受精能力、栄養、年齢、健康状態、季節、性行動や品種など様々な要因が影響するが[81]、Pikett[85]およびPikettら[86]は季節、精巢の大きさ、年齢、射精頻度が精液性状に最も重要な影響を与える要因として挙げている。この要因の中で季節に関する報告では、冬期（非繁殖期）は夏期（繁殖期）に比べ性欲の減退、射出総精子数の減少、および精子運動性の低下が見られることをMagistriniら[60]が報告している。また西川ら[80]は、冬期は夏期に比べ精子奇形率は少ないと報じている。精巢の大きさに関しては、精液量および精子数が相関するとする報告[85]と、精液性状とは相関性がみられないとする報告[97]がなされている。年齢に関する報告では、2才から16才の44頭の雄馬での結果として、膠様物量、全精液量、精子濃度や精子運動性の全てにおいて年齢

が高いほど増加するとする報告が見られる[85]。また、射精頻度に関しては、射精頻度の増加が精子濃度および射出総精子数の減少を招くことを西川[80]が報告している。さらに、たとえ1日1度の採精でも、連日長期にわたれば精子濃度、精子数が漸減するため、精液性状の維持には適当な休養をとることが望ましいとしている。これらの報告から、雄馬の繁殖能力を評価する際には精子の運動性に影響を与える要因として季節と年齢の影響を考慮する必要がある、造精機能に影響を与える要因としてはさらに精巣の大きさと射精頻度を考慮しなければ、正しい判定が出来ないものと考えられる。

精液は細胞成分である精子と、液状成分である精漿に分けられる。精漿は精子を輸送する媒体としての役割を果たすが、それ以上に精子を取り巻く環境そのものであって、生存性や運動性に大きく影響し、受精が成立する過程で重要な役割を担っている[16, 57, 62, 64, 94]。精漿中に含まれる代表的なものとして果糖をはじめクエン酸、ソルビット、イノシット、グリセロリン酸コリン、エルゴチオネインなどが挙げられるが、この外に無機物および各種蛋白質も含まれている[67]。その中でも果糖およびクエン酸は、精巣アンドロジェンの分泌状態を判定する指標として実用的価値が高く、実際に雄牛で日常の精液検査に応用されている[65]。しかし、その一方で無機物および蛋白質に関しては、それほど関心が持たれていないのが現状である。

精漿中イオンの役割をみると Na^+ は Cl^- とともに浸透圧の維持に役立ち、 Mg^{2+} は精子の運動性、生存性に保護的に働き、 K^+ は精子の呼吸、解糖および活力の維持に役立つと言われている。

一方、 Ca^{2+} は古くから精子の代謝、活力、生存率に対し有害といわれ、また Fe^{2+} や Cu^{2+} などの重金属イオンは精子の運動性、生存性を阻害することが知られている[65, 73, 115, 116]。

一方、精漿の蛋白質には、主に精嚢腺、前立腺および尿道球腺から分泌されたもののほかに、量的にはわずかであるが精巣上体、精管（精管膨大部）および精巣から分泌されたものや精子から漏出したものが含まれる[81]。実際に精子成分の中で、ヒアルロニダーゼやチトクロームCなどが精子の老化に伴って精漿中に移行し[62]、また、細胞質滴の酵素蛋白質は特に漏出しやすいといわれている[32]。これらの中で、造精機能や精子の運動性に関連するもの、あるいは疾病に関連して増減する物質が有れば、疾病や能力の判定を行う上で有用なものとなり得ると思われる。

医学領域では、Nylander[83]が副生殖腺に障害が発生すると精漿蛋白質の組成が変化すると報告したのを契機に、精漿蛋白質に関する研究が進められてきた。近年、電気泳動法の進歩を背景として、蛋白質の研究が目覚しく発展した。この結果、原ら[31]は精漿蛋白質中に特異抗原(γ -Sm)を発見し、さらに蒲池・石橋[44]によってその蛋白質が前立腺癌の診断マーカーとして利用できるると報告されるまでに至った。また、原は γ -smが法医鑑識上の精液確認マーカーとして利用できることも報告している[30]。 γ -sm以外でも、藤井らは男性不妊症における精漿蛋白質の分析に関する報告をしている[22]。

一方、家畜の精漿中に含まれる蛋白質に関する報告は牛を対象にしたものが多く、アクロシン抑制因子、セミナルプラスミ

ン、精子前進運動タンパク質、酸性タンパク質などに関するものが見られ、この他にもインヒビン活性をもつペプチドや各種酵素が含まれているという報告も見られる[67,71]。しかし、馬精漿蛋白質に関する研究は数少なく、古くはSzumowski & Stober[106]が蛋白分画像とその比率を報告したにとどまっております、近年においてもAmannら[2]による凍結・融解後の精子の運動性と精漿蛋白質の関連性を追究した報告がみられるが、精子の運動性に影響を与える蛋白質は特定されていない。

本研究では、上記の様な現状をふまえ、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。第1章では雄馬の末梢血中テストステロンとデヒドロテストステロンの測定を行い、日内変動の有無と、馬精子の運動性に影響を与える要因である季節および年齢の影響に関して検討を加えた。第2章では馬精漿中の8種類の無機物について濃度を測定し、精液性状との関連性を検討した。第3章では精漿蛋白質の分画をポリアクリルアミドゲル電気泳動法で行い、各分画蛋白質濃度と精液性状との関連性の有無を検討した。さらに、第4章では精漿蛋白質のうち鉄結合蛋白質であるトランスフェリンとラクトフェリンについてELISA法を用いて正確な濃度を測定し、精液性状との関連性を検討した。第5章では、馬精漿に含まれる精子前進運動促進因子を特定すべく、精巢上体尾精子の運動性に対する精漿から分画した各成分の影響を観察した。

第1章

雄馬の血中テストステロンとジヒドロテストステロンの
日内変動ならびに24時間平均濃度に対する年齢と季節の影響

序 論

全ての動物は生体恒常性(homeostasis)を備えており、器官の機能が亢進したときは抑制し、低下したときは促進するというような自動調節が行われている。この調節機構には、自律神経系による神経性調節と、ホルモンをはじめとする体液性調節が関与している。

しかし、ある種のホルモン分泌パターンは、homeostasisに基づく調節機構とは異なる独自のリズムで日周期的変化を示すことが報告されている[45]。このようなホルモンの日内変動は1943年にPincus[87]がヒトの17-ケトステロイドの尿中排泄パターンに日周期性を発見したことに始まり、その後のホルモン測定技術の進歩とともにさまざまなホルモンの日内変動のあることが明らかとなった。

ホルモンの日内変動は、体内に存在する体内時計によって生じるが、このリズムは外部の環境に同調しやすく、周期的に変化する光、温度、睡眠、摂食、音などが同調因子として挙げられる[59,75]。副腎皮質ホルモンは日内周期を示す代表的なホルモンで、その周期は明暗周期に同調している[6,23,34]。また日内変動を示すその他のホルモンとしては、成長ホルモン(GH)、プロラクチン(PRL)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)などが挙げられている[88,96,107,112]。

雄畜の精巣由来のステロイドホルモンに関しては、ヒト[11,89,93]、赤毛猿[26,92]、牛[48]、羊[113]、ラット[6]などの血中テストステロンについて研究されているが、日内変動の存在については、賛否両論が交錯しており、現在までのところ定説はない。

一方、雄馬の末梢血中テストステロンに関しても、日内変動および季節変動に関する研究がなされている。季節変動に関しては繁殖季節の方が非繁殖

殖季節よりも有意に高いという報告[8,14,24,53,87,109,110]と、両者の間に有意差を認めないという報告がある[108]。また日内変動についても、1日に1つの頂値を持つ一相性の変化を示す報告[54,98]と、一日に2つの頂値を持つ二相性の変化を示すという報告がある[14,24,107]。このように雄馬の末梢血中テストステロンの日内変動についても、他の動物と同様に明確にはされておらず、その変動パターンや、頂値を形成する時間も報告者によりまちまちである。

そこで本章では、季節別に雄馬の末梢血中テストステロンとジヒドロテストステロン濃度の日内変動を調べるとともに、その季節差および年齢差についても検討を加えた。

材料および方法

1. 供試馬

北里大学獣医畜産学部附属農場繋養のサラブレッド4頭(K1~K3、K5)とアングロアラブ1頭(K4)および七戸町内H牧場繋養のサラブレッド1頭(H1)の計6頭の雄馬を供試した。供試馬の実験開始時の年齢は明け11~21歳、体重は450~550 kgであり、それらの詳細は表1に示した。

供試馬 K1~K5 は 3.4×2.5 m または 3.4×3.4 m の馬房に藁を敷いて個別に飼育した。また、月曜日を除く毎日 6:30 または 7:30 から約 1~2 時間にわたって、曳き運動および騎乗運動をさせた。飼料の給与の詳細は表 2 に示したが、1頭につき、1日当たりヘイキューブ約 8 kg、濃厚飼料 8.7~15.0 kg を 3 回に分けて給与した。

一方、供試馬 H1 は、運動場(21.1×19.9 m)付きの 3.8×3.5 m の馬房に飼育し、自由に運動させた。飼料給与の詳細は表 3 に示したが、乾草および濃厚飼料を1日当たり合計 6.8 kg を均等に4回に分けて給与した。また、H1 は繁殖季節中(3~7月)に、日に1~2回 7:30 前後または 17:00 前後に試情に使用した。

実験ではこれらの供試馬を年齢別に2群に分け、K1 および K2 を 11-17 歳群、残りの K1~5 および H1 の4頭を 20~21 歳群として取り扱った。

2. 採血計画

(1) 採血時期および採血間隔

採血は、1~2月(冬季)、4~5月(春季)、7~8月(夏季)、10月(秋季)の4季について行った。各季とも各群2~3頭を供用して、1時間間隔で24時間にわたる採血を行った。なお、各群の供試馬採血状況の詳細は表4に示し

た。

(2) 採血方法

採血には、太さ 19 G、長さ 38 mm の注射針を用いて、注射器あるいは加真空採血管(テルモ株)を使用し、頸静脈から採血した。抗凝固剤としてヘパリンナトリウムを用いて1回当たりの採血量を約 25 ml として、採血後直ちに血液を粉砕水中で冷却した。

その後、血液を 5℃ で $1,630 \times g$ 、20 分間遠心して血漿を分離し、血漿はホルモン測定まで -20℃ で保管した。なお、採血時には、供試馬にできるだけストレスを与えないように注意を払った。

3. 末梢血中テストステロンおよびジヒドロテストステロンの測定

血中テストステロンおよびジヒドロテストステロンの測定は、抽出と免疫反応は牧野らの方法 [61] および分離・精製は穂坂らの方法 [37] に準じて行った。すなわち、血漿 0.5~1.0 ml に 10 倍量のエーテルを加えて脂質を抽出したのち、ヘキサン:ベンゼン:メチルアルコール(90:5:5)を溶媒としたセファデックス LH-20(Pharmacia Fine Chemical 社)を用いたカラムクロマトグラフィでテストステロンおよびジヒドロテストステロンを分離・精製した。

使用したカラムは、溶媒に1晩以上膨潤させ、2 ml の脱気したセファデックス LH-20 を、改良した内径 6.7 mm のツベルクリン用注射筒に充填して使用し、溶出液量 8 ml から 12 ml までの 4 ml をジヒドロテストステロン、溶出液量 12.5 ml から 18.5 ml までの 6 ml をテストステロンの測定に用いた。

次に、それぞれの溶出液にテストステロン- 3H あるいはジヒドロテストステロン- 3H を 10,000 dpm を添加後蒸発乾固させた。その後、テストステロンおよびジヒドロテストステロン測定用サンプルの両方にそれぞれテストステロン抗血清 0.25 ml を加え、4℃ で一昼夜反応させたのち、50%(NH₄)₂S₄ で遊離型標

識テストステロンを分離し、その放射能を液体シンチレーションカウンター (LSC-651 型アロカ株) で測定した。

テストステロンおよびジヒドロテストステロン値は測定値からテストステロン- ^3H の結合率を求め、標準曲線より算出した。

なお、使用したテストステロン- ^3H は testosterone, [1,2,6,7, $^3\text{H}(\text{N})$] (New England Nuclear 社)、ジヒドロテストステロン- ^3H は dihydrotestosterone, [1,2,4,5,6,7, $^3\text{H}(\text{N})$] (New England Nuclear 社)、テストステロン抗血清は Testosterone-3-CMO-BSA に対する家兎血清であった。

4. 統計処理

テストステロン値およびジヒドロテストステロン値の季節間および個体間の検定は t -検定によった。

5. 実験期間

本実験の採血は、1987年1月から1988年10月にわたり実施した。

結 果

1. 血中テストステロンおよびジヒドロテストステロン濃度の日内変動

(1) 11～17 歳群

血中テストステロンおよびジヒドロテストステロン濃度の日内変動を、季節別に図1に示した。なお、春季は2例、その他は3例の平均値である。

テストステロン濃度の日内変動は、4季節とも2つのピークが観察され、二相性変化を示した。すなわち、第1のピークの出現時刻は、冬季および春季が16時、夏季が10時および秋季が12時で、いずれも昼間に観察された。また、ピーク形成時のテストステロン濃度は冬季が0.76 ng/ml、春季が0.79 ng/ml、夏季が0.84 ng/ml および冬季が0.88 ng/ml で、季節間に差は認められなかった。第2のピークは、春季および夏季では22時、秋季では1時に出現し、いずれも夜間に観察された。しかし、冬季では24時から2時まで高値を保ち、他の3季のような明瞭なピークが形成されなかった。ピーク形成時のテストステロン濃度は冬季が0.66 ng/ml(24時から2時までの間の最高値)、春季が0.80 ng/ml、夏季が1.54 ng/ml および秋季が0.66 ng/ml で、夏季が最も高く、冬季および秋季に低い傾向が認められた。しかし、これらの差は統計学的に有意なものではなかった。

個々の供試馬のテストステロン濃度のピーク出現時刻と採血開始日の日出時、日没時および日照時間について相関関係を検討したところ、第1ピーク出現時刻は日出時との間に $r=0.69$ の有意な正の相関関係が認められた ($p<0.05$)。しかし、第2ピーク出現時刻は日出時、日没時および日照時間との間に有意な相関関係は認められなかった。

ジヒドロテストステロン濃度は、4季節ともテストステロン濃度に比べ低値で推移し、明瞭なピークは観察されなかった。しかし、不明瞭ながらテストステロ

ン濃度に同調する傾向がみられ、テストステロン濃度のピーク形成前後にわずかな増減が観察されるものが多かった。

(2) 20～21 歳群

血中テストステロンおよびジヒドロテストステロン濃度の日内変動を、季節別に図2に示した。なお、冬季は2例、その他は3例の平均値である。

テストステロン濃度には明瞭な二相性変化を示した季節はなかった。冬季におけるピークは17時にみられただけで、個体ごとにみても夜間に明瞭なピークを形成したものはなかった。春季は冬季に比べてテストステロン濃度の変動幅が大きかったが、明瞭なピークは11時に観察されただけであった。個体ごとにみると、3例のうち二相性変化を示したものが2例あったが、ピークの出現時刻がかなりばらつく傾向があった。夏季および秋季のテストステロン濃度の変動には明瞭なピークは観察されなかった。個体ごとにみると、夏季の3例のうち1例は15時と3時にピークが出現し、二相性変化を示したが、他の2例は変動幅が小さく、明瞭なピークは観察されなかった。また、秋季の3例はいずれもテストステロン濃度が0.6 ng/ml以下で推移し、このうち2例でピークが観察されたが、その出現時刻に一定した傾向は認められなかった。

ジヒドロテストステロン濃度は11～17歳群と同じようにテストステロン濃度よりも低値で推移したが、変動幅はかなり狭く、ほぼ一定した値を保つ傾向があった。

2. 血中テストステロンおよびジヒドロテストステロン 24 時間平均濃度

各季節におけるテストステロンとジヒドロテストステロンの24時間平均濃度を図3に示した。

(1) 11～17 歳群

テストステロン 24 時間平均濃度は、冬季が 0.47 ng/ml、春季が 0.45

ng/ml、夏季が 0.61 ng/ml および秋季が 0.35 ng/ml で、夏季に高く、秋季に低かった($p < 0.01$)。一方、ジヒドロテストステロン 24 時間平均濃度は、冬季が 0.25 ng/ml、春季が 0.21 ng/ml、夏季が 0.26 ng/ml および秋季が 0.14 ng/ml で、テストステロン 24 時間平均濃度と同様に夏季に高く、秋季に低い値が得られた($p < 0.05$)。

(2) 20～21 歳群

テストステロン 24 時間平均濃度は、冬季が 0.48 ng/ml、春季が 0.54 ng/ml、夏季が 0.35 ng/ml および秋が季 0.25 ng/ml で、11～17 歳群と異なり、春季が最も高く、最も低い秋季との間に有意差が認められた($p < 0.05$)。また、各季節の値を 11～17 歳群と比較すると、夏季における 20～21 歳群のテストステロン 24 時間平均濃度は、11～17 歳群に比べて有意に低い値を示したが($p < 0.05$)、他の季節に差はみられなかった。一方、ジヒドロテストステロン 24 時間平均濃度は、冬季が 0.23 ng/ml、春季が 0.20 ng/ml、夏季が 0.17 ng/ml および秋季が 0.17 ng/ml で、テストステロン 24 時間平均濃度と同様に、冬季と春季に比べ、夏季と秋季の値がやや低い傾向が認められた。

考 察

雄畜のアンドロジェンの大部分は、精巣に由来するものであるが、その分泌は常に一定の割合で行われているのではなく、生体内に存在する体内時計によって、日内周期を示すことが明らかになってきた。

これまで、テストステロン分泌の日周性に関しては、ヒト[93]、赤毛猿[92]、牛[48]、羊[113]、山羊[74]、ラット[6]などで日内変動が存在すると報告されている。しかし、動物種により変動のパターンや濃度の増減する時間は異なっている。例えば、牛[48]、羊[113]、山羊[74]では、変動幅の大きい律動的なパターンを示すと報告されているのに対して、ヒトでは比較的緩やかなパターンを示すと報告されている。

馬のテストステロンの日内変動については、Cox ら[17]によってはじめて報告されて以来、数人の研究者が3～13歳の雄馬を用いて研究を行っている。それらの報告はテストステロン濃度の日内変動の特徴から二分される。すなわち、Sharma[98]や Kirkpatrick ら[54]が示す一相性という報告と Cox ら、Byers ら、Ganjam [14,17,24]による二相性の報告である。

一相性を示した報告では、最高値が8時に、最低値が20～0時に現われるとしているのに対して、二相性を示した報告では、ピークの出現時間が報告者により異なっている。すなわち、第1のピーク出現時間は、Cox ら[17]は10～11時、Ganjam[24]は9時、Byers ら[14]は14～17時、また第2のピークはそれぞれ15～16時、2時、22～1時であると報告している。

本研究では、11～17歳群におけるテストステロン濃度の日内変動は二相性変化を示し、第1ピークは冬季と春季では16時、夏季では10時および秋季では12時に現れた。第2ピークは、第1ピークに比べて不明瞭であったが、冬季では0時、春季と夏季では22時、秋季では1時に現れた。第1ピークの

出現時刻は季節に伴って変化していることから、先人の行った日内変動に関する報告に開きがあったのは、調査時期に対して十分な注意を払わなかったためと考えられた。

季節に関連させてピークの出現時間を検討した報告はこれまで見当たらない。前述のとおり、本研究の11～17歳群で得られた第1ピークの出現時間は、季節によって異なっていたが、日出時との間に有意な相関が認められた。したがって、第1ピークは季節により変動する明暗周期に同調することが示唆され、長日になるにつれて、ピークが前方へ移動すると考えられた。第2ピークについては、季節間の変動があまりなく、ほぼ一定した時間に出現し、日出時、日没時、日照時間との間に有意な相関は認められなかった。したがって、第2ピークは第1ピークのように明暗周期には左右されず、雄馬自身の持つ周期性にしたがって出現する可能性があるものと考えられた。

一方、テストステロン濃度と季節との関連については、多くの研究者が非繁殖季節に比べ、繁殖季節の方が有意に高いと報告している。しかし、Thompsonら[108]は供試した4頭のうち2頭について季節間のテストステロン値に有意差がなかったと述べ、季節間の変動に対して否定的な結果を示している。本研究の結果は、前者と意見を同じくした。すなわち、年齢を問わず本邦の非繁殖季節にあたる秋季のテストステロン24時間平均濃度が最も低く、繁殖季節にあたる11～17歳群では夏季、20～21歳群では春季の値が秋季に比べ有意に高かった。なお、わが国における軽種馬の繁殖季節は便宜上、3～7月とされているが、実際には2月中旬より8月中旬にわたっていることから、冬季は非繁殖季節から繁殖季節への移行期であると考えられ、冬季が春季および夏季との間に有意な差がなかったものと理解された。

これまで、老齢馬のテストステロンおよびジヒドロテストステロン濃度の変動について検討した報告はない。本研究の20～21歳群では、テストステロン濃

度の変動パターンが11～17歳群と明らかに異なっていた。すなわち、20～21歳群ではピーク出現時刻が一定せず、また不明瞭となる傾向がみられた。特に、夏季および秋季はその傾向が著しく、明瞭なピークを形成しない個体も観察された。これらの原因が、体内時計にあるのか、あるいは精巢のアンドロゲン分泌機能にあるのか、本研究の結果からは考察できなかった。

以上のように、本研究に供試した雄馬の血中テストステロン濃度は、11～17歳のものでは二相性の日内周期を有し、季節によって濃度および第1ピーク出現時間に変化することが明らかとなった。また、20～21歳のものでは季節間に有意な濃度差は認められたが、二相性の変化は不明瞭となる傾向のあることが示された。

要 約

本研究では、雄馬の末梢血中テストステロンの日内周期を明らかにすると同時に、季節変動および年齢差との関連性を知る目的で、11～17歳群と20～21歳群の馬について冬季、春季、夏季、秋季の4季に1時間間隔で24時間にわたって採血し、テストステロン値およびジヒドロテストステロン値を測定した。

1. 血中テストステロンおよびジヒドロテストステロン濃度の日内変動

(1) 11～17歳群

テストステロン濃度の日内変動は、4季節とも2つのピークが観察され、二相性変化を示した。第2のピークは昼間に観察され、その濃度は季節間に差は認められなかったが、ピーク出現時刻は日出時との間に有意な正の相関関係が認められ($p < 0.05$)、季節に伴い出現時刻が変動することが明らかになった。第2のピークはいずれの季節も夜間に観察されたが、冬季では不明瞭なものであった。第2ピーク出現時刻は日出時、日没時および日照時間との間に相関関係は認められなかった。ピーク形成時のテストステロン濃度は夏季が最も高く、冬季および秋季に低い傾向が認められた。

ジヒドロテストステロン濃度は、4季節ともテストステロン濃度に比べ低値で推移し、明瞭なピークは観察されなかった。

(2) 20～21歳群

テストステロン濃度の変動パターンが11～17歳群と明らかに異なり、20～21歳群ではピーク出現時刻が一定せず、また不明瞭となる傾向がみられた。特に、夏季および秋季はその傾向が著しく、明瞭なピークを形成しない個体も観察された。

ジヒドロテストステロン濃度は 11～17 歳群と同じようにテストステロン濃度よりも低値で推移したが、変動幅はかなり狭く、ほぼ一定した値を保つ傾向があった。

2. 血中テストステロンおよびジヒドロテストステロン 24 時間平均濃度

(1) 11～17 歳群

テストステロン 24 時間平均濃度は季節間で差が認められ、夏季(0.61 ng/ml)に最も高く、秋季(0.35 ng/ml)に低かった($p < 0.01$)。また、ジヒドロテストステロン 24 時間平均濃度も同様に夏季(0.26 ng/ml)に高く、秋季(0.14 ng/ml)に低い値が得られた($p < 0.05$)。

(2) 20～21 歳群

テストステロン 24 時間平均濃度は 11～17 歳群と異なり、春季(0.54 ng/ml)が最も高く、秋季(0.25 ng/ml)に低かった($p < 0.05$)。また、ジヒドロテストステロン 24 時間平均濃度は、冬季(0.23 ng/ml)と春季(0.20 ng/ml)に比べ、夏季(0.17 ng/ml)と秋季(0.17 ng/ml)の値がやや低い傾向が認められた。

以上の結果から、雄馬の血中テストステロンは二相性の日内周期を持って変動し、しかも、季節によって濃度の変化ばかりでなく、第1ピークの出現時間も変化することが明らかとなった。したがって、雄馬のアンドロジェンの分泌能を検査する場合は、採血時期に十分配慮する必要があることが示唆された。

表1. 供試馬の年齢および体重

供試馬 番号	品種	明け 年齢	体重 (kg)	繋養場所
K1	サラブレッド	11	520	十和田市北里大学
K2	サラブレッド	17	550	十和田市北里大学
K3	サラブレッド	20	490	十和田市北里大学
K4	アングロアラブ	20	480	十和田市北里大学
K5	サラブレッド	21	500	十和田市北里大学
H1	サラブレッド	20	450	七戸町H牧場

表2. 本学付属農場における給与飼料および給与時間

給与時間	5:00～5:30	12:00～12:30	11:00～17:30
圧べん燕麦 ^{a)}	0.9～1.8kg	0.9～1.8kg	0.9～1.8kg
ふすま ^{b)}	0.2kg	0.2kg	0.2kg
ヘイキューブ	1.8kg	1.8～3.6kg	1.8～3.6kg
乾草	8.0kg	8.0kg	8.0kg

a) 全国農業協同組合連合会製

b) 富士製粉(株)製

表3. 七戸町H牧場における給与飼料および給与時間

給与時間	5:00～5:30	11:00～11:30	16:00～16:30	19:00～19:30
圧べん燕麦 ^{a)}	0.8kg	0.8kg	0.8kg	0.8kg
ふすま ^{b)}	0.2kg	0.2kg	0.2kg	0.2kg
乾草	0.7kg	0.7kg	0.7kg	0.7kg

a) 全国農業協同組合連合会製

b) 日本製粉(株)製

表4. 各供試馬の採血状況

群	供試馬 番号	24時間採血の実施回数			
		冬季	春季	夏季	秋季
11-17 歳群	K1	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a
	K2	2 ^c	1 ^a	2 ^c	2 ^c
20~21 歳群	K3	1 ^a	—	—	—
	K4	1 ^b	1 ^b	1 ^b	1 ^b
	K5	—	1 ^b	1 ^b	1 ^b
	H1	—	1 ^a	1 ^a	1 ^a

a:1987年に実施、b:1988年に実施、c:1987年と1988年に実施

表5. 各季節におけるテストステロンピーク出現時間および明暗条件

季節	供試馬 番号	ピーク出現時間 ^{a)}		日出 ^{a)} 時間	日没 ^{a)} 時間	日照 ^{a),b)} 時間
		第1ピーク	第2ピーク			
冬季	K1	17.0	23.0	6.9	16.5	9.6
	K2	16.0	1.0	6.9	16.5	9.6
	K2	15.0	4.0	6.3	17.3	11.1
	K3	17.0	0.5	6.9	16.5	9.6
	K4	14.0	2.5	6.3	17.3	11.1
	平均	15.8	1.4	6.6	16.8	10.2
春季	K1	16.0	22.0	5.1	18.1	13.1
	K2	15.0	0.0	5.1	18.1	13.1
	K4	17.0	0.0	4.3	18.7	14.4
	K5	11.0	— ^{*)}	4.3	18.7	14.4
	H1	11.0	2.0	4.8	18.3	13.5
	平均	14.0	0.0	4.7	18.4	13.7
夏季	K1	10.0	22.0	4.2	19.1	14.9
	K2	11.0	1.0	4.7	18.6	13.8
	K2	10.0	22.0	4.2	19.1	14.9
	K4	11.0	1.0	4.2	19.1	14.9
	K5	10.0	3.0	4.2	19.1	14.9
	H1	15.0	3.0	4.3	19.1	14.8
	平均	13.4	0.6	4.3	19.0	14.7
秋季	K1	12.0	24.0	5.8	16.9	11.2
	K2	12.0	1.0	5.8	16.9	11.2
	K2	10.0	1.0	5.6	16.1	10.5
	K4	13.0	23.0	5.6	16.1	10.5
	K5	17.0	— ^{*)}	5.6	16.1	10.5
	H1	— ^{*)}	21.0	5.8	16.9	11.2
	平均	12.8	23.8	5.7	16.5	10.8

a)時間は十進法で示した。

b)日出から日没までの時間。

*)明確なピークは認められなかった。

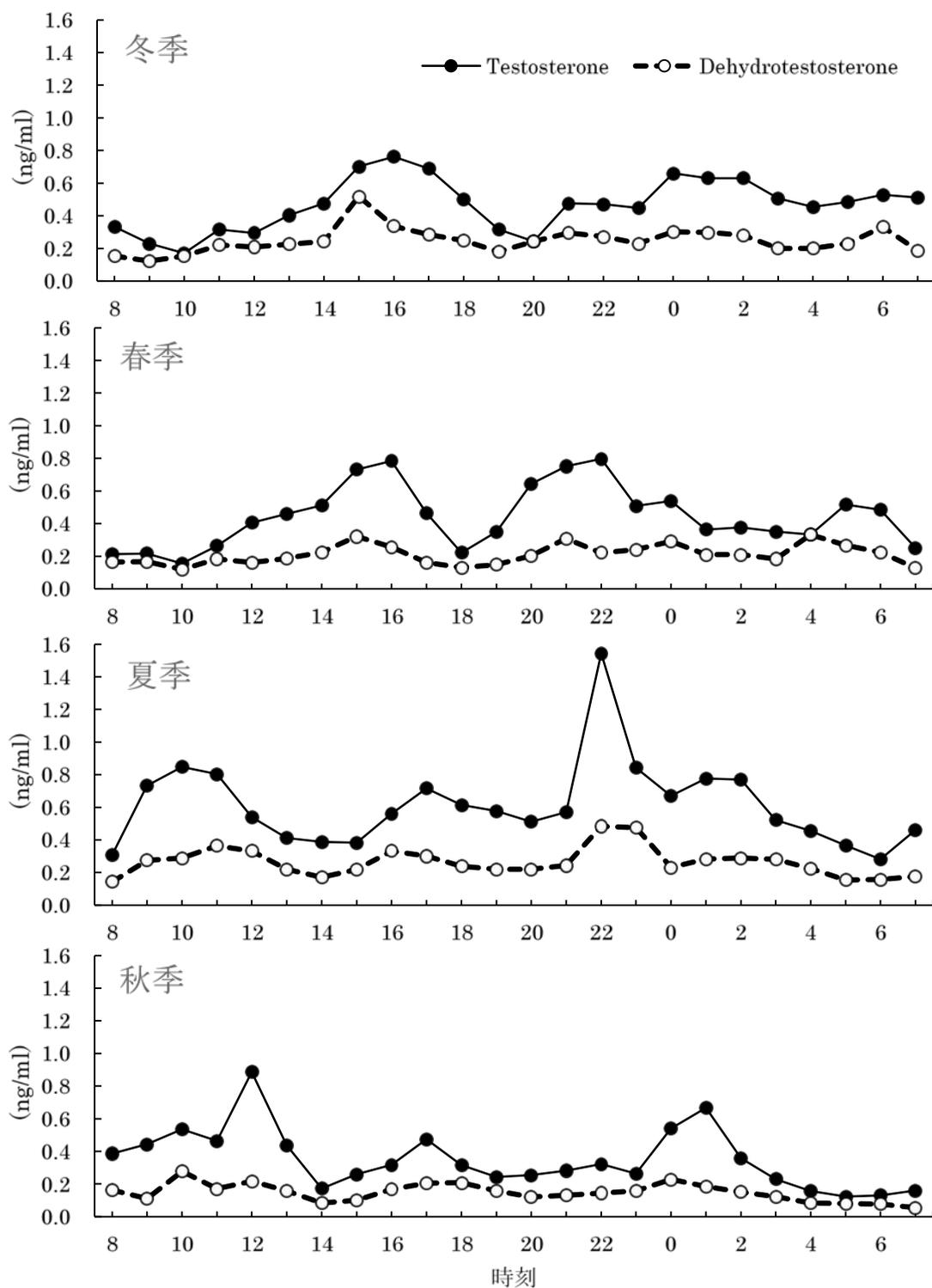


図 1. 11～17 歳群における血中テストステロンおよびジヒドロテストステロンの季節別日内変動

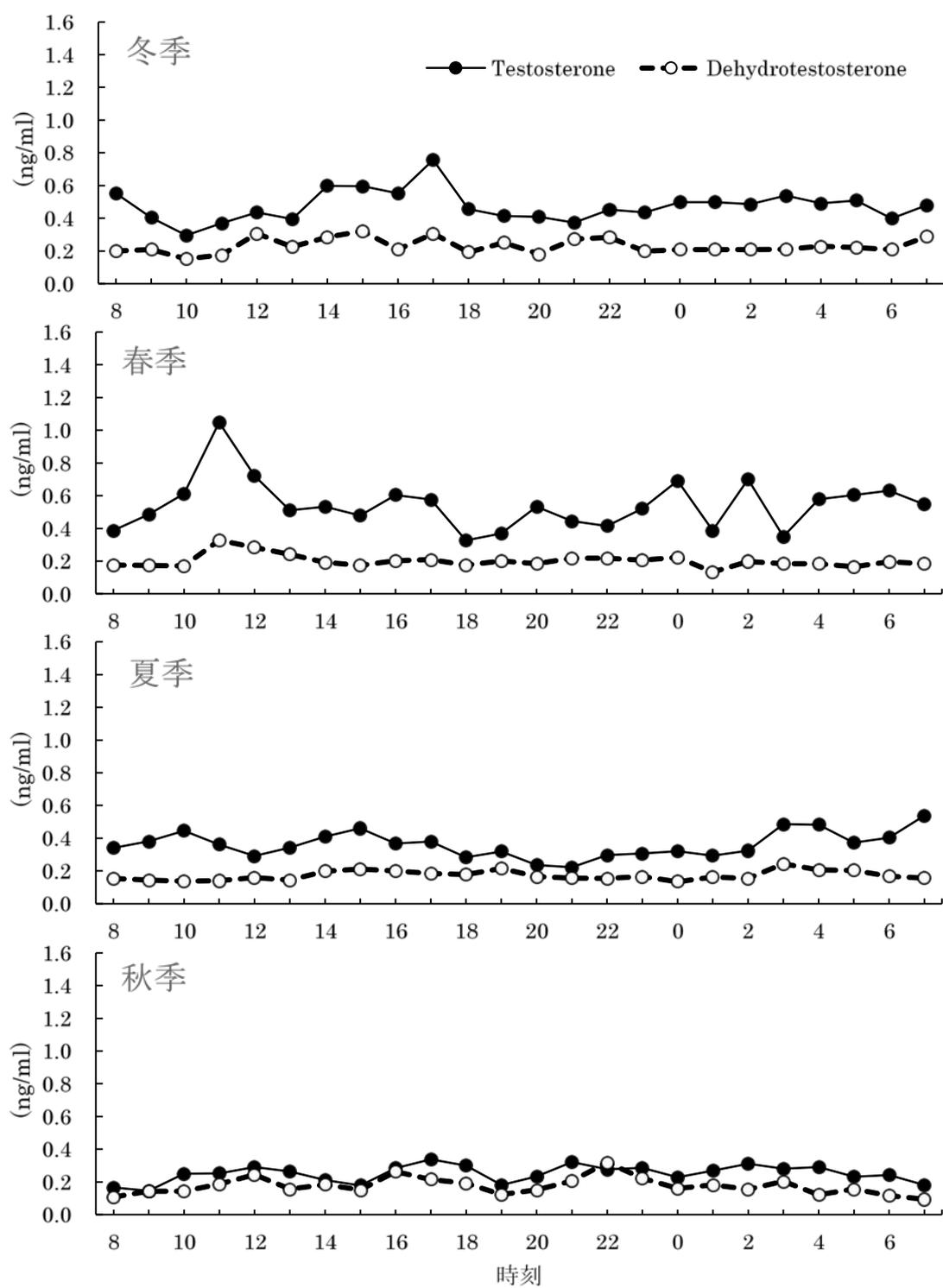


図 2. 20～21 歳群における血中テストステロンおよびジヒドロテストステロンの季節別日内変動

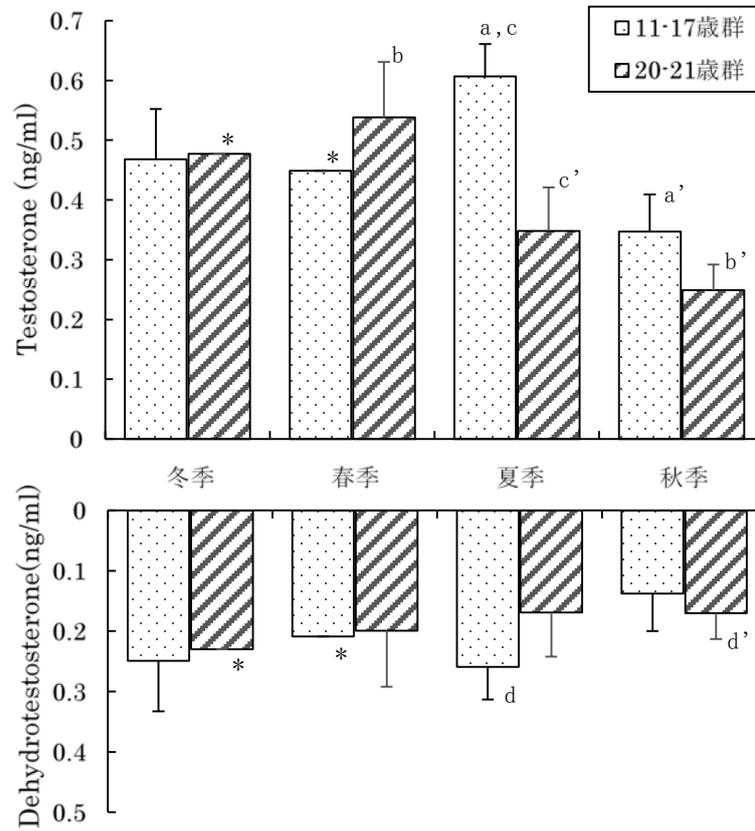


図 3. 血中テストステロンおよびジヒドロテストステロンの季節別 24 時間平均濃度

棒グラフのうち、*は2頭の平均値、その他は3頭の平均値を示す。
 a vs a' : $p < 0.01$, b vs b' , c vs c' , d vs d' : $p < 0.05$

第2章

雄馬の精漿中無機物濃度と精液性状との関連性について

序 論

精子の運動性や生存性は、精液中に含まれる成分によって大きく左右される。精液中には、精子のエネルギー源となる果糖、ソルビット、グリセロリン酸コリンのほかに、pH や浸透圧を調整するクエン酸、塩類などが多く含まれている[65,66,115]。果糖については最も重要な精子エネルギー源として注目され、精液性状の良否および精巣アンドロジェンの分泌状態を判定する指標 [65,99]として日常の精液検査や、繁殖障害雄牛の検査項目として取り上げられている。その一方で、精子の運動や生存に大きく関係する各種の無機塩類が含まれているにもかかわらず、あまり関心が払われていない。

イオンの役割をみると動物種により多少の違いはあるが、概ね次の様なことが報告されている。 Na^+ は Cl^- とともに浸透圧の維持に役立ち Mg^{2+} は精子の運動性、生存性に保護的に働き、 K^+ は精子の呼吸、解糖および活力の維持に役立つ。 Ca^{2+} は古くから精子の代謝、活力、生存率に対し有害といわれ、また Fe^{2+} や Cu^{2+} などの重金属イオンは精子の運動性、生存性を阻害することが知られている[65,73,115,116]。また、 Zn^{2+} は精子の運動性に関与し、精子からの Zn の離脱が精子の運動開始、活性化を引き起こすことが示唆されている[72]。このように重要な役割を果たしているにもかかわらず無機イオンは日常的な精液検査項目に取りあげられていない。その理由は分析の煩雑さに加え、精漿無機物濃度の意義について十分な検討が行われていないためと思われる。

なかでも馬精漿中の無機物濃度は、これまでほとんど研究が行われていないといってよい。精子学で最も権威があるとされている Mann の著書[62]でさえ、Yamane[114]が 1920 年に小数例について行った 7 種類の無機物の分析値が引用されているに過ぎない。その後、馬精漿の無機物に関する報告

はなく、現在行われている無機質分析法によって測定された標準値がない状態である。

そこで本研究は、馬の精液検査に無機物定量を組み入れるための基礎研究として、馬の繁殖期の開始前と終了後に採取した軽種馬の精液について、8種類の無機物を定量するとともに、精液の一般性状と無機物濃度の関連性について解析を試みた。

材料および方法

1. 供試馬

本研究には、サラブレッド種 18 頭およびアングロアラブ種 5 頭の計 23 頭の種雄馬を供試した。供試馬の平均年齢は、13.3 歳(サラブレッド種 14.9 歳、アングロアラブ種 8.4 歳:明け年齢)であった。供試馬の繁養地は北海道、青森、千葉、栃木、福島、九州であった。給与された飼料は各供試馬の健康状態に応じて多少の違いはあるが、基本的には表 1 に示した社団法人日本軽種馬協会による種牡馬管理基準、飼料給与基準日量表にしたがって給与した。

2. 供試精液と精液検査

実験に供試した精液は、発情雌馬を台雌として、西川式改良型人工膺を用い、横取法で採取した。また、各供試馬の射精間隔を揃えるため、精液採取は前回の射精から 7~14 日の間に実施した。採取した 37 精液のうち、20 例は 1~3 月(冬季)、残りの 17 例は 7~9 月(夏季)に採取した。また、精液 37 例のうち、12 例は 6~10 歳(6~10 歳群)、11 例は 11~15 歳(11~15 歳群)、13 例は 16~24 歳(16~24 歳群)の雄馬から採取したものであった。

精液は採取後直ちに精液をガーゼで濾過してから肉眼的検査および顕微鏡的検査を行った。肉眼的検査では、精液量、色調、臭気、pH を検査し、顕微鏡的検査では、精子活力、精子生存率、精子濃度、および精子奇形率を検査した。なお精子活力は農研式精液性状検査板を用いて検査し、精子生存率は運動精子に基づく生存率を求めた。精子濃度はトーマ血球計算盤を用いたメランジュール法、精子奇形率はオルト固定した塗抹標本を緩衝ギムザ染色し、1,000 倍で鏡検して算出した。総精子数および精子生

存指数は前述の検査の結果から算出した。精液は、一般性状検査後できるだけ速やかに室温で 1,630 × g、20 分間遠心して精漿を分離した。分離した精漿は直ちに凍結し、無機物濃度の測定まで-20℃に保管した。また、精漿浸透圧の測定は精漿融解後に行い、氷点降下法を用いたオスモトロン 10(オリオン理研)で測定した。

3. 精漿の無機物濃度の測定

-20℃で保管していた精漿を室温に戻し以下に述べる項目について分析を行った。なお、各検査項目について同試料の測定を3回くり返し、得られた値を平均してその試料の測定値とした。

ナトリウム(Na)およびカリウム(K):炎光光度計 FLAME-30(日本分光メデイカル)。

塩素(Cl):電気滴定法を利用したクロライドカウンターTYPE-6M(平沼製作所)。

マグネシウム(Mg):キシリジルブルー法のマグネシウム B テスト(和光純薬)。

カルシウム(Ca):OCPC 法のカルシウム C テスト(和光純薬)。

無機リン(iP):*p*-メチルアミノフェノール還元法のホスファ C テスト(和光純薬)。

鉄(Fe):バソフェナントロリン直接法の Fe-B テスト(和光純薬)。なお、Fe 濃度は非常に低かったので、12 例について凍結乾燥法で精漿を 10 倍に濃縮したのち測定した。

亜鉛(Zn):5-Br-PAPS 法の Zn テスト(和光純薬)。

4. 統計処理

精漿に関する各測定項目について、スミルノフおよびトンプソンの棄却検

定を行い、棄却の可否を検定した。棄却対象の測定値を除いたのち各項目の季節別および年齢別の平均値を求め、 t -検定を行った。なお、精子生存率および精子奇形率については、個々の百分率を \arcsin 変換し、 t -検定を行った。

5. 実験期間

本実験は、1988年7月から1989年10月にわたって実施した。

結 果

棄却検定の結果、Mgで1例、Feで1例およびZnで2例が棄却対象となったため、以下に示す結果は、これらの数値を除いて算出した。

1. 供試精液の一般性状

全供試精液および季節別精液の一般性状は表2のとおりである。

季節間の変動が最も大きかったのは精液量であった。冬季に比べ夏季が多かったが、両者の間に有意な差はなかった。その他の性状は変動が小さく、季節間に著しい差は認められなかった。

年齢別精液の一般性状は表3のとおりである。

一般に年齢変動は季節変動に比べ大きい傾向があった。それらのうち精子濃度と精子奇形率は16～24歳群(1.63億/ml、19.4%)が特に低く、精子濃度は6～10歳群(2.87億/ml)および11～15歳群(2.97億/ml)との間に、また精子奇形率は11～15歳群(28.7%)との間に有意差が認められた($p < 0.05$)。また、総精子数、精子生存率および精子生存指数は加齢に伴って漸減する傾向がみられ、特に精子生存指数は6～10歳群(70.0)と16～24歳群(57.2)の間に有意な差が認められた($p < 0.05$)。

2. 精漿の無機物濃度

全供試精液および季節別精液の精漿無機物濃度は表4のとおりである。

季節による変動は3つのタイプに大別された。第1は冬季に比べ夏季の濃度の高いタイプで、Mg(冬季7.33、夏季10.18 mg/dl)、Ca(冬季6.81、夏季8.85 mg/dl)、K(冬季19.2、夏季20.5 mEq/l)およびiP(冬季7.94、夏季8.25 mg/dl)がこのタイプに属した。MgとCaは季節変動が大きかったが、有意ではなかった。また、KとiPは変動が小さく、季節差は有意とならなかった。

第2は夏季に比べ冬季の濃度の高いタイプで、Na(冬季 116.9、夏季 107.8 mEq/l)、Cl(冬季 120.1、夏季 113.3 mEq/l)および Zn(冬季 176.3、夏季 153.8 μ g/dl)がこのタイプに属した。それらのうち、Na は季節変動が小さかったが、季節差は有意であった($p < 0.05$)。ClとZnは変動が小さく、季節間の差は有意とはならなかった。第3は季節間の変動がほとんど認められないタイプで、Fe(冬季 5.10、夏季 5.08 μ g/dl)が属した。

年齢別精液の精漿無機物濃度は表5のとおりである。

年齢による変動も3つのタイプに大別された。第1のタイプは16～24歳群が最低値を示すもので、iP(6～10歳群 8.32、11～15歳群 9.40、16～24歳群 6.84 mg/dl)および Zn(6～10歳群 193.9、11～15歳群 184.6、16～24歳群 124.3 μ g/dl)がこのタイプに属した。両者のうち、Znは16～24歳群が6～10歳群および11～15歳群に比べ有意に低かった($p < 0.05$)。第2のタイプは6～10歳群が最低値を示すもので、K(6～10歳群 18.6、11～15歳群 21.5、16～24歳群 19.5 mEq/l)、Mg(6～10歳群 6.41、11～15歳群 11.79、16～24歳群 8.39 mg/dl)および、Ca(6～10歳群 6.08、11～15歳群 9.02、16～24歳群 8.17 mg/dl)がこのタイプに属した。これらのうち、KおよびCaは6～10歳群が11～15歳群に比べ有意に低かった($p < 0.05$)。第3のタイプは年齢による変動が少ないもので、Na(6～10歳群 115.2、11～15歳群 108.1、16～24歳群 114.3 mEq/l)、Cl(6～10歳群 116.4、11～15歳群 112.7、16～24歳群 120.8 mEq/l)および、Fe(6～10歳群 4.99、11～15歳群 4.70、16～24歳群 5.48 μ g/dl)がこのタイプに属した。

3. 各検査項目間の相関

(1) 精液の一般性状と精漿無機物濃度の相関

一般性状と有意な相関が認められた無機物はNa、Cl、Ca、iP、Feおよび

Zn であった。特に iP と Zn は多くの共通した一般性状と相関していた。すなわち、iP と Zn は精子濃度、精子生存率および浸透圧と正の有意な相関がみられ(いずれも $p < 0.05$)、iP の相関係数はそれぞれ 0.39、0.39 および 0.36、また Zn は 0.41、0.42 および 0.42 であった。さらに、両者は精液量との間に有意な負の相関がみられ(iP : $p < 0.05$ 、Zn : $p < 0.01$)、それぞれの相関係数は -0.35 および 0.53 であった。これらのうち、iP および、Zn と精子濃度および精液量の散布図を図 1～4 に示した。なお、iP は精子生存指数 ($r = 0.44$, $p < 0.05$) とも正の相関をした。また、この他の無機物では有意な正の相関が Na ($r = 0.48$) および Cl ($r = 0.52$) と浸透圧 (いずれも $p < 0.01$)、Ca と精液量 ($r = 0.42$, $p < 0.01$) および、Fe と精子生存指数 ($r = 0.66$, $p < 0.05$) の間に認められた。一方、有意な負の相関が Na と総精子数 ($r = -0.33$, $p < 0.05$) の間にみられた。なお、K と Mg は一般性状と有意な相関はなかった。

(2) 精漿無機物濃度間の相関

有意な相関を示したものは Na、K、Cl、Mg、Ca の 5 種類であった。すなわち、正の相関が Na と Cl ($r = 0.88$, $p < 0.001$)、K と Mg ($r = 0.67$, $p < 0.001$)、K と Ca ($r = 0.70$, $p < 0.001$) および、Mg と Ca ($r = 0.67$, $p < 0.001$) の間に認められた。また、負の相関が Na と K ($r = -0.53$, $p < 0.001$)、Na と Mg ($r = -0.49$, $p < 0.01$) および、Na と Ca ($r = -0.50$, $p < 0.01$) の間にみられた。しかしながら、iP、Fe および、Zn は検査したすべての無機物と有意な相関を示さなかった。

考 察

馬の精液性状は季節によって変動する。すなわち、精液量 [35,47,70,81,82] および果糖濃度 [35] は繁殖季節に増加し、非繁殖季節に減少する。また、精子濃度 [70] も繁殖季節に比べ、非繁殖季節が高いとされている。本研究における冬季(1~3月)と夏季(7~9月)の精液量はそれぞれ 43.9ml と 51.1ml で、夏季がやや多かったが、有意な差ではなかった。しかし、これまでの研究によれば精液量が増加する時期は4~7月、また減少する時期は10~2月とされているので、本研究の冬季および夏季はその中間的時期にあたり、そのため両季の精液量に著しい差が生じなかったものと思量される。また、精子濃度も冬季 2.52 億/ml、夏季 2.33 億/ml で大差なく、両者の差は有意ではなかった。その理由も精液量と同様と考えられる。

Mann の著書 [63] には馬精漿中無機物として Yamane の測定値 [114] が引用されている。すなわち、Na 275 mg/dl、K 103 mg/dl、Cl 448 mg/dl、Mg 9 mg/dl および、Ca 26 mg/dl であるという。本研究ではそれぞれ Na 259 mg/dl (112.7 mEq/l)、K 77 mg/dl (19.8 mEq/l)、Cl 415 mg/dl (117.0 mEq/l)、Mg 8.67 mg/dl および Ca 7.75 mg/dl で、Yamane の測定値に比べると Na、Cl および、Mg は大差なかったが、K と Ca に大きな差があった。すなわち、K は Yamane の値の約 75%、Ca は約 30% に過ぎなかった。その原因については本研究から結論することはできなかった。

5歳前後のサラブレッドの血清中無機物濃度は Na 137.2 mEq/l、K 3.7 mEq/l および Cl 106 mEq/l であると報告されている [79]。本研究の精漿中の値は上述のとおりで、血清に比べ、Na はやや低く、Cl はやや高かったが、K は約 5 倍あり、極めて高値であった。すなわち、精漿に含まれる無機物の比率はかなり血清と異なる特徴的なものであった。

本研究で対象とした精漿無機物の中で、Na は季節間の濃度、K、Ca および、Zn は年齢間の濃度に有意な差が認められた。これらの事実は、季節および年齢によって、明らかに精漿無機物濃度が影響されることを示唆している。しかしながら、精液量の増減の著しいとされる春季および秋季について測定を行っていないので、各無機物の季節および年齢変動の有無ならびに変動パターンについては、さらに各季の測定を行ったうえで結論するべきと考える。なお、精液の大部分を産生する副生殖腺の分泌機能は、雄性ホルモンと密接な関係があるといわれているので[65]、季節および年齢変動と血中雄性ホルモン値の関連性を明らかにすることは極めて興味を持たれるところである。

精液の一般性状と有意な相関関係が認められた無機物は、Na、Cl、Ca、iP、Fe および、Zn の 6 種類であった。Na は総精子数および浸透圧、Cl は浸透圧、Ca は精液量、iP は精液量、精子濃度、精子生存率、精子生存指数および浸透圧、Fe は生存精子指数、また Zn は精液量、精子濃度、精子生存率および浸透圧と有意に相関した。特に、iP および、Zn 濃度は精子濃度と正の相関を示し、また精液量と負の相関関係にあり、注目された。精液の大部分は、副生殖腺(特に精囊腺および前立腺)の分泌液なので、精液量は副生殖腺の分泌量を反映すると考えられる。一方、精子濃度は精巢上体尾および精管膨大部に貯蔵されている精子数および射出精子数と正の相関、前述の精液量と負の相関をすると推察される。それらを勘案すると、iP および Zn は精子自体、あるいは精巢、精巢上体および精管の分泌物に主に由来するのではないかと考えられる。本研究ではその分泌源を特定することはできなかったが、上述のことから、iP および、Zn の測定は繁殖障害に陥った動物の異常部位を推定する上で有用といえる。

本研究の結果から、馬精漿中無機物の測定はこれまでの精液検査法で

は知ることのできなかつた精液性状に関する情報が得られる可能性が示唆された。しかし、精液検査法として利用するためには検討が不十分で、今後さらに例数を増やすとともに、各無機物の分泌源とそれらの役割を明らかにする基礎研究と、病症例に関する基礎データを蓄積する必要があると考えられる。

要 約

馬精漿中の無機物の正常値を明らかにするため、明け6～24歳の雄馬23頭(サラブレッド18頭、アングロアラブ5頭)から、人工膣で採取した37例の精液(冬季20例、夏季17例)について、一般性状とともに主な無機物量を測定した。

得られた結果は以下に示すとおりである。

1. 精液の一般検査結果

精液一般正常は季節変動に比べ年齢よる変動が大きい傾向があった。年齢によって3群に分け、各項目を比較すると、精子濃度と精子奇形率は16～24歳群が特に低く、精子濃度は6～10歳群および11～15歳との間に、また精子奇形率は11～15歳群との間に有意差が認められた($p < 0.05$)。また、総精子数、精子生存率および精子生存指数は加齢に伴って漸減する傾向がみられた。

2. 無機物濃度

測定した無機物の平均濃度は、Na 112.7 mEq/l、K 19.8 mEq/l、Cl 117.0 mEq/l、Mg 8.67 mg/dl、Ca 7.75 mg/dl、無機リン(iP) 8.08 mg/dl、Fe 5.09 μ g/dl および Zn 165.4 μ g/dl であった。これらのうち、Naには季節差があり、冬季が夏季に比べ高かった($p < 0.05$)。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($p < 0.05$)。iP および、Zn は精子濃度と有意な正の相関($r = 0.39$, $p < 0.05$ および $r = 0.41$, $p < 0.05$)を示し、かつ、精液量と有意な負の相関($r = -0.35$, $p < 0.05$ および、 $r = -0.53$, $p < 0.01$)がみられた。このことは iP と Zn の測定が繁殖障害に陥った雄馬の異常部位の診断に有

用なことを示唆している。

本研究の結果から、馬精漿中無機物の測定はこれまでの精液検査法では知ることのできなかつた精液性状に関する情報が得られる可能性が示唆された。しかし、精液検査法として利用するためには検討が不十分で、今後さらに例数を増やすとともに、各無機物の分泌源とそれらの役割を明らかにする基礎研究と、病症例に関する基礎データを蓄積する必要があると考えられる。

表1. 給与基準日量表

月	燕麦	ふすま	大豆粕	牧草	その他
1月	4.0	1.0	0.5	8.0	わら 7.0 塩0.05 Ca 0.05
2月	4.5	1.0	0.5	8.0	
3月	5.0	1.5	0.5	6.0	
4月	5.0	2.0	0.5	5.0	
5月	5.0	2.0	0.5	5.0	
6月	5.0	2.0	0.5	5.0	
7月	3.0	1.0		8.0	
8月	3.0	1.0		8.0	
9月	3.0	1.0		8.0	
10月	3.5	1.0		8.0	
11月	4.0	1.0		8.0	
12月	4.0	1.0	0.3	8.0	

単位: kg

表2. 供試精液の性状(全体および採取季節別)

項目	季節	全体			冬季(1~3月)			夏季(7~9月)		
		例数	平均値	SD ¹⁾	例数	平均値	SD	例数	平均値	SD
精液量(ml)		37	47.2	23.5	20	43.9	24.4	17	51.1	21.7
精子濃度(億/ml)		37	2.43	1.58	20	2.52	1.74	17	2.33	1.35
総精子数(億/射精)		37	106.3	69.7	20	104.5	80.1	17	108.4	54.9
精子生存率(%)		33	83.6	2.3	19	85.4	2.1	14	81.2	2.6
精子生存指数		33	63.8	16.6	19	66.5	16.3	14	60.2	16.4
精子奇形率(%)		35	23.7	1.5	20	23.2	1.9	15	24.4	0.9
浸透圧:mOsmol		37	289.5	16.9	20	292	15.2	17	286.5	18.3

1) 標準偏差

表3. 供試精液の性状(供試馬年齢別)

項目	年齢	6～10歳群			11～15歳群			16～24歳群		
		例数	平均値	SD ¹⁾	例数	平均値	SD	例数	平均値	SD
精液量(ml)		12	42.5	17.8	11	39.1	18.9	14	57.6	26.9
精子濃度(億/ml)		12	2.87	1.66	11	2.97	1.67	14	1.63 ²⁾	0.99
総精子数(億/射精)		12	122.8	81.3	11	106.1	64.6	14	92.3	59
精子生存率(%)		11	86.3	2.1	10	84.9	2.8	12	80	1.9
精子生存指数		11	70	15.6	10	65	19.8	12	57.2 ³⁾	11.5
精子奇形率(%)		11	25	1.4	10	28.7	1.4	14	19.4 ⁴⁾	1.1
浸透圧:mOsmol		12	286.7	19.3	11	288.1	17.7	14	292.9	13.1

1) 標準偏差、2) 6～10歳群および11～15歳群に対し $p<0.05$ 、
3) 6～10歳群に対し $p<0.05$ 、4) 11～15歳群に対し $p<0.05$ 。

表4. 馬精漿の無機物濃度(全体および採取季節別)

項目	季節	全体			冬季(1～3月)			夏季(7～9月)		
		例数	平均値	SD ¹⁾	例数	平均値	SD	例数	平均値	SD
Na(mEq/l)		37	112.7	11.6	20	116.9	11.9	17	107.8 ³⁾	9.2
K (mEq/l)		37	19.8	3.3	20	19.2	3.6	17	20.5	2.9
Cl(mEq/l)		37	117	10.9	20	120.1	10.5	17	113.3	10.2
Mg(mg/dl)		36	8.67	6.03	19	7.33	4.89	17	10.18	6.78
Ca(mg/dl)		37	7.75	3.62	20	6.81	3.86	17	8.85	2.95
iP ²⁾ (mg/dl)		37	8.08	4.33	20	7.94	4	17	8.25	4.67
Fe (μ g/dl)		11	5.09	2.37	6	5.1	2.56	5	5.08	2.14
Zn (μ g/dl)		35	165.4	72.4	18	176.3	66.9	17	153.8	76.2

1)標準偏差、2)無機リン、3)冬季に対し $p<0.05$

表5. 馬精漿の無機物濃度(供試馬年齢別)

項目	年齢	6~10歳群			11~15歳群			16~24歳群		
		例数	平均値	SD ¹⁾	例数	平均値	SD	例数	平均値	SD
Na(mEq/l)		12	115.2	12	11	108.1	12.6	14	114.3	9.1
K(mEq/l)		12	18.6	2.5	11	21.5 ³⁾	3.4	14	19.5	3.4
Cl(mEq/l)		12	116.4	11.3	11	112.7	9.3	14	120.8	10.4
Mg(mg/dl)		12	6.41	4.7	10	11.79	7.92	14	8.39	4.27
Ca(mg/dl)		12	6.08	2.54	11	9.02 ³⁾	3.74	14	8.17	3.78
iP ²⁾ (mg/dl)		12	8.32	3.82	11	9.41	4.78	14	6.84	4.01
Fe(μ g/dl)		4	4.99	1.83	3	4.7	2.87	4	5.48	2.39
Zn(μ g/dl)		12	193.9	79.6	10	184.6	68.8	13	124.3 ⁴⁾	43.8

1) 標準偏差、2) 無機リン、3) 6~10歳群に対しP<0.05、
4) 6~10歳群および11~15歳群に対しP<0.05

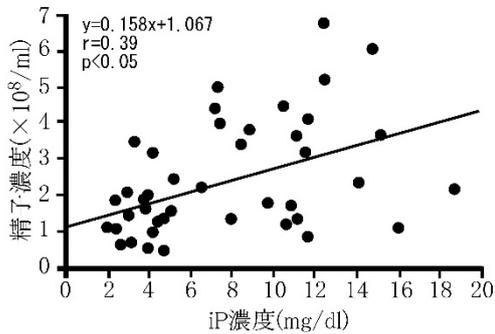


図1. 精漿中iP濃度と精子濃度との関係

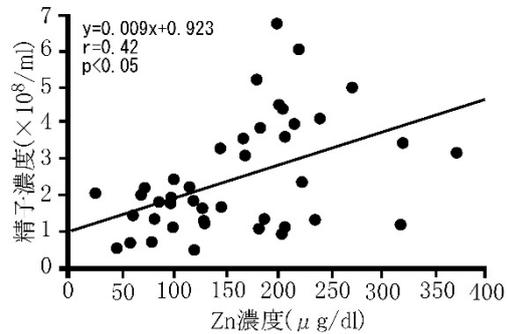


図2. 精漿中Zn濃度と精子濃度との関係

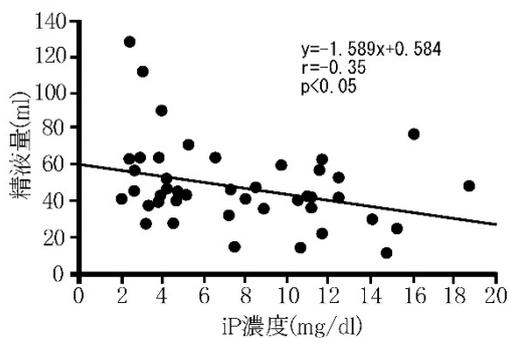


図3. 精漿中iP濃度と精液量との関係

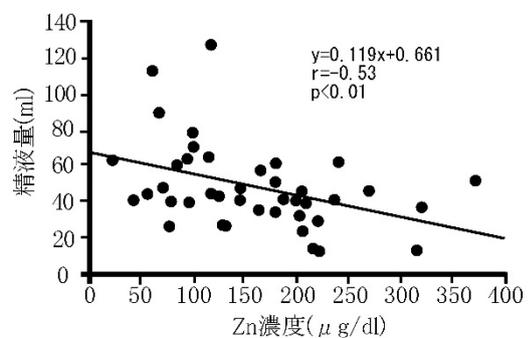


図4. 精漿中Zn濃度と精液量との関係

第3章

馬精漿蛋白質の電気泳動による分画

序 論

精漿蛋白質の研究は、医学領域では 1950 年代から行われており[83]、現在では前立腺癌の診断マーカーとして[44]、また法医鑑識上の精液確認マーカーとして応用されている[30]。一方、家畜精漿中に含まれる蛋白質に関する報告は牛を対象にしたものが多く、アクロシン抑制因子(分子量 MW: 9,500~12,000)、セミナルプラスミン(MW: 5,411)、精子前進運動タンパク質(MW: 37,500)、酸性タンパク質(MW: 13,500)などに関するもの見られ[67]、この他にもインヒビン活性をもつペプチド[71]や各種酵素が含まれているという報告も見られる。しかし、馬精漿蛋白質に関しての研究は数少なく、古くは Szumowski & Stober[106]が蛋白分画像とその比率を報告したにとどまっており、近年においても Amann ら[2]による凍結・融解後の精子の運動性と精漿蛋白質の関連性を追究した報告がみられるに過ぎない。

本章では馬精漿蛋白質に関する研究を始めるに当たり、精漿に含まれる主要蛋白質の全体像を把握するために蛋白質の分画を試み、個体間の出現分画の違いや、季節による変動について検討を加えた。

材料および方法

1. 供試材料

本実験は蛋白分画法の違いから実験Ⅰと実験Ⅱの二つに分けて行った。実験Ⅰでは未変性の蛋白質を分画できるポリアクリルアミドゲル電気泳動(Native-PAGE)法、実験Ⅱでは蛋白質の分子量に従って分画できる SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)法を用い、それぞれ異なるサンプルについて実験を行った。

実験Ⅰには、種雄馬 30 頭(サラブレッド種 26 頭、アングロアラブ種 4 頭)から採取した、延べ 59 例の精液および精漿を供試し、精液採取時の各供試馬の年齢は明け 5~25 歳、平均 12.8 歳(サラブレッド平均 13.5 歳、アングロアラブ平均 10.2 歳)であった。

実験Ⅱには、種雄馬 21 頭(サラブレッド種 19 頭、アングロアラブ種 2 頭)から採取した精液 42 検体を供試した。これらの 42 検体はそれぞれの供試馬から冬季(3月:No.1~21)および夏季(7~8月:No.22~42)にそれぞれ 1 回ずつ採取したものである。

精液採取時の各供試馬の年齢は明け 5~21 歳、平均 11.8 歳(サラブレッド平均 11.8 歳、アングロアラブ平均 11.5 歳)であった。

これら供試馬の繋養地は、北海道、青森県、千葉県および鹿児島県であった。使用管理法・給餌法に関しては第 1 章に記載した方法と同様であった。

2. 精液採取と処理方法

精液の採取は、発情雌馬を台雌として、西川式改良型馬人工膣(富士平工業製)を用いた横取り法またはコンドーム法によって行った。

精液採取後の精液検査と処理に関しては、第2章の方法と全く同様に行った。

なお、各精漿の蛋白濃度の測定には、クマシーブリリアントブルー G250(CBB-G250)と蛋白との結合に基づく、蛋白測定用キット「トネイン-Tp」(大場製薬株式会社製)を用いた。

3. 実験 I : ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(Native-PAGE 法)による精漿蛋白質の分画

蛋白質の電気泳動には、ラウリル硫酸ナトリウムを用いない Laemmli の方法[19,56]に基づき、濃縮ゲルのアクリルアミド濃度を4.5%、分離ゲルを10%に調節した厚さ1 mm のゲルを作製して用いた。ゲルの作成には ATTO 株式会社製ラピダス・スラブゲル作製器 AE-6210 を用いた。

電気泳動に用いる試料は、精漿にグリセリン、Tris-HCl 緩衝液(pH 6.8) および蒸留水を加え、最終濃度をグリセリンは20%、Tris は10mM および蛋白濃度は約2.4 mg/mlとなるように調製した。電気泳動は、ATTO 株式会社製ラピダス・スラブゲル電気泳動装置 AE-6200 を用いて行った。泳動緩衝液には Tris-HCl 緩衝液(pH 8.8)を用い、1well 当たり15 μ l の試料を添加し、20mA の定電流で試料の先端が濃縮ゲルと分離ゲルの境界線より約9cm 泳動されるまで通電し、泳動を行った。なお、試料添加に先立ち、試料溝にブロムフェノールブルーを含むマーカー色素を塗布し、泳動の進み具合を分かりやすくした。

泳動が終了したゲルは0.25% CBB-G250 液で1時間染色を行った後、37°Cの7%酢酸液中で1時間脱色してから酢酸液を室温に戻し、ときどき液を換えながらゲルが透明になるまで脱色を行った。脱色後、ゲルを3%グリシ

ン液に半日浸漬し、その後乾燥しないようにポリ塩化ビニリデン製の薄膜で包み、4℃の定温室に分画の定量まで保存した。

染色したゲルは、透過吸収法による1波長方式を用いた島津製作所株式会社製フライングスポットスキャナ CS-9000 を使用し、波長 605 nm でゲル上の分画の透過度を測定した。分画の定量は、ゲル上で認められた分画とデンストメトリーによる波形とを比較し、マニュアルで分画に相当する波形の面積値を積算して求めた。

4. 実験Ⅱ : Sodium Dodecyl Sulphate-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE 法)による精漿蛋白質の分画

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法は Laemmli 法 [56] に基づき、濃縮ゲルのアクリルアミド濃度を 4.5%、分離ゲルを 12.5% に調節した厚さ 1 mm のゲルを作製して用いた。ゲルの作成には実験Ⅰと同じ機器を用いた。

電気泳動に用いる試料は、精漿に SDS、2-メルカプトエタノール、Tris-HCl 緩衝液 (pH6.8)、グリセリンおよび蒸留水を加え、最終濃度を SDS および 2-メルカプトエタノールは 1%、Tris-HCl 緩衝液は 10 mM、グリセリンは 20% および蛋白濃度は約 1.5 mg/ml となるように調整し、これを 100℃ で 1~2 分間加熱処理した。電気泳動は、実験Ⅰと同じ機器を用い、泳動緩衝液は 0.025 M Tris、0.192 M グリシン、0.1% SDS を使用して、1well 当たり 25 μ l の試料を添加し、25 mA の定電流で試料の先端が分離ゲルの先端に達するまで通電し、泳動を行った。なお、実験Ⅰと同様に、試料溝にマーカー色素を塗布し、泳動の進み具合を分かりやすくした。

泳動が終了したゲルは 0.25% CBB-G250 液で 1 時間染色を行った後、7% 酢酸液中でときどき液を換えながらゲルが透明になるまで脱色を行った。

脱色後、ゲルを蒸留水に半日浸漬して酢酸を抜いたあと、乾燥しないようにポリ塩化ビニリデン製の薄膜で包み、分画の測定まで冷暗所に保存した。

染色したゲルの分画の検出と定量は実験 I と同様に行った。また、デンシトメーターによって記録した泳動像を基にして、分子量既知の標準蛋白質および試料蛋白質の移動度を計算し、相対移動度(Rf)として算出した。標準蛋白質の Rf 値をそれぞれの蛋白質の分子量値の対数に対してプロットし、分子量の検量曲線(縦軸に分子量の対数、横軸に Rf 値)を作成した。これに試料蛋白質の Rf 値を照合して分子量を推定した。

なお、実験 I および II に使用した試薬はすべて電気泳動用特製試薬または特級試薬であった。

5. 実験期間

本実験は、1988 年 7 月から 1991 年 10 月にわたって実施した。

結 果

1. 実験 I

(1) 精液の一般性状

供試馬の精液 59 例のうち、精液の一般検査を実施した 56 例について、精液量、精子濃度、精子生存率および精子奇形率を表 1 に示した。

平均精液量は 52.1ml、平均精子濃度 2.13 億/ml、精子活力および染色法による生存率はそれぞれ 80.5% および 75.9% であり、精子奇形率は 25.1% であった。

また全例について測定した精漿蛋白質濃度は、 933.8 ± 480.1 mg/dl (平均 ± 標準偏差) であり、個体間でかなりの変動が見られた。

(2) Native-PAGE 法による精漿蛋白質の分画結果

供試精液 59 例について、Native-PAGE を行ったところ、最も多いものでは 19 個の分画が確認された。この分画に陰極側より第 1、2、3、4、5、6、7、7'、8、9、10、10'、11、12、13、14、15、16 および 17 というように番号をつけて表わした(図 1)。第 7' と第 10' 分画は各々第 7 と第 10 分画がデンストメトリーの波形で二峰性を示した場合の分画である。

各分画の供試精液 59 例における出現率およびデンストメトリーによって得られた精漿蛋白質中で各分画が占める割合の平均を表 2 に示した。

各分画の出現率は第 1、2、5、6 および 7 分画が 100% であり、第 4 分画が 78.0%、第 10 分画が 94.9%、第 11 分画が 89.8%、第 12 分画が 93.2%、第 13 分画が 88.1%、第 14 分画が 81.4%、第 16 分画が 86.4% および第 17 分画が 79.7% であった。しかし、その他については、第 3 分画は 39.0%、第 8 分画が 25.4%、第 9 分画は 39.0%、第 10' 分画が 18.6% および第 15 分画

が 28.8%と出現率は低く、また第 7'分画は 59.3%と中程度の出現率を示した。

出現頻度の低い分画の出現の有無と精漿蛋白濃度および一般精液性状(精液量、精子濃度、精子生存率および奇形率)との関係を検討した結果、第 15 分画が出現しない精漿群では精液量が多く、精子濃度が薄いため総精子数は少なくなる傾向があるが、逆に第 15 分画が出現する精漿群では精液量は少ないが、精子濃度は高いため総精子数は多くなる傾向があった。第 3 分画の出現しない精漿群では蛋白濃度が高い傾向があったが、第 3 分画が出現する精漿群では蛋白濃度が低い傾向があった。精子生存率と奇形率においては、分画の有無と相関は見られなかった。

精漿蛋白質中で各分画が占める割合の平均値をみると、第 1 分画が 25.4%と最も高く、次いで第 2 が 15.3%、第 6 が 11.0%、第 7 が 6.3%そして第 5 分画が 5.7%であり、分画の出現率が 100%である 5 個の分画(第 1、2、5、6 および 7 分画)だけで精漿蛋白質の 64%を占めた。

雄馬血清と精漿蛋白質の Native-PAGE 泳動像の比較を図 2 に示した。

血清には 10 個の分画が出現し、アルブミンは陰極より 9 番目の分画に位置した。精漿の第 9 から第 17 分画に一致する分画は、血清には全く存在しなかった。第 7 から第 8 分画付近は、血清のアルブミン分画が存在する位置と重なっていた。アルブミン分画以外に精漿と泳動位置が一致した分画は第 3、第 5 分画および分離ゲルとの境界線が一番近い第 1 との 3 分画だけであった。

また、コンドーム法で採精する際に採取できた射精直前に分泌される尿道球腺液を泳動した結果、図 3 に示した様に第 10、11、12、13、14、16 および 17 分画の 7 個の分画が認められた。

2. 実験 II

(1) 精液の一般検査結果

精液の一般検査を行った冬季精液採取群および夏季精液採取群について、採取時の精液量、精子濃度、総精子数、精子生存指数、精子生存率および精子奇形率を表 3 に示した。

平均精液量は冬季 50.8 ml および夏季 58.2 ml、平均精子濃度は 2.918 億/ml および 2.243 億/ml、平均総精子数は 141.87 億 および 113.28 億、平均精子生存指数は 57.6 および 57.2、染色法による平均精子生存率は 78.1% および 83.9%、そして平均精子奇形率は 23.3% および 21.5% であった。いずれの検査項目についても、冬季と夏季の間に有意差はなかった。

なお、表には示していないが冬季および夏季精液採取群の平均蛋白質濃度はそれぞれ 790.43 mg/dl および 1099.57 mg/dl であり、夏季は冬季に比べ有意に高い値を示した($p < 0.05$)。

(2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による精漿蛋白質の分析結果

冬季および夏季精液採取群についての精漿蛋白分画像を、図 4 および 5 に示した。

1) 精漿蛋白質の分画結果

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により得られた分画像に、泳動開始点(陰極側)から順に、第 1、2、3 というように番号をつけた。その結果、25 の異なった蛋白質が存在することが明らかとなった。表 4 には、それらの蛋白質の平均推定分子量および出現数(出現率)を示した。出現率が 100% の分画は冬季精液採取群については第 4、5、9、17、22、24 および 25 であり、夏季精液採取群については第 5、15、17、20、22、24 および 25 であった。そのうち第 5、17、22、24 および 25 分画は、冬季および夏季に共通していた。出現率が 90% 以上の分画は 100% の分画に加えて冬季では、第 3、6、13、14、

15、16 および 20 分画であり、夏季では第3、6および13分画であった。両季節の出現率が80%以上である主要な蛋白質の推定分子量は、第3分画が約86,700、第4分画が約76,800、第5分画が約67,500、第6分画が約61,500、第13分画が約31,000、第15分画が約26,900、第17分画が約20,200、第20分画が約17,200、第22分画が約15,600、第24分画が約13,300そして第25分画が約11,600であった。

冬季と夏季で分画出現率が大きく異なるのは、第7分画(冬季:0%、夏季:38.1%)、第9分画(冬季:100%、夏季:52.4%)、第12分画(冬季:71.4%、夏季38.1%)、第14分画(冬季:90.5%、夏季:57.1%)、第16分画(夏季:95.2%、夏季:52.4%)、第19分画(冬季:14.3%、夏季:42.9%)、第23分画(冬季:52.4%、夏季:23.8%)であった。

この中で、第7分画は、冬季に出現した検体は1例もなく夏季の検体だけに出現した。

2) 主要蛋白分画の蛋白濃度の測定結果

デンストメーター上で読み取られ冬季および夏季精液採取群における蛋白分画の濃度は表5に示したとおりである。

冬季および夏季を通してしてみると、第15、17、22および25分画の蛋白質濃度がすべて100 mg/dlを超え、他の分画の蛋白質と比較してもはるかに濃度が高かった。

季節別にみると、測定した精漿中の総蛋白質濃度の結果を反映して、殆どすべての分画で夏季に高い傾向を示した。その中でも、第17および第22分画が冬季に比べて特に高かった。一方、第16分画は夏季において濃度が低下していた。

考 察

精漿蛋白質の研究は、医学領域では 1950 年代から行われており[83]、現在では前立腺癌の診断マーカーとして[44]、また法医鑑識上の精液確認マーカーとして応用されている[30]。しかし、家畜においては、精漿蛋白質を疾病の診断や能力の判定に応用する域まで達していない。殊に、馬に関する研究報告は殆どされておらず、近年では Amann ら[2]による凍結・融解後の精子の運動性と精漿蛋白質の関連性を追究した報告がみられるに過ぎない。

本実験では、Native-PAGE 法によって馬精漿から 19 の蛋白質が分画され、SDS-PAGE 法では 25 の蛋白分画を見出すことができた。SDS-PAGE 法では蛋白質試料に還元剤である 2-メルカプトエタノールを加えて煮沸し、S-S 結合を切断してから電気泳動するため、CBBG-250 染色で検出可能なレベルに含まれている主要な精漿蛋白質は 19 種類であることが明らかとなった。また、これらのうち Native-PAGE で陽極側に分画される 7 種類は射精前に分泌される尿道球腺分泌液に含まれていることが明らかとなった。

一方、SDS-PAGE 法で分画された 25 種類の蛋白質は、分子量が約 12,000～101,000 の範囲であると推定された。分子量が 30,000 以上の蛋白質については、出現割合が高くても濃度的には低いものばかりであったが、分子量が 30,000 以下の蛋白質は、出現割合が高く、かつ濃度も高いものが多かった。従って、精漿蛋白質を構成する大部分のものが、分子量 30,000 以下であるといえる。

Amann ら[2]は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により馬精漿から 27 の蛋白質を発見したと報告しており、今回の実験結果は、彼らの報告と多少異なっていた。これは Amann らの研究では 10%の分離ゲルを用いて泳

動を行ったのに対し、今回の実験では12.5%の分離ゲルを用いたために、高分子領域の分解能が10%に比べて劣っていることが原因となって生じたと考えられる。

季節別に馬精漿蛋白分画を検討すると、冬季は夏季に比べ分画出現率は高いが、濃度は低い傾向を示した。ほとんどの精漿蛋白分画において蛋白濃度が夏季に高いのは、ホルモン支配と密接に関係している。従って、夏季に蛋白分画濃度が減少した第16分画に関しては、今後検討する余地がある。

ウシ精漿中にはアクロシン抑制因子、セミナルプラスミン、精子前進運動タンパク質、酸性タンパク質などが発見されており、精子の原形質膜に結合して生理機能に影響を及ぼすことが知られている[67]。本実験で明らかに出来たことは馬精漿中に何種類の蛋白質が含まれているかということと、それらの分子量だけである。今回分画されたそれぞれの蛋白質に関して、どのような働きをしているかを把握しないことには、利用の方向性さえ掴めないことになる。今後は、蛋白質の種類を絞ってその機能を解明して行く必要がある。

要 約

馬の精漿蛋白質の分析を臨床応用するための基礎研究として蛋白質の分画を実施した。本実験は蛋白分画法の違いから実験Ⅰと実験Ⅱの二つに分けて行ない、実験Ⅰでは軽種馬 30 頭、59 例の精液を用いて未変性の蛋白質を分画できる Native-PAGE 法を試みた。さらに実験Ⅱでは軽種雄馬 21 頭、精液 42 検体を用いて、SDS-PAGE 法で精漿蛋白質の分画を試みるとともに、季節による比較も行った。

得られた結果の概要は次のとおりである。

1. 実験Ⅰ

Native-PAGE 法では、最も多いもので 19 個の分画が確認された。この分画に陰極側より第 1、2、3、4、5、6、7、7'、8、9、10、10'、11、12、13、14、15、16 および 17 分画とした。第 7' 分画と第 10' 分画はそれぞれ第 7 分画と第 10 分画が二峰性を示した場合の分画である。

各分画の出現率は第 1、2、5、6 および 7 分画が 100% であり、第 4、10、11、12、13、14、16 および 17 分画が 70% 以上の高い出現率を示した。第 7' 分画は 59.3% と中程度の出現率を示したが、他の第 3、8、10' および 15 分画の出現率は 40% 以下と低かった。

2. 実験Ⅱ

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により 25 の蛋白分画が確認された。これらの分子量は約 11,600~100,700 の範囲であると推定された。主要蛋白分画の蛋白濃度は、季節別にみれば、殆どすべての分画で夏季に高い傾向を示した。

以上の結果から、馬精漿に含まれる主要な蛋白質は19種類であり、その分子量は約11,600～100,700以上であることが明らかとなった。今後は、分画された各蛋白質について、その機能を解明して行く必要がある。

表1. 実験 I に供試した精液の一般性状

項目	平均	SD ¹⁾
採取年齢 ²⁾	12.8	4.62
精液量(ml)	52.1	20.75
精子濃度(億/ml)	2.13	1.22
総精子数(億)	111.05	81.9
精子生存率		
精子活力(%)	80.5	15.54
染色法(%)	75.9	16.7
精子奇形率 ³⁾ (%)	25.11	0.61

1):標準偏差、2):明け年齢、3)慣行法

表2. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による精漿蛋白画の測定結果

分画番号	分画 出現数	平均 ¹⁾ (%)	出現率 (%)
No.1	59	25.4	100
No.2	59	15.3	100
No.3	23	1.3	39
No.4	46	4.5	78
No.5	59	5.7	100
No.6	59	11	100
No.7	59	6.3	100
No.7'	35	2.1	59.3
No.8	15	0.6	25.4
No.9	23	1.3	39
No.10'	11	0.2	18.6
No.10	56	3.9	94.9
No.11	53	2.3	89.8
No.12	55	4.8	93.2
No.13	52	7.6	88.1
No.14	48	2.3	81.4
No.15	17	0.4	28.8
No.16	51	2.8	86.4
No.17	47	2.3	79.7

1):染色濃度の相対比

表3. 実験Ⅱに供試した精液の性状

精液採取時期		精液量 ml	精子濃度 億/ml	総精子数 億/射精	精子 生存 指数	精子 生存率 ^{a)} %	精子 奇形率 %
	例数	20	19	19	20	20	19
冬季	平均	50.8	2.918	141.87	57.6	78.1	23.3
	SD ^{b)}	12.2	1.218	52.35	19.9	13.1	8.5
	例数	21	21	21	21	21	21
夏季	平均	58.2	2.243	113.28	57.2	83.9	21.5
	SD	21	1.299	42.12	18.5	11.3	7.9

a)エオジン・ニグロシン液による生死鑑別染色成績に基づく生存率

b)標準偏差

表4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られた
蛋白質分画の推定分子量と出現割合

蛋白質分 画番号	平均推定 分子量	冬季採取精漿		夏季採取精漿	
		出現 検体数	出現率 ^{a)} (%)	出現 検体数	出現率 ^{a)} (%)
1	100,681	6	28.6	6	28.6
2	94,955	2	9.5	3	14.3
3	86,717	19	90.5	19	90.5
4	76,842	21	100.0	18	85.7
5	67,502	21	100.0	21	100.0
6	61,538	20	95.2	20	95.2
7		0	0.0	8	38.1
8	53,765	4.8	0.0	0	0.0
9	49,287	21	100.0	11	52.4
10	43,649	1	4.8	2	9.5
11	36,453	2	9.5	1	4.8
12	31,932	15	71.4	8	38.1
13	30,970	19	90.5	20	95.2
14		19	90.5	12	57.1
15	26,856	20	95.2	21	100.0
16	25,116	20	95.2	11	52.4
17	20,217	21	100.0	21	100.0
18	19,478	2	9.5	3	14.3
19	18,420	3	14.3	9	42.9
20	17,206	20	95.2	21	100.0
21	15,698	13	61.9	9	42.9
22	15,642	21	100.0	21	100.0
23	14,222	11	52.4	5	23.8
24	13,292	21	100.0	21	100.0
25	11,621	21	100.0	21	100.0

a) 冬季および夏期採取精漿とも例数は21検体。

表5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られた蛋白質分画の精漿中における平均濃度

蛋白質分 画番号	蛋白質分画濃度 (mg/dl)					
	冬季採取精漿			夏季採取精漿		
	例数	平均	SD	例数	平均	SD
1	4	4.7	1.8	6	6.7	2.3
2	2	6.2	—	3	21.8	2.5
3	2	8.7	—	4	9.5	8.2
4	21	27.8	13.6	13	29.2	18.2
5	20	19.9	8.7	19	19.2	18
6	17	14.1	5.4	17	14.7	12.1
7	0	—	—	0	—	—
8	0	—	—	0	—	—
9	6	4.4	1.3	3	3.9	2
10	0	—	—	1	14.1	—
11	1	6.3	—	1	1.6	—
12	1	14.2	—	0	—	—
13	19	37.4	13.2	20	40.3	16.4
14	0	—	—	0	—	—
15	18	171.3	72	21	209.6	95.2
16	12	92.2	65.6	7	56.1	52.3
17	21	238.3	96.2	21	309.6	169.6
18	1	4.8	—	0	—	—
19	2	3.9	—	1	6.7	—
20	20	42.7	32.4	21	85	49.5
21	1	36.7	—	0	—	—
22	21	119.3	66.2	21	211.4	145.7
23	5	5	2.2	2	3.4	—
24	20	34	33.4	21	47.8	39.4
25	10	126.4	76.7	16	161.3	112.8

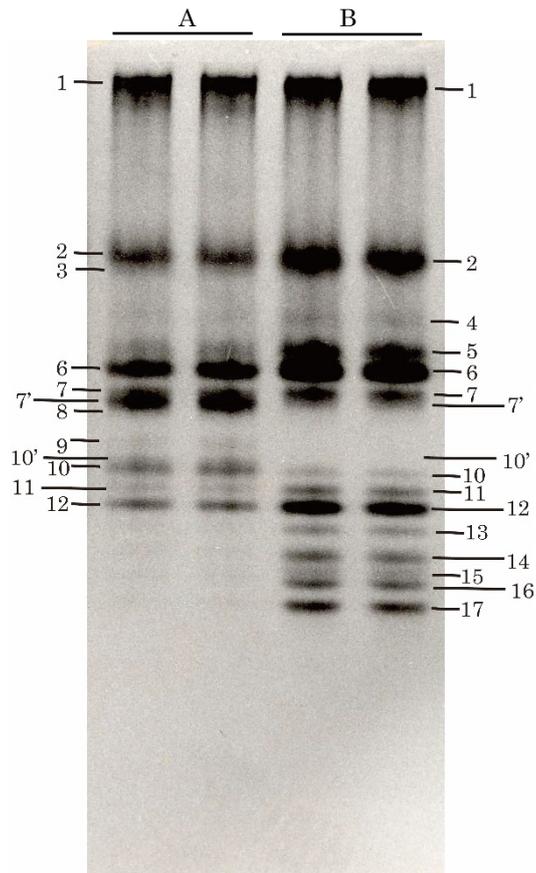


図 1. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって得られた

馬精漿蛋白質の分画像と分画番号

A:分画数の少ない精漿

B:分画数の多い精漿

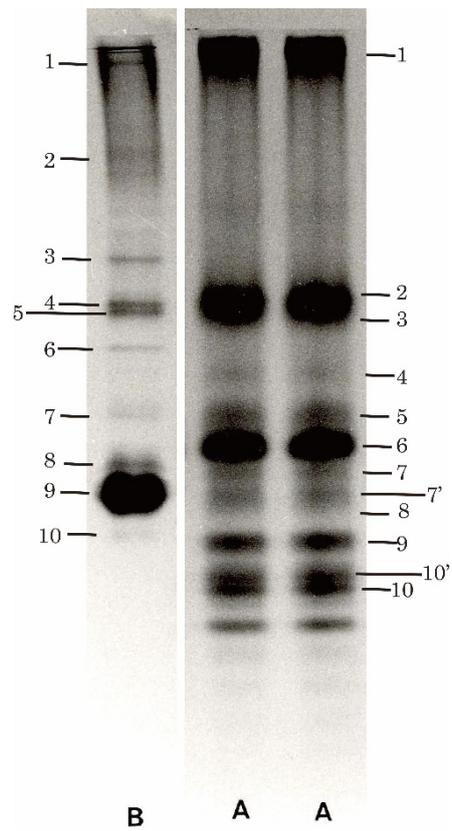


図2. 馬精漿と馬血清のポリアクリルアミドゲル電気泳動
像の比較

A:馬精漿、B:馬血清

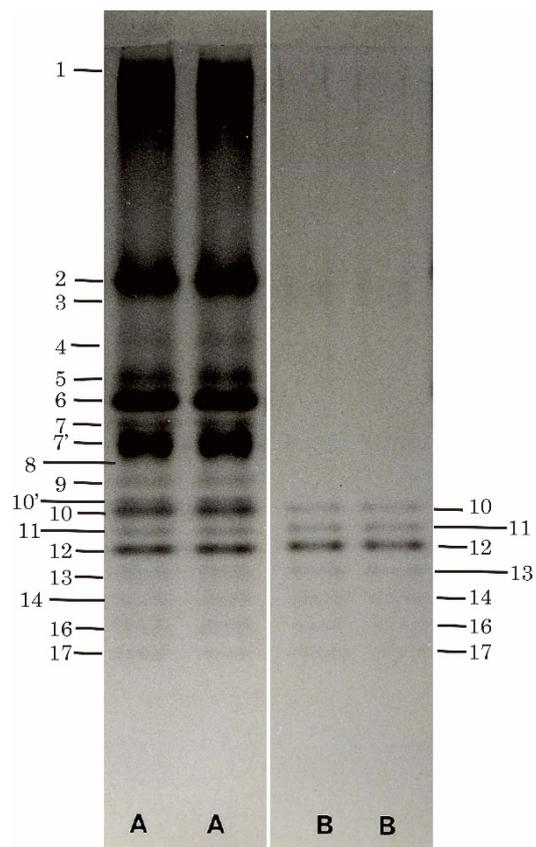


図3. 馬精漿と尿道球腺分泌液のポリアクリルアミドゲル

電気泳動像の比較

A:馬精漿、B: 尿道球腺分泌液

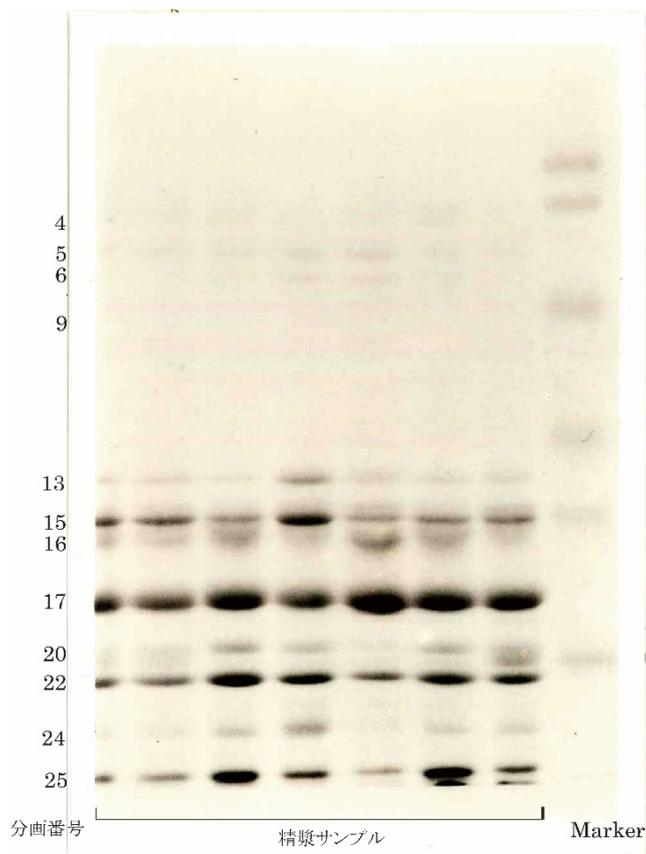


図4. 冬季精液採取群における SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって得られた馬精漿蛋白質の分画像と分画番号

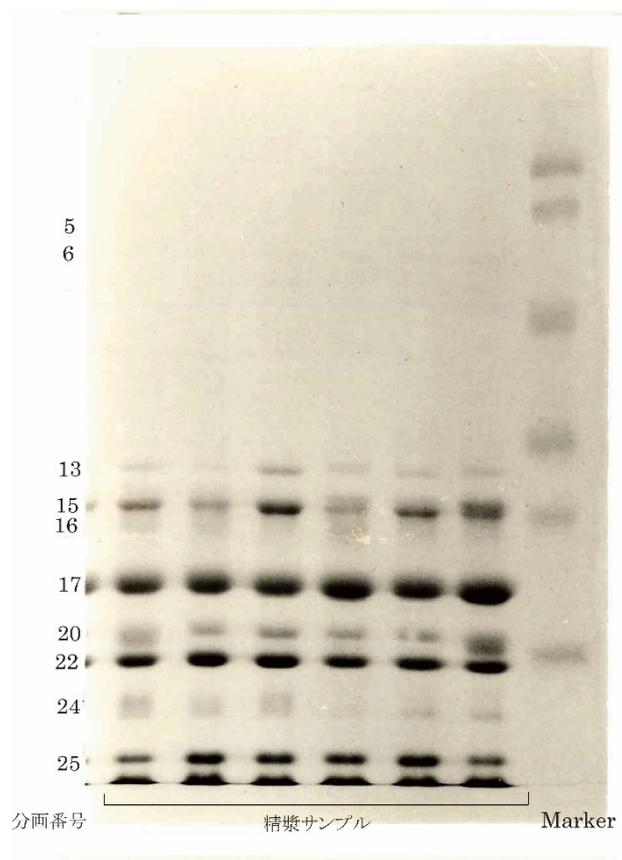


図5. 夏季精液採取群における SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって得られた馬精漿蛋白質の分画像と分画番号

第4章

馬精漿中トランスフェリンおよびラクトフェリンの
年齢および季節による違い並びに精液性状との関連性

序 論

トランスフェリン(Tf)は主に肝で合成される分子量 80,000 の鉄結合性糖蛋白質である。Tfは精液中においてもその存在が確認されており[101]、その由来は精巣のセルトリ細胞から合成・分泌されるものと副生殖腺から分泌されるものとに分けられることが報告されている[25,101,103]。

精巣における Tf の役割は、精祖細胞、パキテン期精母細胞および幼若精子細胞で Tf レセプターが認められていることから[101,102]、これら生殖細胞の成長・分化の過程において必要となる鉄原子の輸送に関与していることが考えられる。また、副生殖腺に由来する Tf の機能に関する報告は見当たらないが、他の蛋白質や遊離アミノ酸などとともに重金属と結合してその害作用を防ぎ、精子を保護しているものと推定される。

数種類の動物において、精液中に Tf と同様の鉄結合能をもつ分子量 84,000 の糖蛋白質であるラクトフェリン(Lf)の存在が報告されている[68,69]。Lf は乳汁、特に初乳中に多量に含有されるが[20,91]、血液、涙、唾液、鼻汁など各種体液中においてもその存在が確認されている[12,68,69,91]。精液中 Lf は、ヒトおよび豚では精囊腺から、マウスおよび馬では精巣上体からの分泌がそれぞれ報告されている[27,90,91,100,118]。精囊腺に由来する Lf の役割は不明であるが、Tfと同様、精子の保護に関与しているものと推定される。また、Lf の二次的な機能として静菌あるいは抗菌作用が報告されており[76]、精液中に存在する Lf もこのような役割を果たしている可能性もある。一方、精子は精巣上体を移動する間に、多種の糖蛋白質などの作用を受け成熟することが知られている[18,25,90]。ヒトおよび豚においては精子表面に Lf 結合部位の存在が報告されており[18,27]、精子の成熟に関与する糖蛋白質の一つとして Lf が精子成熟過程に関与している可能性が示唆

されるが、その作用機序に関してはいまだ解明されていない。

これら精液中に見出される鉄結合性糖蛋白質と精液性状との関係について、数種類の動物において報告がなされている[15,18,21,41,49,50,95]。Berら[7]はヒトにおける精液中 Tf 濃度が総精子数、精子濃度、精子運動性と相関性を持っていると報告している。また Forestaら[21]は精子減少症と無精子症のヒトで精液中 Tf 濃度は著しく低下すると報告している。さらに、牛においては Gilmontら[91]が精液中総 Tf 量と総精子数が相関していると報告している。これらの報告は精液中 Tf を精巣機能の指標として使用することが可能であるということを示唆している。

一方、Lf に関しては、Buckettら[13]がヒトにおける精子減少症と精子減少無力症サンプルで、正常精液サンプルに比べて精液中 Lf 濃度の上昇が見られたと報告しており、精液中 Tf と同様に精液中 Lf が雄生殖器疾患の指標と成り得る可能性を示唆している。しかし、現在馬の精漿 Lf に関する報告は少なく、精液性状と精液 Lf 値の相関性およびその精液中における役割を報告しているものは見当たらない。

そこで、本研究では幅広い年齢層から採取した馬の精漿 Tf および Lf の含有量を測定し、それら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も検討を加えた。

材料および方法

1. 供試馬および供試精液

本研究には28頭のサラブレッド種雄馬から採取した延べ154検体の精液を供試した。精液の採取は1998年2月から2001年7月の間に行い、検体採取時の供試馬の年齢は6～27歳であった。

2. 検体の区分

供試した精液の採取時期は1月下旬から3月まで(冬季)と6月から8月まで(夏季)の2つの時期に分けられた。また、精液採取時の供試馬の年齢は、前述のとおり6から27歳の範囲にわたっていたが、本研究では年齢を2つに区分し6から15歳を壮齢、16歳以上を高齢として結果をとりまとめた。それぞれの区分における例数は、冬季が壮齢60例、高齢24例、夏季が壮齢51例、高齢19例であり、これらの詳細は表1に示したとおりである。

3. 精液採取、検査および処理

精液採取は自然発情またはPGF 2α およびEstradiol-17 β を投与して発情状態を誘起した雌馬を台雌にして、人工膈を用いた横取法あるいはコンドーム法で行った。

精液採取後の検査および精漿分離法は第2章と同様に実施した。分離した精漿は、TfおよびLfの測定まで-20℃で凍結保存した。

4. Sodium Dodecyl Sulphate-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE法)

(1) 試薬

SDS-PAGE に用いた試薬は以下のとおりである。

分離ゲル：1.5M トリス/塩酸緩衝液にアクリルアミドを 9.76%、*N,N'*-メチレンビスアクリルアミドを 0.26%、SDS を 0.01%、*N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)を 0.05%、過硫酸アンモニウム(APS)を 0.1%の割合で溶解させ pH 8.9 に調整したものを使用した。

濃縮ゲル：0.5 M トリス緩衝液にアクリルアミドを 4.5%、*N,N'*-メチレンビスアクリルアミドを 0.12%、SDS を 0.1%、TEMED を 0.1%、APS を 0.1%の割合で溶解させ pH 6.8 に調整したものを使用した。

電極液：2回蒸留水(DDW)11にトリスを 0.025 M、グリシンを 0.192 M、SDS を 0.1%の割合で溶解させ、pH を 8.6 に調整したものを使用した。

試料用緩衝液：pH 6.8 に調整した 50 M トリス塩酸緩衝液にジチオトレイトール(DTT)を 20mM、SDS を 2%、グリセロールを 5%、プロモフェノールブルー(BPB)を 0.002%の割合で溶解させたものを使用した。

染色液：メタノールと酢酸と DDW を容積比 5:1:5 で混合した液 1,100 ml にクーマシーブリリアントブルーR-250 を 0.55 g 溶解したものを使用した。

脱色液：DDW 全量中の 7% が酢酸、5% がメタノールになるように調整した混液を使用した。

分子量マーカー：TEFCO 社の分子量マーカー II (Wide Range 3.5-205 KDa)を用いた。

なお、試薬類は特級あるいは高純度のものを使用した。

(2) SDS-PAGE 法

SDS-PAGE は Laemmli[56]の方法に従って行った。Tf および Lf 測定用試料は同一の試料を使用し、これらの試料は試料用緩衝液を用いて 10 倍希釈し、95℃で5分間加熱処理後、ゲルの試料溝に各試料を 20 μ l ずつ添加した。分子量マーカーに関しては、希釈せず 5 μ l 添加した。上槽を陰極、

下槽を陽極として室温で 60 V の定電圧で泳動を開始し、マーカー色素 (BPB) が分離ゲルに達した後に 150 V の定電圧にした。色素がゲル下端から 5 mm まで移動したところで泳動を終了した。次に濃縮ゲルを切り離し、分離ゲルを染色液の入った容器中に入れ、室温で1時間染色した。染色終了後、容器内の液体を脱色液に交換して振盪しながらバックグラウンドが透明になるまで脱色した。なお、脱色の際には色素を吸着させるために脱色液中に少量の毛糸を投入した。

5. イムノブロッティング

(1) 試薬

イムノブロッティングに用いた試薬は以下のとおりである。

転写用緩衝液: 100 mM トリス緩衝液にグリシンを 192 mM の割合で溶解し pH 9.0 に調整したものにメタノールを 5% (v/v) の割合で添加したものを使用した。

トリス緩衝化生理的食塩水 (TBS): 20 mM トリス塩酸緩衝液に NaCl を 150 mM の割合で溶解し pH 7.6 に調整したものを使用した。

マスキング液: TBS に牛血清アルブミンを 1.0%、NaN₃ を 0.02% の割合で溶解したものを使用した。

免疫反应用転写液: 0.01% Thimerosal 加 TBS に牛血清アルブミンを 0.1%、Tween20 を 0.1% の割合で溶解したものを使用した。

洗浄液 (0.1% TBST): Tween20 を 0.1% の割合で TBS に添加して使用した。

Tf 用一次抗体はウサギ抗ウマ Tf 精製 IgG を、Lf 用一次抗体はウサギ抗ウマ Lf 精製 IgG をそれぞれ使用し、二次抗体は POD 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を使用した。抗体は北里大学獣医生理化学講座より分与されたものを

使用した。なお、試薬類は特級あるいは高純度のものを使用した。

(2) ウェスタンブロット法

前述の SDS-PAGE と同様の操作を染色の前段階まで行い、得られたゲルを使用した。ポリビニリデンジフルオライド膜（以下 P 膜）を 100%メタノールに 20 秒間浸した後に転写用緩衝液に 30 分以上浸漬した。一方、泳動したゲルおよび転写用電極濾紙を転写用緩衝液に 15 分間浸漬した。P 膜への転写にはアトー社製のホライズブロット(AE-6675 P/N 型)を用いた。水平平面プレート電極対間には下から、濾紙（3枚）、P 膜、ゲル、濾紙（3枚）の順に気泡が入らないようにセットし、 2 mA/cm^2 の定電流で 90 分間転写した。転写終了後、P 膜を TBS で 10 分間洗浄してから、マスキング溶液 30 ml に一晩浸漬してマスキングした。

次に、Tf に関しては P 膜を免疫反应用緩衝液で $1 \mu\text{g/ml}$ に希釈したウサギ抗ウマ Tf 精製 IgG に浸漬し、振盪しながら 2 時間反応させた。また、Lf に関しては P 膜を免疫反应用緩衝液で $2 \mu\text{g/ml}$ に希釈したウサギ抗ウマ Lf 精製 IgG に浸漬し、振盪しながら 2 時間反応させた。次いで、P 膜を 0.1% TBST で 3 回洗浄（10 分/回）した後、免疫反应用緩衝液で希釈した POD 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 20 ml に浸漬し、振盪しながら 2 時間反応させた。その後、P 膜は 0.1% TBST で 3 回（10 分/回）、TBS で 2 回（5 分/回）、DDW で 1 回（5 分）の順で洗浄した後に発色液に浸漬し、振盪しながら発色させた。発色完了後、P 膜を DDW で数回洗浄して発色を停止させ、濾紙に挟んで乾燥させた。

6. 精漿中 Tf および Lf の測定

(1) 試薬および器具

Tf および Lf の測定に用いた試薬は以下のとおりである。

ELISA 緩衝液：pH 7.2 に調整したリン酸緩衝液(PBS)に Tween20 を 0.1%、 NaN_3 を 0.02% の割合で溶解したものを使用した。

硫安加 ELISA 緩衝液：pH 7.2 に調整した ELISA 緩衝液に硫酸アンモニウムを 0.5 M の割合で溶解したものを使用した。

アルカリホスファターゼ(ALP)用基質溶液：DDW にグリシンを 100 mM、*p*-ニトロフェニルリン酸を 3 mM、 ZnSO_4 を 1 mM の割合で溶解したものを 1N NaOH を使用して pH 10.0 に調整したものを使用した。

0.05% PBST：PBS に Tween20 を 0.05% の割合で添加したものを使用した。

酵素反応停止液：DDW にエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を 200 mM の割合で溶解したものを使用した。

標準曲線用 Tf 溶液：Tf 純品を ELISA 緩衝液で 1959.8 倍希釈して Tf 濃度を 200 ng/ml に調製したものを使用した。

標準曲線用 Lf 溶液：Lf 純品を ELISA 緩衝液で 969.5 倍希釈し Lf 濃度を 100 ng/ml に調製したものを使用した。

なお、Tf および Lf の純品は北里大学獣医生理化学講座において精製されたものを使用した[40]。Tf および Lf 用一次抗体はイムノブロッティングで使用したのと同じものを使用し、二次抗体は ALP 標識ヤギ抗ウサギ IgG を使用した。測定に使用した抗体は北里大学獣医生理化学講座より分与されたものを使用し、試薬類は特級あるいは高純度のものを使用した。また、ELISA 用マイクロタイタープレートは Nunc 社製の Immuno Plate Maxisorp F96 を使用した。

(2) サンドイッチ ELISA

96 穴 Immuno Plate の各穴に PBS で 2.0 $\mu\text{g/ml}$ に希釈した一次抗体を 100 μl ずつ分注し、4°C で 15 時間放置して抗体をプレートにコーティング

した。次いで、プレートを PBST で3回洗浄した後、ELISA 緩衝液を各穴に 300 μ l ずつ加えて、1時間 マスキングした。その後、0.05%PBST で1回洗浄後、各穴にサンプルあるいは硫安加 ELISA 緩衝液で2倍階段希釈した標準曲線用溶液を 100 μ l ずつ添加し、37°Cで2時間反応させた。なお、測定サンプルは Tf 測定の場合は精漿を硫安加 ELISA 緩衝液で 101 倍に希釈したものを、Lf 測定の場合は 5151 倍に希釈したものをを用いた。反応終了後、各穴を 0.05%PBST で3回洗浄してから、硫安加 ELISA 緩衝液で 300 ng/ml になるように希釈した二次抗体を 100 μ l ずつ添加し 37°Cで2時間反応させた。その後、0.05%PBST で3回洗浄してから、ALP 用基質溶液を各穴に 200 μ l ずつ添加して 37°Cで 45 分間酵素反応をさせた。次いで酵素反応停止液を各穴に 50 μ l ずつ添加して反応を停止した後に、吸光度計 (Titertek Multiskan MCC/340, Flow Laboratories 社製)を用いて波長 405nm における吸光度を測定した。得られた吸光度から標準曲線を作成し、その標準曲線を用いて試料吸光度から各試料の Tf および Lf 濃度を算出した。なお、本法における測定内変動係数は Tf が 3.88%、Lf が 5.71%であった。また、測定間変動係数は Tf が 9.55%、Lf が 7.97%であった。なお、馬精漿 Tf および Lf に関する ELISA 標準曲線の1例をそれぞれ図 1 および図 2 に示した。

7. 蛋白質定量

(1) 試薬

蛋白質の測定に用いた試薬は以下のとおりである。

2%炭酸ナトリウムアルカリ溶液:1 lの4 M NaOH に 20 g の Na_2CO_3 を溶解したものを使用した。

硫酸銅・クエン酸ナトリウム溶液:DDW にクエン酸ナトリウムを 1.0%の割合

で溶解したものの 100 ml に 0.5 g の $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を溶解したものを使用した。

アルカリ溶液：2%炭酸ナトリウムアルカリ溶液 50 ml と硫酸銅・クエン酸ナトリウム溶液 1 ml を混合したものを使用した。

ゲル濾過用緩衝液：DDW に NaN_3 を 0.2%、NaPi を 20 mM、NaCl を 500 mM の割合で溶解し pH 7.2 に調整したものを使用した。

標準蛋白質溶液：DDW に 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の割合で牛血清アルブミン(BSA) を溶解したものをを用いた。

フェノール試薬：市販のフェノール試薬を予めフェノールフタレインを指示薬としてアルカリで滴定し、DDW で希釈して 1 N 酸溶液としたものを使用した。

(2) Lowry 法

精漿中のタンパク質濃度測定は Lowry 法 [58] に従って行った。ゲル濾過用緩衝液で 101 倍希釈した精漿サンプルと標準蛋白質溶液をアルカリ性溶液で 3 倍希釈し、正確に 10 分間室温で放置した。次いでフェノール試薬を添加して直ちに混和し、室温で 30 分間放置した。その後タングステンランプを使用して、波長 750 nm における吸光度を測定した。得られた吸光度より Lowry 係数を算出し、サンプル中の蛋白質濃度を求めた。

8. 実施期間

本実験は 1998 年 2 月から 2001 年 9 月 19 日までの期間に行った。

9. 統計処理

各年齢および各季節間の精液性状、精漿 Tf、Lf および蛋白質値の差の検定は等分散のものに関しては Student's *t*-test により、分散の異なるものでは Welch's *t*-test によって有意差の検定を実施した。また、精液性状と精

漿 Tf、Lf および蛋白質値との間の相関に関しては単回帰分析を行い、相関の有意性は分散分析によって検定を行った。

結 果

本研究では、検体を供試馬の年齢と精液採取時期(季節)によって冬季壮齢群(EM群)、冬季高齢群(EH群)、夏季壮齢群(LM群)および夏季高齢群(LH群)の4群に分け、これらについて比較を行った。なお、精液性状については季節差および年齢差の認められる項目が複数存在したため、年齢区分のみの比較あるいは季節区分のみの比較は実施しなかった。

1. 季節区分および年齢区分別精液性状

(1) 精液量、精子濃度および総精子数

各群における精液量、精子濃度および総精子数の平均値を表2に示した。

精液量は各群とも50 ml前後の値を示し、群間に差はみられなかった。

精子濃度を同一年齢区分間で比較すると、EM群(平均 2.475×10^8 /ml)がLM群(1.819×10^8 /ml)に比べ有意に高く($p < 0.05$)、明瞭な季節差が認められた。また、EH群(1.640×10^8 /ml)とLH群(1.259×10^8 /ml)の間にも同様の傾向が認められたが、両群の差は有意なものではなかった。一方、同一季節内で比較すると、EM群がEH群に比べ有意な高値を示し($p < 0.05$)、冬季には明瞭な年齢差が認められた。また、LM群とLH群の間にも同様の傾向が認められたが、両者の差は有意なものではなかった。

総精子数を同一年齢区分間で比較すると、夏季よりも冬季の方が高い傾向があった。すなわち、LM群よりもEM群が高値を、LH群よりもEH群が高値を示したが、群間の差は有意なものではなかった。また、同一季節内で比較すると高齢よりも壮齢の方が高い傾向があり、特に、EM群(106.09×10^8 /射精)とEH群(60.52×10^8 /射精)の差は有意なものであった。

($p < 0.01$)。

(2) 運動精子率、精子生存指数および不染精子率

各群における運動精子率、精子生存指数および不染精子率の平均値を表3に示した。

運動精子率を同一年齢区分間で比較しても各年齢に季節差は認められなかったが、同一季節内ではEH群(58.5%)よりもEM群(83.9%)が、LH群(52.1%)よりもLM群(87.0%)が有意に高く($p < 0.01$)、明瞭な年齢差が観察された。

精子生存指数を同一年齢区分間で比較すると運動精子率と同様に各年齢に季節差は認められなかった。しかし、同一季節内で比較すると明瞭な年齢差が認められ、EH群(43.5)よりEM群(63.8)、LH群(37.0)よりLM群(66.9)が有意に高値を示した($p < 0.01$)。

不染精子率について同一年齢区分間を比較すると夏季が冬季よりも高い傾向があり、特にEM群とLM群の差は有意なものであった($p < 0.05$)。一方、同一季節内で比較すると明瞭な年齢差が認められ、両季節ともに高齢に比べ壮齢が有意な高値を示した($p < 0.01$)。

(3) 精子奇形率、頭部奇形精子率、尾部奇形精子率および未熟精子率

各群における精子奇形率、頭部奇形精子率、尾部奇形精子率および未熟精子率の平均値を表4に示した。

精子奇形率はLM群がその他の群よりもやや低値を示したが、その他の群はほぼ同じ値を示し、各群間に差は認められなかった。

頭部奇形精子率について同一季節内を比較すると高齢が壮齢よりも高値を示す傾向がみられ、特にLH群とLM群との間には有意差が認められた($p < 0.01$)。

尾部奇形精子率を年齢区分に従って比較すると冬季よりも夏季に低値

を示す傾向がみられたが、その差は有意なものではなかった。また、季節区分に従って比較すると壮齢よりも高齢が高値を示す傾向が認められたが、その差は有意なものではなかった。

未熟精子率はLM群がその他の群よりもやや低値を示したが、その他の群はほぼ同じ値を示し、各群間に差は認められなかった。

2. SDS-PAGE およびイムノブロッティングの結果

SDS-PAGE 法で Tf 純品、Lf 純品および精漿を分画した結果を写真1に示した。

Tf 純品および Lf 純品を泳動したレーンにはそれぞれ1本のバンドのみが観察され、これらの純品が単一の蛋白質から構成されていることが明らかとなった。また、両蛋白質の移動度は近似しており、分子量マーカーから推定して分子量 80,000 に相当する位置の近くにバンドが認められた。一方、精漿レーンでは複数のバンドが認められ、そのうちの1本は Tf 純品および Lf 純品とほぼ同じ位置に認められた。

抗ウマ Tf 抗体および抗ウマ Lf 抗体を用いたイムノブロッティングの結果を写真2に示した。抗ウマ Tf 抗体で陽性の反応が認められたのは、Tf 純品のバンドと分画された精漿蛋白質バンドのうち1本であった。また抗ウマ Lf 抗体を用いた場合は Lf 純品のバンドと分画蛋白質バンドのうち1本が陽性となった。また、抗ウマ Tf および抗ウマ Lf の両抗体を用いた結果、精漿蛋白質のうち、1本の幅の広いバンドが陽性となった。精漿蛋白質から分画されたこの幅の広いバンドは、Lf 純品および Tf 純品から得られたバンドを合わせたくらいの範囲に観察された。以上のことより精漿中には Tf と Lf が存在していると判断されたが、2つのバンドが分離している像は確認できなかった。しかし、本研究で使用した Tf および Lf に対する抗体は互いに交差することなくそれぞれを認

識していることが明らかとなった。

3. 季節区分および年齢区分別精漿 Tf 値

各群における精漿 Tf 濃度と精漿総 Tf 量の平均値を表 5 に示した。

精漿 Tf 濃度と精漿総 Tf 量はほぼ同様の傾向がみられ、同一年齢区分間を比較すると冬季が夏季よりも高値を示す傾向がみられた。すなわち、EM 群(6.3 $\mu\text{g/ml}$, 277.0 μg)が LM 群(2.7 $\mu\text{g/ml}$, 131.5 μg)よりも有意に高く($p < 0.01$)、EH 群(7.6 $\mu\text{g/ml}$, 375.7 μg)と LH 群(5.4 $\mu\text{g/ml}$, 313.1 μg)の間にも同様の傾向が認められたが、両群の差は有意ではなかった。また、同一季節内を比較すると壮齢に比べて高齢が高値を示す傾向があり、特に精漿 Tf 濃度では EM 群と EH 群で有意な差が認められた($p < 0.05$)。

4. 季節区分および年齢区分別精漿 Lf 値

各群における精漿 Lf 濃度と精漿総 Lf 量の平均値を表 6 に示した。

精漿 Lf 濃度を同一年齢区分間で比較すると精漿 Tf 濃度の結果と異なり、壮齢では EM 群(268.1 $\mu\text{g/ml}$)が LM 群(178.4 $\mu\text{g/ml}$)よりも有意に高い値を示した($p < 0.01$)。しかし、高齢ではほとんど差が認められなかった。同一季節内で比較すると、精漿 Tf 濃度の結果とは逆に、高齢に比べて壮齢の方が高値を示す傾向があった。特に EM 群(268.1 $\mu\text{g/ml}$)と EH 群(148.5 $\mu\text{g/ml}$)との間には有意差があった($p < 0.01$)。

また精漿総 Lf 量においても精漿総 Tf 量の結果とは異なり、同一年齢区分間で比較すると壮齢では EM 群(11.8 mg)が LM 群(8.3 mg)に比べて有意に高く($p < 0.05$)、これに対して高齢では LH 群が EH 群に比べて高値を示した。同一季節内で比較すると EM 群は EH 群に比べ有意に高く($p < 0.01$)、明瞭な年齢差が認められた。また、LM 群と LH 群間にも同様の傾向がみら

れたが、両群の差は有意ではなかった。

5. 季節区分および年齢区分別精漿蛋白質値

各群における精漿蛋白質濃度と精漿総蛋白質量の平均値を表7に示した。

同一年齢区分間で比較すると、精漿蛋白質濃度および精漿総蛋白質量とも明瞭な季節差が認められた。すなわち、冬季よりも夏季で高値を示す傾向が認められ、LM群(17.3 mg/ml, 0.80 g)とEM群(11.8 mg/ml, 0.54 g)、LH群(15.8 mg/ml, 0.91 g)とEH群(8.6 mg/ml, 0.43 g)の両群において有意な差が認められた($p < 0.01$, $p < 0.05$)。また、精漿蛋白質濃度を同一季節内で比較すると高齢に比べ壮齢で高値を示す傾向があり、特にEM群とEH群間の差は有意であり($p < 0.05$)、明瞭な年齢差が認められた。また、LM群とLH群間にも同様の傾向が認められたが両群の差は有意ではなかった。一方、精漿総蛋白質量における同一季節内での比較からは一定の傾向は認められなかった。

6. 精漿 Tf 値、精漿 Lf 値および精漿蛋白質値と精液性状との関係

(1) 精漿 Tf 値と精液性状との関係

年齢および各精液性状と精漿 Tf 値との相関性を表8に示した。

精漿 Tf 濃度は年齢と $r=0.386$ の有意な正の相関関係が認められた($p < 0.0001$)。個々の値の散布状況は図3のとおりであり、 $Y=0.338X+0.739$ の回帰直線式が得られた。従って、精漿 Tf 濃度は加齢に伴い一定の割合で増加していくことが明らかとなった。一方、精漿 Tf 濃度と精液性状との関係をみると、造精機能のパラメーターである精子濃度および総精子数との間、また、精子の生存性と運動性のパラメーターである運動精子率、精子生存指

数および不染精子率との間に有意な相関は認められなかった。しかし、精子形成過程および成熟過程の異常を示す奇形精子に関するパラメーターの中で、頸部奇形精子率とは $r=-0.221$ の負の相関が($p<0.01$)、また頭体遊離率とは $r=0.176$ の正の相関性が認められた($p<0.05$)。

精漿総 Tf 量の相関性は精漿 Tf 濃度の場合とほぼ同様であり、年齢との間に正の相関($r=0.350$, $p<0.0001$)、また、頸部奇形率との間に負の相関($r=-0.163$, $p<0.05$)が認められた。

(2) 精漿 Lf 値と精液性状との関係

年齢および各精液性状と精漿 Lf 値との相関性を表 9 に示した。

精漿 Lf 濃度および精漿総 Lf 量は、精漿 Tf 値とは異なり年齢との相関は認められなかった。一方、精液性状との関係をみると、造精機能のパラメーターである精子濃度および総精子数との間に有意な強い正の相関が認められた。すなわち、精漿 Lf 濃度と精子濃度との間には $r=0.595$ ($p<0.0001$)の相関があり、 $Y=54.024X+100.41$ の回帰直線式が得られ(図 4)、精漿総 Lf 量と総精子数との間にも $r=0.635$ ($p<0.0001$)の正の相関があり、 $Y=0.061X+4.07$ の回帰直線式が得られた(図 5)。これらのことから、精漿 Lf 値は精子数の増減に伴ってその濃度と量が変化することが明らかとなった。また、精漿 Lf 値は精液量との間にも有意な相関が認められたが、精漿 Lf 濃度は $r=-0.216$ ($p<0.01$)の負の相関であり、精漿総 Lf 量は $r=0.378$ ($p<0.0001$)の正の相関であった。さらに、精子の生存性および運動性のパラメーターとの間では精漿 Lf 濃度と不染精子率との間に弱い負の相関($r=-0.190$, $p<0.05$)が認められたに過ぎなかったが、奇形精子に関するパラメーターとの間には興味ある相関が観察された。すなわち、精漿 Lf 濃度は未熟精子率($r=0.242$, $p<0.01$)、頭部奇形率($r=0.207$, $p<0.05$)、頭体遊離率($r=0.216$, $p<0.01$)および尾部欠損率($r=0.228$, $p<0.01$)と弱いながらも有意な正の相関が認めら

れ、正常精子率($r=-0.220$, $p<0.01$)との間には負の相関が認められた。これらの関係は精漿総 Lf 量との間にもほぼ同様に認められたが、精漿総 Lf 量と頭部奇形率には有意な相関は認められなかった。以上のことは Lf が精子の成熟過程に関与している機能蛋白であることを示唆するものである。

(3) 精漿蛋白値と精液性状との関係

年齢および各精液性状と精漿蛋白値との相関性を表 10 に示した。

精漿蛋白濃度は年齢および精子濃度とは有意な相関が認められなかったが、精子の生存性および運動性のパラメーターである運動精子率($r=0.198$, $p<0.05$)、精子生存指数($r=0.159$, $p<0.05$)および不染精子率($r=0.256$, $p<0.01$)と有意な正の相関が認められた。また、奇形精子のパラメーターの中では先体異常率と $r=0.214$ の正の相関が観察された($p<0.01$)。精漿総蛋白質量もほぼ同様の相関を示したが、総精子数との間に有意な正の相関が認められ($r=0.321$, $p<0.001$)、先体異常率との間には有意な相関が認められなかった。

7. 精漿 Tf 値、精漿 Lf 値および精漿蛋白値の関係

精漿 Tf 濃度と精漿 Lf 濃度、精漿 Tf 濃度と精漿蛋白濃度および精漿 Lf 濃度と精漿蛋白濃度の間にはそれぞれ正の相関がみられ、相関係数はそれぞれ $r=0.258$ ($p<0.01$)、 $r=0.186$ ($p<0.05$)および $r=0.253$ ($p<0.01$)であった。

また、精漿総 Tf 量と精漿総 Lf 量、精漿総 Tf 量と精漿総蛋白質量および精漿総 Lf 量と精漿総蛋白質量の間にもそれぞれ正の相関がみられ、相関係数はそれぞれ $r=0.331$ ($p<0.0001$)、 $r=0.454$ ($p<0.0001$)および $r=0.375$ ($p<0.0001$)であった。

考 察

精漿 Tf に関して、牛では総 Tf 量と精巢機能の指標となる総精子数に相関性があると報告されている[25]。また、ヒトでも Tf 濃度と精子濃度、総精子数、および精子運動性との相関性が報告されており[7]、臨床応用の一例として、精漿 Tf 濃度の著しい減少がみられる精子減少症の診断指標として用いられている[21]。しかし、本研究では Tf 値と精子濃度および総精子数は相関を示しておらず、馬では牛やヒトと異なる結果が得られた。ヒトに関する Bharshankar[10]の報告では 30 歳前後、牛に関する Roberts ら[91]の報告では 5 から 6 歳の個体から得たサンプルを使用しており、これらの報告は加齢に伴う変化、特に老化の影響を全く受けていないサンプルにみられた傾向と行うことができる。それに対し、本研究で用いた精漿サンプルは 6 から 27 歳までと幅広い年齢層から得たものであり、馬の場合も年齢を限定すればヒトや牛の場合と同様の傾向を示す可能性もあるが、全体をとおしてみると Tf 値は精巢機能の要因よりも年齢要因に大きな影響を受けていることが本研究から明らかとなった。精巢からの Tf 分泌を調節するとされるテストステロンは、季節繁殖動物である馬では季節に伴って変動することが報告されている[36,43,52,104]。Hoffmann ら[36]はテストステロンが 2 月から上昇し、4 から 5 月で最大になり、その後減少すると報告しており、本研究においても第 1 章で述べた様にテストステロン濃度は夏季が春季および秋季に比べて有意に高かった。本研究では、精漿 Tf 濃度は壮齢では明らかに冬季で高値を示し、前述の報告と一致するが高齢では明瞭な変化はみられなかった。また、総 Tf 量においても同様の傾向がみられた。この結果は壮齢では精漿 Tf がテストステロンによる調節を受けていることを示唆するが、高齢ではテストステロン以外の影響を受けている可能性を示唆しており、加齢(老化)が Tf 値を変動させ

る要因であると推定された。加齢(老化)に伴うテストステロンの変動について名和田ら[77]は、ヒトで加齢に伴ってテストステロン分泌の減少および精液性状の低下～悪化が起こると報告している。Stewart ら[104]は、2ヶ月から25歳までの馬を用いた研究で、血中テストステロン値は性成熟に達するまで上昇し性成熟後の変動は乏しいと報告しており、Johnson ら[43]も6ヶ月から20歳までの馬を用いた研究で同様の報告をしている。本研究に用いたサンプルの精液性状は全体を通して加齢とともに低下～悪化していく傾向が見られたが、精漿 Tf 値は精液性状とは逆に、加齢とともに明らかに上昇する傾向がみられ、精漿 Tf が加齢(老化)とともにテストステロンの影響を強く受ける精巣からの分泌に比べ副生殖腺からの分泌割合が増加する可能性が推測された。副生殖腺に由来する Tf が増加する原因として、副生殖腺自体が老化による影響を受けるか、あるいは老化により血管病変が生じ血漿成分が漏出することなどが考えられるが加齢に伴うこれらの変化についての報告は見当たらない。

精漿 Tf の由来に関して、ヒトではその 80%が精巣由来であり[103]、牛では 40%が副生殖腺由来であると報告されている[25]。馬の精子枯渇試験で得たサンプルについて Tf 値と精子濃度および総精子数が相関性を示す個体と示さない個体が観察され、相関を示す個体に関しては精漿 Tf の約 70%が精巣由来であり、示さなかった個体に関しては精子が枯渇された状態にあっても著しい Tf の増加が観察された(未発表データ)。このことは精漿 Tf が精巣のみに由来せず、射精口以降の部位つまり副生殖腺から多量の Tf が分泌されている個体が存在することを示唆しているものであり、馬において Tf を造精機能の指標として使用することは不適切であると判断される。今後は副生殖腺の組織学的検索を含む副生殖腺からの Tf の分泌機序と加齢(老化)に伴う変動を解明し、副生殖腺の状態および加齢(老化)の指標と

して Tf が使用できるかどうかについても検討を加える必要があると思われた。

精漿 Lf に関しては分泌源とその機能に関する報告が多く、精漿 Lf と精液性状については Buckett ら[13]がヒトの精子減少症と精子無力症のサンプルでは正常サンプルに比べて精液中 Lf が上昇すると報告している以外見当たらない。本研究で、精漿 Lf 濃度および総 Lf 量は精子濃度および総精子数と正の相関を示すことが明らかとなった。この結果は馬において精漿 Lf が造精機能の指標として用いられる可能性を示唆している。馬の精漿 Lf の由来に関して、Sophie[100]らは、精巣上体を精巣側から8区画に分け各部の灌流液中の Lf 濃度を測定し、精巣上体の中間部分(精巣上体体)において Lf が最も高濃度に含まれており精巣と精巣上体の境界部分における灌流液中からはほとんど検出されなかったと報告している。現在、馬において精巣上体以外からの精漿 Lf 分泌に関する報告は見当たらず、精漿 Lf が造精機能の指標になると結論づけるためには各部における Lf 分泌の有無とその分泌量の割合についての検討が必要である。

本研究において、精漿 Lf 濃度が精液量と負の相関を示したことは Lf の主な分泌部位が射精口以前にあり精漿の液状成分のほとんどを構成する副生殖腺からの分泌液中には存在しないか、存在したとしても少量であるということを示唆するものと考えられた。一方、総 Lf 量が精液量と正の相関を示したことから副生殖腺の分泌液中に Lf が存在することが示唆された。さらに、精子濃度と精漿 Lf 濃度の相関における回帰直線式 $Y=54.024X+100.41$ から、精子濃度を0と仮定した時の Lf 濃度は $100.41 \mu\text{g/ml}$ であり、全サンプルにおける平均精液量 49.15ml から一射精当たりの Lf 量は約 4.94mg と算出される。一方、総精子数と総 Lf 量の相関における回帰直線式は $Y=0.061X+4.07$ であり、精子数を0と仮定した時の総 Lf 量は 4.07mg であり、これらの数値は副生殖腺由来の Lf の存在を示すものであり、今後は副生殖

腺の分泌液中に含まれる Lf についてのさらなる検討が必要であると考えられる。

また、精漿 Lf 値は精子の成熟過程の指標となる正常精子率とも負の相関を示し、未熟精子率とは正の相関を示した。精子は精巣上体を移動する間にその表面に多種の糖蛋白質を結合させて成熟する事が報告されている[18,25,90]。Goodmanら[27]はヒトにおいて精子膜表面に Lf 結合部位があると報告しており、Dacheuxら[18]も同様に豚の精子表面に Lf 結合部位の存在を報告している。これらのことを考え合わせると、馬においても精巣上体機能が正常であれば、精子成熟の過程で精子表面に十分量の Lf が結合し精子の膜の安定化が起こることは想像に難くない。このため正常精子率の上昇に伴って精漿 Lf 値は減少し両者間に負の相関がみられるのではないかと考えられた。さらに、精漿 Lf 濃度が精子の生存性の指標となる不染精子率と負の相関を示すことは、正常精子率と同様の理由によるものと思われた。一方、正常精子率とは逆に、未熟精子が増加すると精子と結合できない Lf が精漿中に増加することとなり、未熟精子率と精漿 Lf 値が正の相関を示すものと考えられた。したがって、精漿 Lf が精子の成熟過程の指標、もしくは精巣上体の機能の指標となる可能性があり、今後この点に着目した検討が必要であると考えられた。

本研究の結果から、Tf は造精機能を反映しないが、副生殖腺の状態あるいは老化の指標として用いられる可能性が示唆され、今後は加齢(老化)に伴う Tf の分泌増加機序を解明する必要があると思われた。一方、精漿 Lf に関しては、精巣機能および精巣上体機能の指標となる可能性が示唆されたが、この結果を結論づけるためには精漿 Lf の由来部位の特定、および部位別分泌量を検討する必要がある。また、臨床的に応用が可能であるかを検討するために、臨床例における精漿 Lf の研究が必要であると考えられた。

要 約

本研究では、馬精漿 Tf および Lf 値の季節および加齢による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。

本研究には6から27歳のサラブレッド種雄馬28頭から採取した延べ154検体の精液を供試し、精漿 Tf および Lf をサンドイッチ ELISA 法、また蛋白質量を Lowry 法により測定した。供試した精液を採取時期で1月下旬から3月まで(冬季)と6月から8月まで(夏季)の2つの時期に分け、また、年齢で6から15歳(壮齢)と16歳以上(高齢)に区分して、サンプルを冬季壮齢群(EM 群)、冬季高齢群(EH 群)、夏季壮齢群(LM 群)および夏季高齢群(LH 群)の計4群に分けて比較を行った。

精液性状で有意な季節差は壮齢における精子濃度と不染精子率で認められ、前者では冬季が、後者では夏季が高値を示した。一方、冬・夏季ともに年齢差が認められた項目は、運動精子率、精子生存指数および不染精子率で、いずれも壮齢が高値を示した。冬季における精子濃度と総精子数に有意な年齢差が認められ、どちらも壮齢が高値を示した。また、頭部奇形精子率では夏季で壮齢より高齢が高値を示した。

精漿 Tf 濃度では、同一年齢区分間を比較すると冬季が夏季よりも高値を示す傾向がみられ、EM 群と LM 群間で有意な季節差が認められたが(6.3 vs 2.7 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0.01$)、EH 群と LH 群間で有意な差は認められなかった(7.6 vs 5.4 $\mu\text{g/ml}$)。また同一季節内を比較すると壮齢に比べて高齢が高値を示す傾向があり、EM 群と EH 群間で有意な年齢差が認められたが($p < 0.05$)、LM 群と LH 群間の差は有意ではなかった。さらに、精漿 Tf 濃度は年齢($p < 0.0001$)、頭体遊離率($p < 0.05$)と有意な正の相関を、頸部奇形率($p < 0.01$)と有意な負の相関を示した。Tf 値と精子濃度および総精子数は

相関を示さなかった。

精漿 Lf 濃度を同一年齢区分間で比較すると、壮齢では EM 群が LM 群より高く有意な季節差が認められたが(268.1 vs 178.4 μ g/ml, $p < 0.01$)、高齢では EH 群と LH 群間でほとんど差が認められなかった(148.5 vs 147.9 μ g/ml)。また、同一季節内での比較では、精漿 Tf 濃度とは逆に高齢より壮齢が高値を示す傾向があり、EM 群と EH 群間で有意な年齢差が認められたが($p < 0.01$)、LM 群と LH 群間の差は有意ではなかった。さらに、精漿 Lf 濃度と有意な正の相関を示したものは精巣機能の指標となる精子濃度($p < 0.0001$)と総精子数($p < 0.0001$)、精子形成・成熟過程の指標となる未熟精子率($p < 0.01$)、頭部奇形率($p < 0.05$)、頭体遊離率($p < 0.01$)および尾部欠損率($p < 0.01$)であり、有意な負の相関を示したものは副生殖腺機能の指標となる精液量($p < 0.01$)、精子生存性の指標となる不染精子率($p < 0.05$)および精子形成・成熟過程の指標となる正常精子率($p < 0.01$)であった。

精漿蛋白質濃度を同一年齢区分間で比較すると夏季が高い傾向があり、EM 群と LM 群間(11.8 vs 17.3 mg/ml)および EH 群と LH 群間(8.6 vs 15.8 mg/ml)で有意な季節差が認められた($p < 0.01$)。また同一季節内で比較すると、高齢に比べ壮齢で高値を示す傾向があり、EM 群と EH 群間で有意な年齢差が認められたが($p < 0.05$)、LM 群と LH 群間の差は有意ではなかった。さらに、精漿蛋白質濃度と有意な正の相関を示したものは精子生存・運動性の指標となる運動精子率($p < 0.05$)、精子生存指数($p < 0.05$)および不染精子率($p < 0.01$)と先体異常精子率($p < 0.05$)であった。

本研究の結果から、Tf は造精機能を反映しないが加齢(老化)の指標として用いられる可能性が示唆され、今後は加齢(老化)に伴う Tf の分泌増加機序を解明したうえで結論する必要がある。一方、精漿 Lf は精巣機能および精巣上体機能の指標となる可能性が示唆されたが、この結果を結論づ

けるためには精漿 Lf の由来部位の特定および部位別分泌量を検討する必要がある。

表1. 各群における例数

採取時期 \ 年齢区分	壮齢 6-15歳	高齢 16歳以上	計
冬季	60	24	84
夏季	51	19	70
計	111	43	154

表2. 各群の精液量、精子濃度、および総精子数の比較

採取時期 群 年齢区分		冬季		夏季	
		EM群	EH群	LM群	LH群
		壮齢	高齢	壮齢	高齢
精液量 (ml)	n	60	24	51	19
	mean	47.1	48.0	49.0	52.5
	SD	22.9	23.7	25.3	27.6
精子濃度 ($\times 10^8$ /ml)	n	58	23	51	19
	mean	2.475 ^a	1.640 ^{a'}	1.819 ^{a'}	1.259
	SD	1.644	1.406	1.552	1.451
総精子数 ($\times 10^8$ /ejac)	n	58	23	51	19
	mean	106.09 ^b	60.52 ^{b'}	86.25	55.04
	SD	71.60	32.30	86.01	51.89

a-a': p<0.05, b-b': p<0.01

表3. 各群の運動精子率、精子生存指数、
および不染精子率の比較

採取時期 群 年齢区分		冬季		夏季	
		EM群	EH群	LM群	LH群
		壮齢	高齢	壮齢	高齢
運動精子率	n	60	24	51	19
	mean	83.9 ^a	58.5 ^{a'}	87.0 ^b	52.1 ^{b'}
	SD	20.5	38.2	12.1	33.9
精子生存指数	n	60	24	51	19
	mean	63.8 ^c	43.5 ^{c'}	66.9 ^d	37.0 ^{d'}
	SD	19.9	32.7	16.3	27.7
不染精子率	n	59	24	51	19
	mean	82.5 ^{e,g}	65.4 ^{e'}	88.5 ^{f,g'}	67.7 ^{f'}
	SD	17.8	25.4	7.0	29.7

a-a', b-b', c-c', d-d', e-e', f-f': p<0.01, g-g': p<0.05

表4. 各群の精子奇形率、頭部奇形精子率、
尾部奇形精子率、および未熟精子率の比較

採取時期 群 年齢区分		冬季		夏季	
		EM群 壮齢	EH群 高齢	LM群 壮齢	LH群 高齢
精子奇形率	n	60	23	51	19
	mean	23.6	24.1	19.9	24.3
	SD	8.9	13.4	11.3	11.7
頭部奇形精子率	n	60	23	51	19
	mean	6.4	8.3	5.5 ^a	8.6 ^{a'}
	SD	2.8	5.3	3.8	5.0
尾部奇形精子率	n	60	23	51	19
	mean	10.5	11.6	9.0	10.6
	SD	6.3	8.7	6.5	7.5
未熟精子率	n	60	23	51	19
	mean	4.3	4.8	2.6	4.1
	SD	5.6	3.6	3.7	4.9

a-a': p<0.01

表5. 各群の精漿Tf濃度および精漿総Tf量の比較

採取時期 群 年齢区分		冬季		夏季	
		EM群 壮齢	EH群 高齢	LM群 壮齢	LH群 高齢
精漿Tf濃度 (μ g/ml)	n	60	24	51	19
	mean	6.3 ^{a,b}	7.6 ^{b'}	2.7 ^{a'}	5.4
	SD	4.6	5.0	1.6	5.0
精漿総Tf量 (μ g)	n	60	24	51	19
	mean	277.0 ^c	375.7	131.5 ^{c'}	313.1
	SD	251.6	330.4	117.4	427.9

a-a',c-c': p<0.01, b-b': p<0.05

表6. 各群の精漿Lf濃度および精漿総Lf量の比較

採取時期 群 年齢区分		冬季		夏季	
		EM群 壮齡	EH群 高齡	LM群 壮齡	LH群 高齡
精漿Lf濃度 (μ g/ml)	n	60	24 ^a	51 ^a	19
	mean	268.1 ^a	148.5 ^a	178.4 ^a	147.9
	SD	150.6	115.3	126.4	140.0
精漿総Lf量 (mg)	n	60	24 ^{b,c}	51 ^{b'}	19
	mean	11.8 ^{b,c}	6.0 ^{c'}	8.3 ^{b'}	7.1
	SD	8.0	3.6	6.2	6.5

a-a',c-c': p<0.01, b-b': p<0.05

表7. 各群の精漿Pr濃度および精漿総Pr量の比較

採取時期 群 年齢区分		冬季		夏季	
		EM群 壮齡	EH群 高齡	LM群 壮齡	LH群 高齡
精漿Pr濃度 (mg/ml)	n	60	24 ^{a,c}	51 ^a	19 ^{b'}
	mean	11.8 ^{a,c}	8.6 ^{b,c'}	17.3 ^a	15.8 ^{b'}
	SD	7.3	4.2	8.5	9.7
精漿総Pr量 (g)	n	60	24 ^d	51 ^{d'}	19 ^{e'}
	mean	0.54 ^d	0.43 ^e	0.80 ^{d'}	0.91 ^{e'}
	SD	0.40	0.32	0.52	0.81

a-a',b-b',d-d': p<0.01, c-c',e-e': p<0.05

表8. 精液性状と精漿Tf値との相関

項目	精漿Tf濃度との 相関係数	精漿総Tf量との 相関係数
年齢	0.386 ***	0.350 ***
精液量	-0.035	0.440 ***
精子濃度	0.057	-0.106
総精子数	-0.010	0.119
運動精子率	-0.044	0.007
精子生存指数	-0.044	0.020
不染精子率	-0.104	0.008
精子奇形率	0.058	0.083
正常精子率	-0.086	-0.092
未熟精子率	0.091	0.054
先体異常率	0.014	-0.050
頭部奇形率	0.051	0.060
頸部奇形率	-0.221 **	-0.163 *
尾部奇形率	-0.040	0.036
頭体遊離率	0.176 *	0.100
頭部欠損率	-0.109	-0.081
尾部欠損率	0.158	0.113

* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001

表9. 精液性状と精漿Lf値との相関

項目	精漿Lf濃度との 相関係数	精漿総Lf量との 相関係数
年齢	-0.127	-0.154
精液量	-0.216 **	0.378 ***
精子濃度	0.595 ***	0.342 ***
総精子数	0.425 ***	0.635 ***
運動精子率	-0.110	0.034
精子生存指数	-0.073	0.060
不染精子率	-0.190 *	-0.007
精子奇形率	0.142	0.152
正常精子率	-0.220 **	-0.201 *
未熟精子率	0.242 **	0.181 *
先体異常率	0.090	-0.044
頭部奇形率	0.207 *	0.101
頸部奇形率	-0.093	-0.009
尾部奇形率	-0.064	0.011
頭体遊離率	0.216 **	0.184 *
頭部欠損率	0.078	0.047
尾部欠損率	0.228 **	0.271 ***

* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001

表10. 精液性状と精漿蛋白質値との相関

項目	精漿蛋白質濃度 との相関係数	精漿総蛋白質量 との相関係数
年齢	-0.075	0.013
精液量	-0.033	0.628 ***
精子濃度	0.137	-0.052
総精子数	0.146	0.321 ***
運動精子率	0.198 *	0.163 *
精子生存指数	0.159 *	0.161 *
不染精子率	0.256 **	0.258 **
精子奇形率	-0.044	0.010
正常精子率	0.015	-0.009
未熟精子率	0.048	-0.006
先体異常率	0.214 **	0.105
頭部奇形率	-0.060	-0.028
頸部奇形率	0.051	0.039
尾部奇形率	-0.076	0.019
頭体遊離率	0.081	0.011
頭部欠損率	0.101	0.010
尾部欠損率	-0.014	0.018

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$

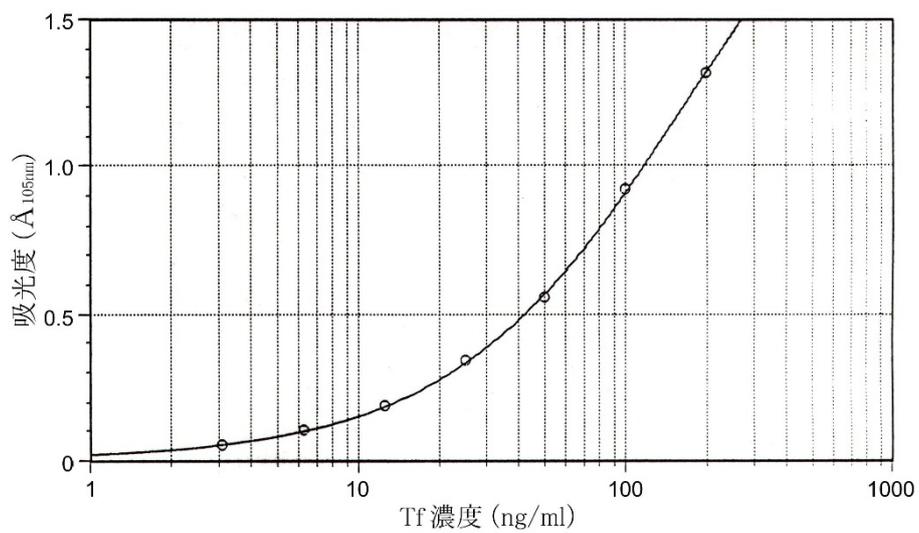


図 1. Tf サンドイッチ ELISA 標準曲線

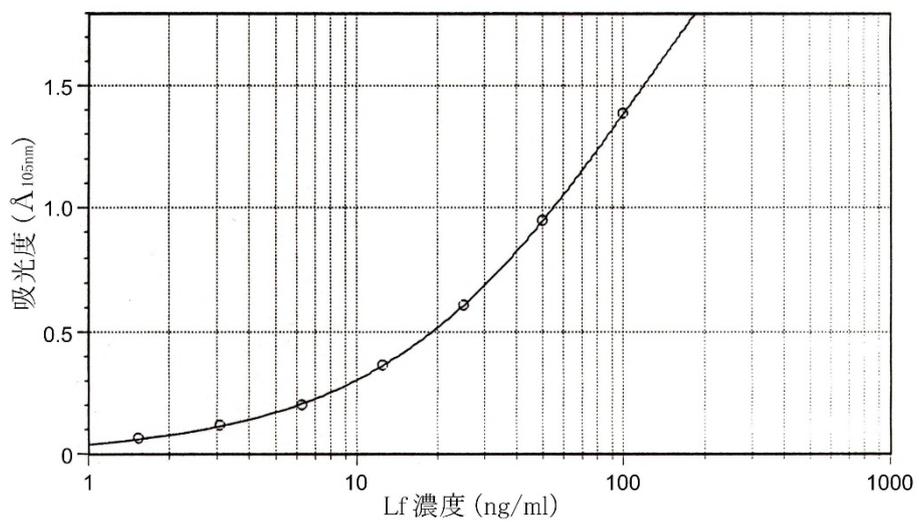


図 2. Lf サンドイッチ ELISA 標準曲線

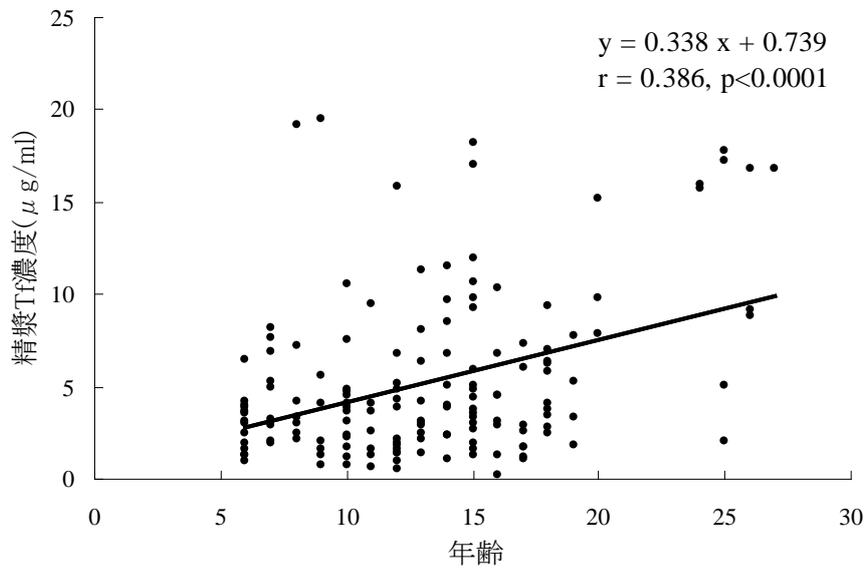


図3. 年齢と精漿 Tf 濃度の関係

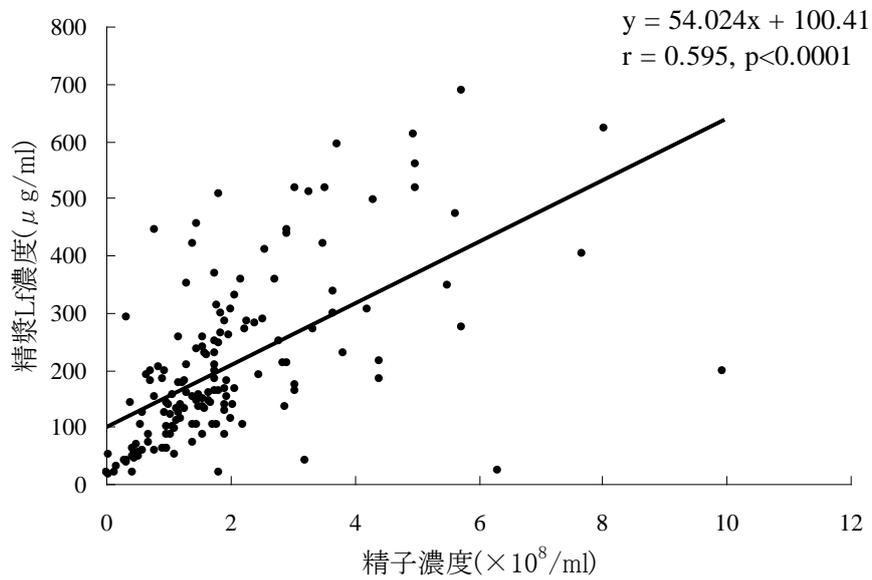


図4. 精子濃度と精漿 Lf 濃度の関係

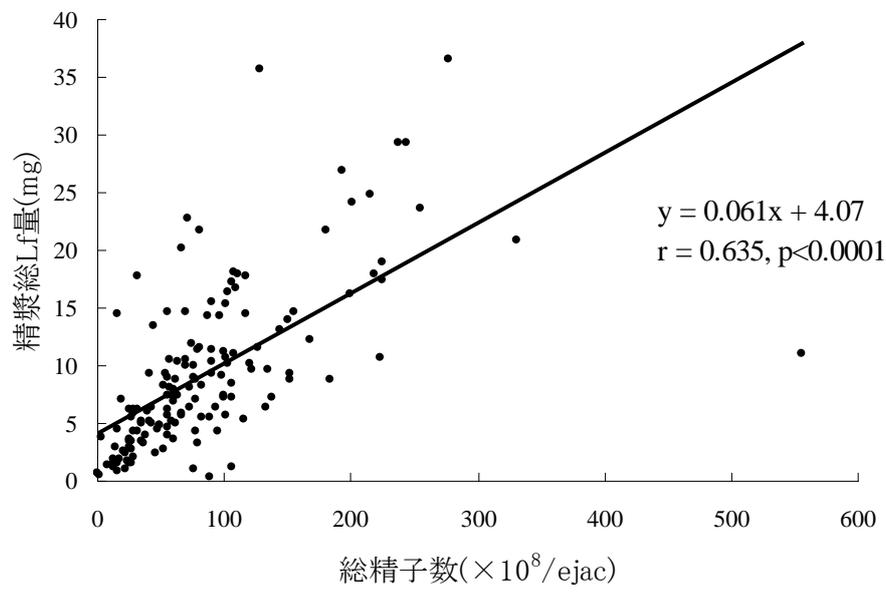


図5. 総精子数と精漿総Lf量の関係

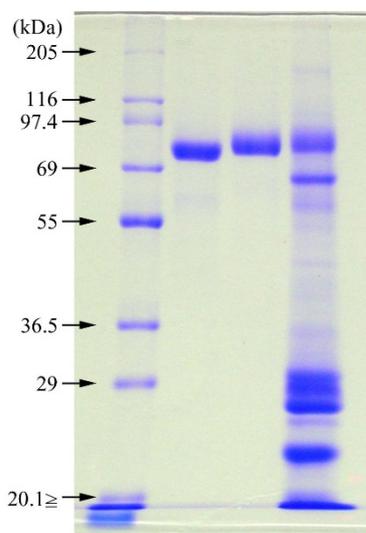


写真 1. SDS-PAGE

左から、分子量マーカー、Tf 純品、Lf 純品、精漿サンプル
 (蛋白濃度を 1~2mg/ml に調整したもの 20 μ l を泳動)

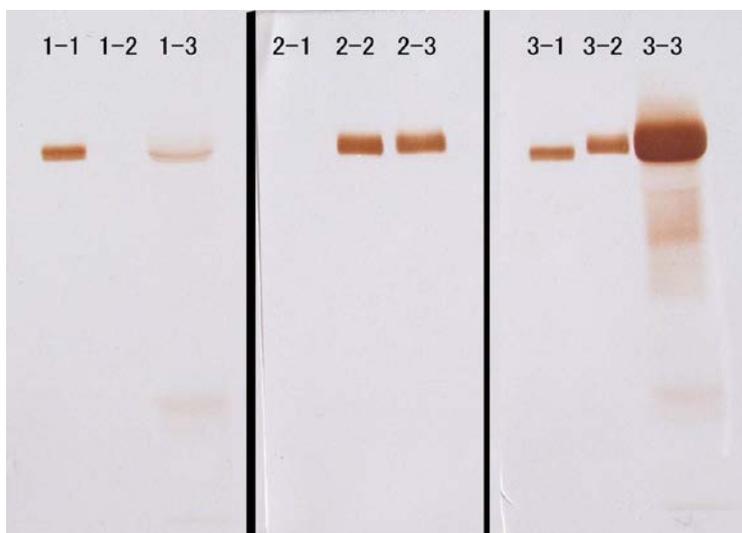


写真 2. ウェスタンブロット

1-1~1-3: 抗 Tf 抗体
 2-1~2-3: 抗 Lf 抗体
 3-1~3-3: 抗 Tf および抗 Lf 抗体

第5章

馬精漿中精子前進運動促進因子に関する研究

序 論

哺乳類では精細管内でセルトリ細胞に接しながら変態を完了した精子は、精細管腔に遊離し、曲精細管、直精細管、精巣網、精巣輸出管、精巣上体頭部および精巣上体体部を経て、精巣上体尾部に達し、ここで射精まで貯蔵される。精細管で形成された精子は、精巣上体を通過する過程で、質的、機能的変化をして成熟する。精巣上体頭部の精子は前進する運動機能を持っていないが、尾部へ到達するまでにその機能を獲得し、牛精子では精巣上体液中の前進運動化タンパク質(FMP)を取り込むことで、旋回運動が前進運動に変換されると言われている[39]。しかし、多くの動物種で実際に精巣上体尾部から取り出した精子は、その場で旋回、振子運動を行うのみで前進運動を行わないものがほとんどである[72]。

筆者が行った馬の精巣上体尾精子を用いた実験では、精巣上体尾精子を精子保存液で希釈しても前進運動を示す精子の割合は変化しないか僅かに増加するだけであるが、精漿を添加すると前進運動精子の割合の増加と活力の明らかな上昇が見られた。このことは、馬では単に前進運動抑制因子が射精の際に精漿で希釈されて精子の前進運動が活性化するだけではなく、精漿中の前進運動促進因子が関わっていると考えられる。

精漿は精巣上体、精管、および副生殖腺である精嚢腺、前立腺、尿道球腺からの分泌物で構成される。精漿の化学組成は動物種により異なり、その差は副生殖腺の機能・形態の差を反映していると言える。精漿中には副生殖腺由来のフルクトースを主成分とする還元糖をはじめ、有機酸、脂質、アミノ酸、各種酵素、無機物が含まれている。精漿中の精子前進運動促進因子として、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 HCO^{3-} といった無機物[38]、cAMP 依存性プロテインキナーゼといった酵素[38]、コレステロールやリン脂質といった脂質[3]、メチ

オニンといったアミノ酸[51]が関与していることが牛、豚、羊、犬、ハムスター、ラット、チンパンジーで報告されている。また近年では、セレンウム[9]、LDH[84]、ACE[5]、カルニチン[105]などが精子の前進運動の促進に関与していると報告されている。しかし、こうした研究の多くは射出精液を用いて実験が行われており、馬の精巣上体尾部の貯蔵精子に対して精漿がどのような作用を及ぼすかについての研究は少ない。

そこで本研究では精子保存液により、精漿に感作される前の運動性の低い精巣上体尾精子を灌流して採取したものを実験に用いた。精漿の処置は、馬の精漿成分の抽出として蛋白質と脂質成分の抽出を行い、精漿を分子量で分画し 30,000～3,000 以下の精漿成分も作製した。これらを精子に添加し、馬の精子運動性に与える影響を考察することで、馬の精子前進運動促進因子の検討を行った。

材料と方法

1. 供試動物

本研究には年齢1～10歳(平均4.2歳)、体重120～900kg(平均454.1kg)の雄馬16頭(A～P)から採取した精巢および精巢上体を供試した。各供試馬の品種、年齢および体重は表1に示すとおりである。これらのうち供試馬A～C、I、J、NおよびPは使役目的を乗用とするため去勢を希望して来学し、本学動物病院で手術を行ったものである。また、供試馬その他の供試馬は食用にと畜場でと殺されたもので、その際に精巢および精巢上体の提供を受けたものである。供試馬から採取した精巢および精巢上体は直ちに研究室に持ち帰り、後述する方法に従って処理し、精巢上体尾内の精子を採取して実験に用いた。

また、本研究に用いた馬精漿は、日本軽種馬協会より供与されたもので、年齢8～22歳(平均13.9歳)のサラブレッド種種牡馬15頭から、2010年7月に採取したもの、および年齢11～24歳(平均16.7歳)のサラブレッド種牡馬3頭(SS、RD、DJ)から2013年6月に採取したものである。各馬の精漿採取時の精液性状は表2に示したとおりである。

2. 実験用ウマ精子の調整

(1) スキムミルク液の調整

本研究で行った精巢上体尾の灌流と灌流液中の精子濃度の調節には、Pickettら[1,33]が報告したスキムミルク-卵黄-グリセロール液から、卵黄、グリセロールおよび抗生物質を除いたものを用いた。

実験に使用したスキムミルク液(以下SM液)の組成は表3に示した通りである。すなわち、SM液1L中にドライスキムミルク(ナカライテスク、京都)55.75g、

グルコース(和光純薬工業、大阪)27.64 g、クエン酸三ナトリウム二水和物(関東化学、東京)0.3 g、ラクトース(和光純薬工業、大阪)1.5 g、ラフィノース(シグマアルドリッチ)1.5 g、クエン酸カリウム(関東化学、東京)0.42 g、及び HEPES(同仁化学研究所、熊本)7.14 g が含まれるように蒸留水を用いて調整したものを SM 液として用いた。完成した SM 液は室温(約 25℃)で保管し、使用当日に作成したものだけを用いた。

(2) 灌流方法と灌流精子の処理

精巣上体管の灌流に先立ち、摘出した精巣と精巣上体を分離し、精巣上体体部の中央部を結紮した後、精管の結紮部を切断し、断端から精巣上体側に灌流針(20 Gの注射針の先端を鈍性にしたもの)を挿入し、抜け落ちないように固定した。次いで、精巣上体尾部の精巣上体管を覆う鞘膜臓側板を剥離後、結合組織を剥離しながら精巣上体体部と尾部の移行部の精巣上体管を単離後切断した。次いで灌流針より SM 液 20 ml を用いて上行性に灌流し、精子を含む灌流液を 50 ml ファルコンチューブ(日本ベクトン・ディッキンソン、東京)に回収し、後述する検査を行うまで室温(約 25℃)で保管した。

3. 灌流精子の性状検査

灌流した精子は回収直後に色調、臭気等の肉眼検査と顕微鏡検査に供した。採取直後の検査では、灌流精子の精子濃度を計数し、SM 液で希釈することで精子濃度を一定にした。この希釈精子を用いて、精子活力及び精子生存率についての検査を行った。なお、精子濃度の検査は分取した検体について室温で実施したが、活力と生存性に関しては検体を 37℃の恒温槽中で温めてから実施した。

精子濃度は血小板数算定用ディスポーザブル血液希釈用ピペット(ユノペット 5855、日本ベクトン・ディッキンソン、東京)を用いて精液を100倍希釈した後、トーマ式血球計算盤(Elma社)を用いて顕微鏡下で計数し算出した。これにより算出された精子濃度が、 2×10^8 /mlになるようにSM液で希釈したものを実験に使用した。ただし、灌流直後の精子濃度が 2×10^8 /mlを下回るものについては、希釈せずにそのまま実験に供した。

精子活力は37°Cの保温板で保温した0.6 ml マイクロチューブ(Molecular Bio Product USA)中で、希釈精子100 μ lと37°Cに加温したSM液100 μ lをよく攪拌し、37°Cの温湯で40秒間加温したものを材料とし、農研式精液性状検査板(富士平工業)を用いて行った。精子の運動性を顕微鏡下で観察し、運動性のないもの(-)から最も活発な前進運動を行うもの(+++)までを5段階に分けて評価し、前進運動精子率および++以上の活力を示す精子の割合(活発運動精子率)を求めた。

精子生存率は、37°Cの恒温槽で温めた1%エオジン液と希釈精子を等量混合したものを塗抹して行う生死鑑別染色法を実施し、エオジンに不染の精子の割合を計数して求めた。なお、エオジン液は、クエン酸三ナトリウム二水和物(関東化学、東京)の2.9%水溶液を溶媒として、エオジン Y(関東化学、東京)の1%溶液を作製して使用した。

4. 精漿の処理

精漿の処理は、馬の精漿成分の抽出を目的に行った。つまり、供試した15頭分の馬精漿を全て混和した後に-20°Cに保管してあったものを融解して室温に戻し、1.5 ml マイクロチューブ(Molecular Bio Products USA)に分注した。これを16,000 \times gで30分間遠心し、上澄み部分を馬全精漿(horse whole seminal plasma: HWsp)とし、再度凍結保存した。また、

HWsp を使用する際には、室温で自然融解してから使用した。

(1) 馬の精漿蛋白質画分および除蛋白質画分の作製

蓋付き試験管に HWsp 1 ml と -20°C に冷却したアセトン(関東化学東京) 4 ml を加え、10 分間攪拌した。試験管を -80°C で 1 時間静置後に再度攪拌し、1.5 ml マイクロチューブに 1.25 ml ずつ採取して $1,632\times g$ で 10 分間遠心した。上澄み(除蛋白質精漿とアセトンの混合物)をそれぞれマイクロチューブに採取し、陰圧をかけて一晩アセトンを揮発させた。その後、残余の液状部分も凍結乾燥装置(NEOCOOL ヤマト株式会社)で凍結乾燥させ、これに蒸留水 0.25 ml を加えて 20 分間攪拌したものを蛋白質除去精漿(protein free seminal plasma: PrFsp)とした。一方、析出した蛋白質は PrFsp と同様にアセトンを揮発させた後、SM 液を 0.25 ml 添加後 20 分攪拌して溶解させたものを精漿蛋白質画分(protein fraction of seminal plasma: Prsp)とした。なお、PrFsp は実験に使用するまで -20°C で凍結保存し、Prsp は析出した蛋白質からアセトンを揮発させたものを -20°C で保存し、実験に使用する際に前述の溶解操作を行った。

(2) 馬精漿の限外濾過処理画分の作製

限外濾過操作に先立ち、精漿の超遠心処理を行った。精漿は -20°C に凍結保存しておいた供試馬 15 頭の混合精漿を融解して用いた。超遠心には BECKMAN 社製多機能型超遠心機(Optima LE-80K)にローター SW28(BECKMAN)を組み合わせたものに、精漿を入れた超遠心用 40 ml 専用チューブ(40PC チューブ)をセットして、 $100,000\times g$ で 90 分間遠心した。遠心終了後、上清部分を回収し、超遠心処理精漿(ultra centrifuged seminal plasma: UCsp)として -20°C で凍結保存した。

精漿の限外濾過には、分子量 30,000 以下の成分を濾過できる Amicon Ultra-0.5 mL 遠心式フィルター(Millipore)を用いた。サンプルである融解

した UCsp 0.5 ml を専用バイアルに取り付けたサンプルレシーバーに入れ、 $14,000 \times g$ で 12 分間遠心し、管底に濾過された分子量 30,000 以下の低分子領域を低分子精漿 (low molecular seminal plasma: Lmsp) とした。その後、新たなバイアルにサンプルレシーバーを逆さに取り付けて、 $1,000 \times g$ で 3 分間遠心して分子量 30,000 以上の高分子領域を回収し、高分子精漿 (high molecular seminal plasma: Hmsp) として用いた。これら Lmsp および Hmsp は 0.6 ml マイクロチューブに -20°C で保管し、使用する際はそれぞれを 37°C の恒温槽で温度を一定にしてから使用した。

また、3頭の精漿提供馬 SS、RD、DJ については、分子量 10,000 以下の成分を濾過できる Amicon Ultra-4ml 10K-device (Millipore) と分子量 3,000 以下の成分を濾過できる Amicon Ultra-4ml 3K-device (Millipore) を用いて、より低分子のものだけが含まれる精漿分画を作製した。これらはいずれも $4,000 \times g$ で 3K-device は 30 分間、10K-device は 20 分間遠心して、管底に回収されたものを分子量 3,000 以下の画分 ($\leq 3\text{K}$) と、分子量 10,000 以下の画分 ($\leq 10\text{K}$) とした。

(3) 馬の精漿脂質画分および除脂質画分の作製

蓋付き試験管に入れた HWsp 1 ml にジエチルエーテル 4 ml を加えて混和し、20 分攪拌後、 4°C 、 $1,632 \times g$ で 50 分間遠心してから冷蔵庫に 4 時間静置した。さらに 4°C 、 $1,632 \times g$ で 20 分間遠心し、試験管内で 2 層に分離したうちの下層部分をキャピラーレで採取し、1.5 ml マイクロチューブに入れて蓋を開けたまま陰圧をかけて一晩エーテルを揮発させた。このエーテルを揮発させた液状成分に、1 ml の SM 液を加えて溶解させたものを、脂質除去精漿 (fat free seminal plasma: FFsp) とした。上層のエーテル層は -80°C で管壁に付着する水分を凍結させた後にデカントで小試験管に採取し、窒素ガスをかけながら 50°C で乾固させた。この乾固物に SM 液 1 ml を加えて

20 分間攪拌して溶解させたものを、精漿内脂質画分 (fat fraction of seminal plasma: Fsp) とした。また、それぞれに SM 液を加えていない状態で密閉して -20°C で保存し、使用する前に室温で溶解したのち SM 液を加え、 37°C の恒温槽で温度を一定にしてから使用した。

(4) 精漿のプロテアーゼ処理試料の作製

本操作には、次の 3 つの試薬を用いた。

- ① トリス/HCl 緩衝液 : トリスヒドロキシメチルアミノメタン (和光純薬工業) 0.242 g、塩化ナトリウム (関東化学、東京) 0.85 g を蒸留水に溶かし、塩酸 (関東化学、東京) で pH 7.5 に調整後、100 ml とした。
- ② プロテイナーゼ K 液 : プロテイナーゼ K (関東化学、東京) $5\ \mu\text{l}$ と トリス/HCl 緩衝液 $495\ \mu\text{l}$ を混和し、100 倍希釈液を作製した。
- ③ ペファブロック SC 液 : プロテアーゼインヒビターであるペファブロック SC (メルク) 0.0048 g を トリス/HCl 緩衝液 1 ml で溶解し 20 mM 溶液を作製した。

室温で融解した HWsp 1 ml を トリス/HCl 緩衝液 1 ml と混和し、プロテイナーゼ K 液 $20\ \mu\text{l}$ を添加して攪拌後、室温で一晩放置して反応させた。その後ペファブロック SC 液 $20\ \mu\text{l}$ を添加し、20 分間放置して反応を停止させ、プロテアーゼ処理試料 (protease treatment seminal plasma: PTsp) とした。プロテアーゼ処理試料の陽性コントロールとして、プロテイナーゼ K 液 $20\ \mu\text{l}$ とペファブロック SC 液 $20\ \mu\text{l}$ をあらかじめ混和し、20 分間放置したものを、HWsp 1 ml と緩衝液 1 ml に添加したものを作製した。なお、この処理は 3 頭の精漿提供馬 SS、RD、DJ について実施した。

(5) 精漿の加熱処理試料の作製

凍結保存していた HWsp を室温で融解したものを 15 ml ファルコンチューブに入れ、 70°C の恒温槽で 1 時間加熱し、加熱処理試料 (heat treatment

seminal plasma: HTsp)とした。なお、この処理は3頭の精漿提供馬 SS、RD、DJ について実施した。

5. 精漿添加実験

本研究では、前述の供試馬8頭の希釈精子に、前項4に記述した馬の各種精漿成分、あるいは異なる動物の精漿を添加して、精子運動性の変化を観察した。試験操作は添加するサンプルの違いを除けば同一で、37℃の保温板で保温した 0.6 ml マイクロチューブ(Molecular Bio Product USA)に希釈精子を 100 μ l 分注し、そこに 37℃に加温しておいた各種精漿成分および各種動物の精漿をそれぞれ 100 μ l 加え、よく攪拌後、40 秒間 37℃の温湯で加温してから、精子活力検査を実施した。なお、この検査は二重盲検法で実施し、サンプルを取り扱うものと観察者の思いこみが結果に反映されないように努めた。これら各々の精子活力検査の結果から、+以上の活力を示す前進運動精子率、および++以上の活力を示す精子の割合(活発運動精子率)を算出した。

本実験は、馬精子の運動性に対する各種馬精漿成分添加の効果を検討するため、陰性コントロール(negative control: Ncont)として SM 液の添加、また陽性コントロール(positive control: Pcont)として HWsp を添加したのを用い、馬精子の運動性を比較した。

(1) 馬精子の運動性に対する精漿蛋白成分の影響

本試験ではアセトンにより精漿蛋白を除去した精漿 PrFsp およびアセトンによって析出させた精漿蛋白質画分 Prsp を添加する区を設けた。また、アセトンで析出させた蛋白質は変性し機能を失っている可能性も考えられたため、精漿を限外濾過処理して得られた分子量 30,000 以下の蛋白質を含む Lmsp と分子量 30,000 以上の蛋白質を含む Hmsp を添加する区も設けて、

各成分添加後の精子運動性の観察を行った。さらに、3頭の精漿提供馬 SS、RD、DJ に関しては分子量 3,000 以下の画分 ($\leq 3K$) と、分子量 10,000 以下の画分 ($\leq 10K$) を添加する試験を追加して行った。

(2) 馬精子の運動性に対する精漿脂質成分の影響

本試験ではジエチルエーテルで脱脂した馬精漿 (FFsp) およびジエチルエーテルで抽出した精漿脂質画分 (Fsp) を添加する区を設け、精子の運動性の変化を検討した。

(3) 馬精子の運動性に対するプロテアーゼ処理精漿の影響

本試験では SM 液を添加したものを陰性コントロール (Ncont) とし、陽性コントロール (Pcont) にはプロテイナーゼ K 液とその阻害剤であるペファブロック SC 液をあらかじめ混和したものを HWsp に添加したものをを用い、プロテアーゼ処理精漿 PTsp 添加による精子の運動性の変化を検討した。

(4) 馬精子の運動性に対する加熱精漿の影響

本試験では SM 液を添加したものを陰性コントロール (Ncont)、HWsp を添加したものを陽性コントロール (Pcont) とし、精漿 HTsp 添加による精子の運動性の変化を検討した。

結 果

1. 実験に用いた精巢上体尾灌流精子の性状

実験に用いた灌流精子の濃度、生存率および精子活力++以上の運動性を示す精子の割合(活発精子運動率)を表4に示した。

希釈精子濃度は、SM液によりおよそ 2×10^8 /mlに調整して実験に供したが、供試馬 F では灌流時の濃度が 2×10^8 /mlに達しなかったため、灌流で得られた濃度($0.53 \sim 1.25 \times 10^8$ /ml)のまま実験に使用した。精子生存率は80%を上回るものが多かったが、供試馬 B、E、G では80%を下回りやや低い値であった。本実験で精子運動亢進の判定に用いた活発運動精子率は、無処置の状態で5%~50%と開きが大きく、とくに供試馬 D では50%と他に比べて極めて高い値となった。このため、活発運動精子率について有意水準1%の棄却検定を行ったところ、供試馬 D のみ棄却されたため、後述する実験結果は供試馬 D のデータを除外して取り纏めたものである。なお、本実験では SM 液で希釈して得られた活発精子運動率を陰性対照(Ncont)として取り扱った。

2. 馬精子の運動性に対する処理精漿添加の影響

各供試馬の精子に馬全精漿(HWsp)を添加したときの活発運動精子率の変化について表5には個別に、また図1には全例の平均値(平均±標準偏差)で示した。

供試馬 C を除く6頭では、HWsp 添加後の活発運動精子率は増加し、その幅は10~80%とばらつきが大きかった。また、供試馬 C では変化が見られず、活発運動精子率は10%のままであった。全頭の平均で見ると活発運動精子率は無処置で $11.4 \pm 6.3\%$ であったものが、HWsp 添加後 $51.4 \pm$

25.9%に増加し、両者には統計上有意な差が認められた($p < 0.01$)。なお、本実験ではHWspを添加して得られた活発精子運動率を陽性対照(Pcont)として取り扱った。

(1) 馬精子の運動性に対する精漿蛋白成分の影響

1) 馬精漿蛋白画分(Prsp)および馬精漿除蛋白画分(PrFsp)の添加

アセトンで析出させた精漿蛋白画分(Prsp)と同時に得られた除蛋白精漿(PrFsp)を添加したときの活発運動精子率の変化について表6には供試馬ごとに、また図2には全例の平均値(平均±標準偏差)で示した。

Prsp 添加後の活発運動精子率は、増加したもの、減少したものおよび変化がなかったものに分けられた。活発運動精子率の増加は供試馬 7 頭中 4 頭に見られ(A、B、F および H)、その増加幅は 15～30%であった。また、減少したものは供試馬 C および E の 2 頭で、減少幅は 5～10%であった。なお、供試馬 G では変化が見られず、活発運動精子率は 20%のままであった。

一方、精漿除蛋白画分(PrFsp)を添加した際の活発運動精子率も増加したもの、減少したものおよび変化がなかったものに分けられた。増加したものは供試馬 7 頭中 2 頭(G および H)、また減少したのも 2 頭(C および E)であり、その変化の幅は小さく 5～10%であった。なお、供試馬 A、B および F では変化が見られなかった。

全頭の平均値で比較すると、PrFsp では活発運動精子率に変化は見られず Ncont とほぼ同じ $12.1 \pm 9.1\%$ であったが、Prsp 添加では活発運動精子率の増加傾向が見られ $21.4 \pm 12.5\%$ となったが、Pcont に比べ増加幅が小さく、Ncont との間にも統計的な差は認められなかった。

2) 馬精漿の限外濾過処理画分の添加

アセトンによる精漿蛋白質の抽出法では、蛋白質の変性が起こることから、変性が起こらない限外濾過により、蛋白質を含む精漿を分子量で分けたも

のを添加した。

低分子精漿(Lmsp)と高分子精漿(Hmsp)を添加したときの活発運動精子率について表7には供試馬ごとに、また図3には全例の平均値(平均±標準偏差)で示した。

Lmsp 添加後の活発運動精子率は全ての供試馬で増加した。最も活発運動精子率が向上したのは供試馬 A で、活発運動精子率が 80%と Ncont と比較して 16 倍にまで増加した。逆に最も活発運動精子率の向上が低かったのは供試馬 E で、活発運動精子率が 25%と Ncont と比較して 1.25 倍の値であった。

一方、Hmsp 添加後の活発運動精子率は増加したもの、減少したものおよび変化がなかったものに分けられた。活発運動精子率の増加は供試馬 7 頭中 4 頭に見られ(A,B,F および H)で、その増加幅は 5~55%であった。また、減少したものは供試馬 E および G の 2 頭で、減少幅は 5 および 20%であった。なお、供試馬 C では変化がなく、活発運動精子率は 10%であった。

全頭の平均値で比較すると、Lmsp 添加では $51.4 \pm 19.1\%$ と Pcont と同様の亢進が見られ、Ncont の 11.4%との間にも統計的な差が認められた ($p < 0.01$)。

また、Hmsp 添加では活発運動精子率の増加傾向が見られ $24.3 \pm 20.5\%$ となったがばらつきが大きく Ncont との間に統計的な差は認められなかった。

(2) 馬の精漿脂質画分(Fsp)および除脂質画分(FFsp)の影響

精漿脂質画分(Fsp)と精漿除脂質画分(FFsp)を添加したときの活発運動精子率の変化について表8には供試馬ごとに、また図4には全例の平均値(平均±標準偏差)で示した。

Fsp 添加後の活発運動精子率は増加したもの、減少したものおよび変化がなかったものに分けられた。活発運動精子率の増加は供試馬 F の1頭のみでみられ、活発運動精子率は3倍の 30%に向上した。また、減少したものは供試馬 A,E および H の3頭で、減少幅は全例とも小さく5%であった。なお、供試馬 B,C および G では変化がみられなかった。

一方、FFsp 添加後の活発運動精子率は供試馬 E を除いて増加し、Ncont と比較して 1.5~8倍にあたる 15~55%にまで増加した。供試馬 E は活発運動精子率が 20%と Ncont と変化しなかった。

全頭の平均値で比較すると、Fsp 添加では Ncont とほぼ同様の $12.1 \pm 10.4\%$ であったが、FFsp 添加では Pcont に比べ低いものの $31.4 \pm 13.8\%$ まで活発運動精子率の増加が見られ、Ncont との間に統計的な差が認められた ($p < 0.05$)。

以上の結果から、精子前進運動促進因子は分子量 30,000 以下の蛋白質である可能性が示されたため、より低分子の分画について試験をすると共に、精子前進運動促進因子が蛋白質であることを確かめるために3頭の精漿を用いて追加実験を実施した。

(3) 馬精漿の限外濾過処理画分 ($\leq 10K$ および $\leq 3K$) 添加の影響

1) 精子提供馬 I~P の陰性および陽性コントロールに対する反応

全精漿 (HWsp) を添加したときの活発運動精子率について表 9 には精子提供馬ごとに、また図 5 には精子提供馬全例の平均値 (平均 \pm 標準偏差) で示した。

精子提供馬の精子懸濁液に、精漿提供馬の HWsp を添加した時の活発運動精子率は全てで増加し、その増加幅は馬 SS で 30~60%、馬 RD で 30~60%、馬 DJ で 20~70%であった。

これらの活発運動精子率の平均を見ると、馬 SS は $53.8 \pm 9.9\%$ 、馬 RD は $53.8 \pm 11.1\%$ 、馬 DJ は $55.0 \pm 16.6\%$ であり、精漿提供馬 3 頭の間で有意差は認められなかった。よって精漿提供馬 3 頭の平均値で比較すると、活発運動精子率は無処置で $9.4 \pm 12.9\%$ だったものが HWsp 添加後 $54.2 \pm 10.0\%$ に増加し、両者には有意な差が認められた ($p < 0.01$)。

2) 馬精漿の限外濾過処理画分の添加

精漿の分子量 10,000 以下の画分 ($\leq 10K$) を添加したときの活発運動精子率について表 10 には精子提供馬ごとに、また図 6 には精子提供馬全例の平均値 (平均値 \pm 標準偏差) で示した。

精子提供馬の精子懸濁液に、精漿提供馬の $\leq 10K$ を添加した時の活発運動精子率は馬 SS と馬 RD では全てで増加し、その増加幅は馬 SS で 5~50%、馬 RD で 10~60% であった。馬 DJ は精子提供馬 8 頭中 7 頭で増加し、その増加幅は 15~50% であった。

これらの活発運動精子率の平均を見ると、馬 SS は $31.9 \pm 14.1\%$ 、馬 RD は $44.4 \pm 12.1\%$ 、馬 DJ は $37.5 \pm 13.1\%$ であり、精漿提供馬 3 頭の間で有意差は認められなかった。よって精漿提供馬 3 頭の平均値で比較すると、活発運動精子率は無処置で $9.4 \pm 12.9\%$ だったものが $\leq 10K$ 添加後 $37.9 \pm 13.1\%$ に増加し、両者には有意な差が認められた ($p < 0.01$)。

精漿の分子量 3,000 以下の画分 ($\leq 3K$) を添加したときの活発運動精子率について表 11 には精子提供馬ごとに、また図 7 には精子提供馬全例の平均値 (平均値 \pm 標準偏差) で示した。

精子提供馬の精子懸濁液に、精漿提供馬の $\leq 3K$ を添加した時の活発運動精子率は馬 RD では全てで増加し、その増加幅は 20~50% であった。一方、馬 SS と馬 DJ は精子提供馬 8 頭中 7 頭で増加し、その増加幅は馬 SS が 5~50%、馬 DJ が 20~60% であった。

これらの活発運動精子率の平均を見ると、馬 SS は $28.8 \pm 15.2\%$ 、馬 RD は $43.8 \pm 15.2\%$ 、馬 DJ は $39.4 \pm 14.2\%$ であり、精漿提供馬 3 頭の間で有意差は認められなかった。よって精漿提供馬 3 頭の平均値で比較すると、活発運動精子率は無処置で $9.4 \pm 12.9\%$ だったものが $\leq 3K$ 添加後は $37.3 \pm 12.4\%$ に増加し、両者には有意な差が認められた ($p < 0.01$)。

(4) 馬全精漿のプロテアーゼ処理試料の影響

馬全精漿のプロテアーゼ処理試料 (PTsp) を添加したときの活発運動精子率について表 12 には精子提供馬ごとに、また図 8 には全例の平均値 (平均値 \pm 標準偏差) で示した。なおプロテアーゼを予め阻害剤で処理してから馬全精漿に添加したものを陽性対照 (Pcont) とした。

精子提供馬ごとに PTsp 添加成績を見ると、PTsp 添加後の活発運動精子率は精子提供馬 8 頭中 5 頭で増加が見られ、その増加幅は $5.0 \sim 33.3\%$ であった。

全頭の平均値で比較すると、Ncont $9.4 \pm 12.9\%$ に比べ 14.6 ± 11.4 と増加は見られたが有意なものではなかった。しかし、Pcont では 40.0 ± 4.7 の増加が見られ、この増加は Ncont および PTsp 添加との間に有意なものであった ($p < 0.01$)。従って、精漿をプロテアーゼで処理すると、精子前進運動促進因子が失活することが明らかになった。

(5) 馬全精漿の加熱処理試料の添加

添加実験を行うにあたって凍結保存していた試料を 37°C で融解したが、その際の加温により目的の物質が失活する可能性が考えられるため、HWsp を加熱処理した試料を用いて添加実験を行った。

馬全精漿の加熱処理試料 (HTsp) を添加したときの活発運動精子率について表 13 には精子提供馬ごとに、また図 9 には全例の平均値 (平均値 \pm

標準偏差)で示した。なお HWsp を添加したときの結果を陽性対照 (Pcont) とした。

精子提供馬ごとに HTsp 添加成績を見ると、HTsp 添加後の活発運動精子率は精子提供馬 8 頭中 6 頭で増加が見られ、その増加幅は 13.3~70% であった。

全頭の平均値で比較すると、Ncont $9.4 \pm 12.9\%$ に比べ、 37.9 ± 20.5 と増加が見られ、Ncont に比べ有意な差が認められた ($p < 0.01$)。

考 察

本研究では、分子量 30,000 以下の精漿成分 ($p < 0.01$) および脱脂精漿 ($p < 0.05$) の添加により精子運動性に有意な差が得られた。まず、分子量 30,000 以下の精漿成分の添加で運動性に有意な差が出たことから、脂質、糖、蛋白質および無機物などの分子量 30,000 以下の物質が、馬の精子運動性を活性化させていると考えられた。ここで除蛋白精漿および精漿脂質画分の添加で、精子運動性が向上しなかったことから、それぞれ無機物および脂質が馬の精子前進運動促進因子から除外される。これに加え、脱脂精漿画分で精子運動性上昇に有意な差が得られたことから、蛋白質が精子運動促進因子として強く疑われた。

一方、本実験結果で馬精漿蛋白画分の添加において、精子運動性の向上が認められなかったが、これは蛋白質の析出にアセトンを用いたことによる蛋白質の変性が起こっていると考察される。また、脂質画分の抽出で使用したジエチルエーテルは、アセトンに比べ水への溶解度が低く、蛋白質の変性を起こしにくいため、脱脂精漿画分添加では活性を持つ蛋白質が存在している可能性が高く、精子運動性に有意差が得られたと考えられる。

これらの結果を受けて、3頭の馬の精漿を用いて行った追加実験では、分子量 10,000 以下の精漿成分 ($\leq 10K$) および分子量 3,000 以下の精漿成分 ($\leq 3K$) の添加により精子運動性の有意な増強が認められた ($p < 0.01$)。また、 $\leq 10K$ および $\leq 3K$ の精子運動の上昇はほぼ同程度であったので、分子量 3,000 以上 10,000 以下に促進因子が存在する可能性は低いが、分子量 3,000 以下には何らかの促進因子が存在することが考えられる。

しかし、第2章で行った精漿蛋白の分画結果では、Native-PAGE 法では多いもので19の分画、SDS-PAGE法では最多 25 の分画が認められ、その推

定分子量は 11,621～100,681 であった。すなわち、分子量 3,000 以下の領域に分画は全く認められない。このことから促進因子が蛋白質ではないこと、濃度が検出限界以下であること、促進因子の分子量が極めて低いことの3つが考えられた。

まず、促進因子が蛋白質ではないのではないかという点について検討するために、馬精漿のプロテアーゼ処理により精漿中の蛋白質の生理活性を失わせた試料を作製し、灌流精巢上体尾精子への添加実験を行った。この結果、活発運動精子率はやや上昇したが、陽性コントロールとは有意差が見られた($p < 0.01$)。また、プロテアーゼ処理をする際、精漿と Tris/塩酸緩衝液を等量混合したため、この希釈により促進因子の作用が減弱したという可能性も考えられる。しかし、プロテアーゼとその阻害剤を予め混ぜたものを同様に添加した陽性コントロールでは有意な運動性の増強が認められているので、プロテアーゼ処理試料の添加において活発運動精子率が有意に上昇しなかったのは、希釈ではなくプロテアーゼにより蛋白質の生理活性が失われたためであると考えられ、促進因子は蛋白質であると結論できる。

次に、試料中の促進因子の濃度が検出限界以下であった可能性についてであるが、蛋白質の検出感度が高い銀染色の検出限界は 0.5 ng/ml であり、この場合試料の濃縮倍率や添加量などを考慮すると、精漿中の促進因子は約 10 ng/ml 以下で存在すると考えられる。リラキシンというインスリンに似た構造を有するホルモンの存在が多くの動物の精漿で確認されており、馬に関する報告は見当たらないが、豚ではリラキシンが精子の運動性に関係すると言われている。その濃度は 1.1 ng/ml 程度で精子運動性との間に正の相関が見出されている[4]。そのような低濃度で存在する蛋白質を検出するには、濃縮して試料を分析しなければならないが、多量の試料を用いることとなる。しかし、精漿を限外濾過処理するとなると、試料として使用できる容量は

限られてくる。これに対し、アセトンなどの有機溶媒やトリクロロ酢酸などの酸による蛋白質の沈殿濃縮を行う方法がある。この方法だと電気泳動の際に邪魔となる塩を使用することがないため、沈殿した蛋白質を少量の試料処理液で溶解して電気泳動に使用することが出来る。今後、これらの方法を用いて精漿蛋白質を回収し、目的とする蛋白質の検出法を検討する必要がある。

電気泳動法で低分子物質の検出に優れているトリシン-SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法の検出限界はおよそ分子量 1,000 であり、それ以下の蛋白質は泳動像において分画として確認することはできない。ヒトや家畜の精漿には分子量 1,007 のペプチドホルモンであるオキシトシンの存在が確認されており、これは家畜で精子の運動性に関係していると考えられている [28,111]。馬の精液におけるオキシトシンの作用についての報告は見当たらないが、その存在は確認されている [111]。よってこの様な低分子量のペプチドホルモンが副生殖腺で作られ、精子の運動性を促進している可能性も十分に考えられるため、今後は精漿成分のホルモンについての検討も視野に入れていく必要があるかもしれない。

以上本研究結果より、分子量 3,000 以下の領域に馬精巢上体尾精子の前進運動促進因子が含まれ、それは熱耐性蛋白質であることが示唆されたが、電気泳動による分画から同定に至ることは出来なかった。今後は、試料の更なる濃縮を行った上での電気泳動や、精漿中のペプチドホルモン検出を試みるなどの研究が必要である。これにより、馬精子運動性を向上させる物質が検討され、人工授精受胎率の向上の臨床応用がされることを期待したい。

要 約

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、精漿内の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。そこで本研究では馬精漿から様々な成分を抽出し、灌流し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。

実験には雄馬 16 頭の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用い、これを遠心処理した精漿を馬全精漿 (HWsp) として、HWsp から精漿成分を抽出した。これらとは別に 3 頭の雄馬の精漿を追加実験で用いた。

精漿成分の抽出は、アセトン析出による精漿蛋白画分 (Prsp) および除蛋白精漿画分 (PrFsp)、限外濾過による分子量 30,000 以下の低分子画分 (Lmsp) および分子量 30,000 以上の高分子画分 (Hmsp)、エーテル抽出による精漿脂質画分 (Fsp) および脱脂精漿画分 (FFsp) を作製した。精漿蛋白成分の影響として Prsp、PrFsp、Lmsp、Hmsp を、精漿脂質成分の影響として Fsp、FFsp を精巢上体尾から灌流して得た精子にそれぞれを添加し、精子運動性の変化を観察した。

灌流した精子に HWsp を添加した陽性対照 (Pcont) を、SM 液を添加した陰性対照 (Ncont) と比較した結果、全頭で ++ 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 ($p < 0.01$)。アセトンで得た Prsp および PrFsp の添加による活発運動精子率の平均値は Prsp で増加傾向が認められたが、PrFsp で変化が見られず、ともに Ncont と比較して有意差は得られなかった。限外濾過で分離した Lmsp および Hmsp の添加では、ともに活発運動精子率の平均値が上昇し、Lmsp では Ncont に対し有意に上昇した ($p < 0.01$)。エーテル抽出した Fsp および FFsp の添加

による活発運動精子率の平均値は Fsp で変化が見られなかったが、FFsp で増加傾向が認められ、FFsp で Ncont に対し有意に上昇した ($p < 0.05$)。

これらの結果から、馬の精子前進運動促進因子は分子量 30,000 以下の蛋白質である可能性が強まったため、分子量を絞り込むため限外濾過による分子量 10,000 以下の画分 ($\leq 10K$)、分子量 3,000 以下の画分 ($\leq 3K$) を作製し、蛋白質であることの確認のためプロテアーゼ処理精漿を作製し、精子の運動性に対する影響を確かめた。

その結果、プロテアーゼ処理により HWsp 中の蛋白質の生理活性を失わせた試料を用いたところ精子の運動性の有意な増強は見られず、Pcont とし用いたたプロテアーゼを予め阻害剤で処理してから馬全精漿に添加したものでは有意な運動性の増強 ($p < 0.01$) が認められたことから、精子前進運動促進因子が蛋白質であることが確認された。また、精子の運動性の有意な増強は $\leq 3K$ でも認められ、精漿を 70°C 1 時間加熱してもその効果は失われなかったため、馬の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ものの、特定することは出来なかった。

表1.精子供試馬

供試馬	品種もしくは種類	年齢	体重(kg)
A	サラブレッド	3	466
B	サラブレッド	7	477
C	雑種	4.5	434.5
D	ポニー	3	250
E	中半血	3	850
F	ポニー	3	150
G	ブルトン	3	950
H	道産子	3	350
I	サラブレッド	不明	不明
J	ポニー	10	120
K	中半血種	8	不明
L	中半血種	3	900
M	サラブレッド	5	550
N	ポニー	1	180
O	ポニー	4	200
P	サラブレッド	3	479.5
平均値		4.2	454.1

表2. 精漿提供馬の精液性状

精漿 提供馬	精液量 ml	精子濃度 $\times 10^8/\text{ml}$	総精子数 $\times 10^8/\text{ejac}$	pH	精子活力				運動 精子率	不染 精子率	精子 奇形率
					+++	++	+	±			
No.1	72	0.83	59.8	6.8	30	30	20	10	90	91.3	26.3
No.2	40	0.25	10	6.8	30	20	20	20	90	88.9	19.7
No.3	32	6.2	198.4	6.8	30	20	20	20	90	91.3	28.1
No.4	90	6.3	567	6.8	30	20	20	15	85	92.4	24.3
No.5	60	0.57	34.2	7	30	30	20	10	90	88.7	2.1
No.6	70	1.01	70.7	7	40	30	10	10	90	91.2	6.9
No.7	75	1.1	82.5	6.8	40	30	10	10	90	93.3	14.5
No.8	74	1.26	93.2	6.8	30	30	10	20	90	—	17.4
No.9	114	0.45	51.3	7	40	30	10	10	90	—	14.0
No.10	60	2.6	156	6.8	20	20	30	20	90	—	15.5
No.11	49	1.1	53.9	7.2	10	20	20	20	70	88.8	41.1
No.12	26	0.85	22.1	7	30	20	10	10	70	79.2	18.8
No.13	16	1.67	26.7	7.4	20	20	20	20	80	79.5	20.9
No.14	20	0.32	6.4	7.2	30	20	20	20	90	70.0	17.7
No.15	54	1.7	91.8	7	30	30	20	10	90	77.0	14.0
馬SS	30	1.53	45.9	7.2	40	20	20	10	90	94.3	21.4
馬RD	50	2.3	115	7.2	30	20	20	10	80	93.3	26.1
馬DJ	41	0.92	37.72	7.2	10	30	20	10	70	83.9	26.3

表3. スキムミルク液(SM液)の組成

物質名	1L中への添加量
ドライスキムミルク	55.75g
グルコース	27.64g
クエン酸三ナトリウム二水和物	0.3g
ラクトース	1.5g
ラフィノース	1.5g
クエン酸カリウム	0.42g
HEPES	7.14g

表4. 供試馬A～Hの精子性状

供試馬	希釈精子濃度 ($\times 10^8$ /ml)	希釈後精子 生存率(%)	活発運動 精子率(%)
A	2.36	88.2	5
B	2.06	76	5
C	2.24	89.9	10
D	2.5	86.7	50
E	2.39	65.8	20
F	0.53	88	10
G	2.4	70.9	20
H	2.38	80.2	10
I	2.4	90.9	0
J	1.05	98	15
K	2.86	81.8	30
L	2.48	80.6	0
M	2.1	87.5	0
N	1.25	85	30
O	2.27	87.6	0
P	2.05	96.5	0
平均	2.08	84.6	12.8

表5. 陰性コントロール(Ncont)および陽性コントロール(Pcont)の活発運動精子率

供試馬	活発運動精子率(%)	
	Ncont	Pcont
A	5	85
B	5	70
C	10	10
E	20	30
F	10	50
G	20	45
H	10	70
検体数	7.0	8.0
平均	11.4	51.4
標準偏差	6.3	25.9

表6. 馬精漿蛋白画分および除蛋白画分添加による活発運動精子率

供試馬	活発運動精子率(%)			
	Ncont	Pcont	Prsp	PrFsp
A	5	85	20	5
B	5	70	20	5
C	10	10	5	5
E	20	30	10	15
F	10	50	35	10
G	20	45	20	30
H	10	70	40	15
検体数	7	7	7	7
平均	11.4	51.4	21.4	12.1
標準偏差	6.3	25.9	12.5	9.1

表7. 限外濾過処理画分の添加による
活発運動精子率

供試馬	活発運動精子率(%)			
	Ncont	Pcont	Lmsp	Hmsp
A	5	85	80	60
B	5	70	55	40
C	10	10	50	10
E	20	30	25	0
F	10	50	35	15
G	20	45	45	15
H	10	70	70	30
検体数	7	7	7	7
平均	11.4	51.4	51.4	24.3
標準偏差	6.3	25.9	19.1	20.5

表8. 馬精漿脂質画分および脱脂画分添加による
活発運動精子率

供試馬	活発運動精子率(%)			
	Ncont	Pcont	Fsp	FFsp
A	5	85	0	15
B	5	70	5	40
C	10	10	10	20
D	50	80	30	55
E	20	30	15	20
F	10	50	30	50
G	20	45	20	30
H	10	70	5	45
検体数	8	8	8	8
平均	16.3	55	14.4	34.4
標準偏差	14.8	26	11.5	15.2

表9. 陰性コントロール(Ncont)および全精漿添加時の
活発運動精子率

精子 提供馬	Ncont	HWsp添加時活発運動精子率(%)			
		馬SS	馬RD	馬DJ	平均
I	0	30	30	40	33.3
J	15	60	40	60	53.3
K	30	60	60	70	63.3
L	0	60	60	60	60.0
M	0	50	60	20	43.3
N	30	60	60	50	56.7
O	0	50	60	70	60.0
P	0	60	60	70	63.3
検体数	8	8	8	8	8
平均	9.4	53.8	53.8	55.0	54.2
標準偏差	12.9	9.9	11.1	16.6	10.0

表10. 分子量10,000以下の画分(≤10K)の添加時の
活発運動精子率

精子 提供馬	Ncont	≤10K添加時活発運動精子率(%)			
		馬SS	馬RD	馬DJ	平均
I	0	30	30	30	30.0
J	15	30	50	30	36.7
K	30	20	40	50	36.7
L	0	5	25	0	10.0
M	0	30	50	40	40.0
N	30	50	60	60	56.7
O	0	40	60	50	50.0
P	0	50	40	40	43.3
検体数	8	8	8	8	8
平均	9.4	31.9	44.4	37.5	37.9
標準偏差	12.9	14.1	12.1	17.1	13.1

表11. 分子量3,000以下の画分(≦3k)添加時の活発運動精子率

精子 提供馬	Ncont	≦3K添加時活発運動精子率(%)			
		馬SS	馬RD	馬DJ	平均
A	0	25	20	30	25.0
B	15	30	35	15	26.7
C	30	10	50	50	36.7
D	0	5	25	30	20.0
E	0	30	50	30	36.7
F	30	50	70	50	56.7
G	0	50	50	60	53.3
H	0	30	50	50	43.3
検体数	8	8	8	8	8
平均	9.4	28.8	43.8	39.4	37.3
標準偏差	12.9	15.2	15.2	14.2	12.4

表12. 全精漿のプロテアーゼ処理試料(PTsp)
添加時の活発運動精子率

精子 提供馬	活発運動精子率(%)		
	Ncont	Pcont	PTsp
I	0	NT	5
J	15	NT	0
K	30	NT	30
L	0	NT	5
M	0	NT	20
N	30	43.33	10
O	0	33.34	33.34
P	0	43.33	13.33
検体数	8	3	8
平均	9.4	40.0	14.6
標準偏差	12.9	4.7	11.4

NT: 試験未実施

表13. 全精漿の加熱処理試料(HTsp)添加時の
活発運動精子率

精子提供 馬	活発運動精子率(%)		
	Ncont	Pcont	HTsp
A	0	33.3	30.0
B	15	53.3	13.3
C	30	63.3	20.0
D	0	60.0	13.3
E	0	43.3	43.3
F	30	56.7	56.7
G	0	60.0	70.0
H	0	63.3	56.7
検体数	8	8	8
平均	9.4	54.2	37.9
標準偏差	12.9	10.0	20.5

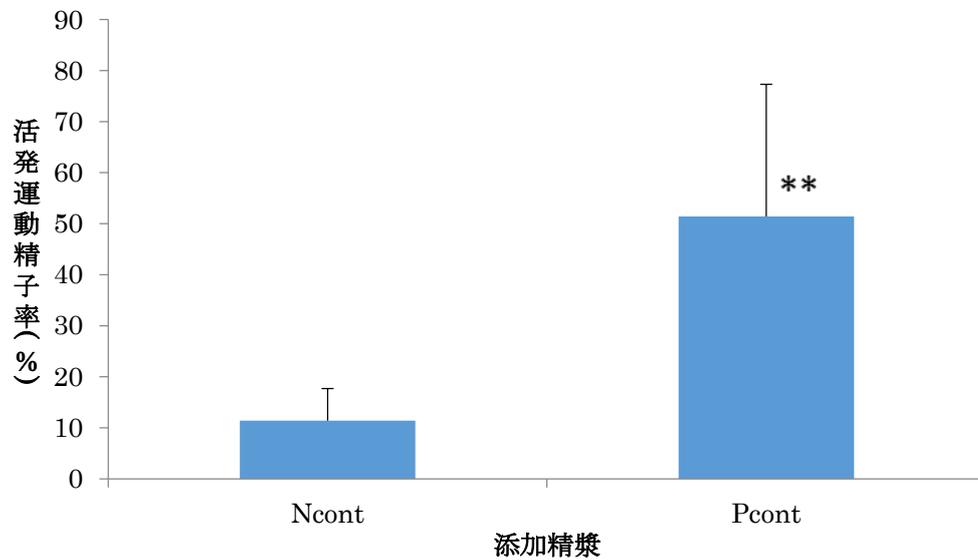


図1 陽性コントロールおよび陰性コントロールの

活発運動精子率の比較 (n=7)

** : Ncont との間に $p < 0.01$

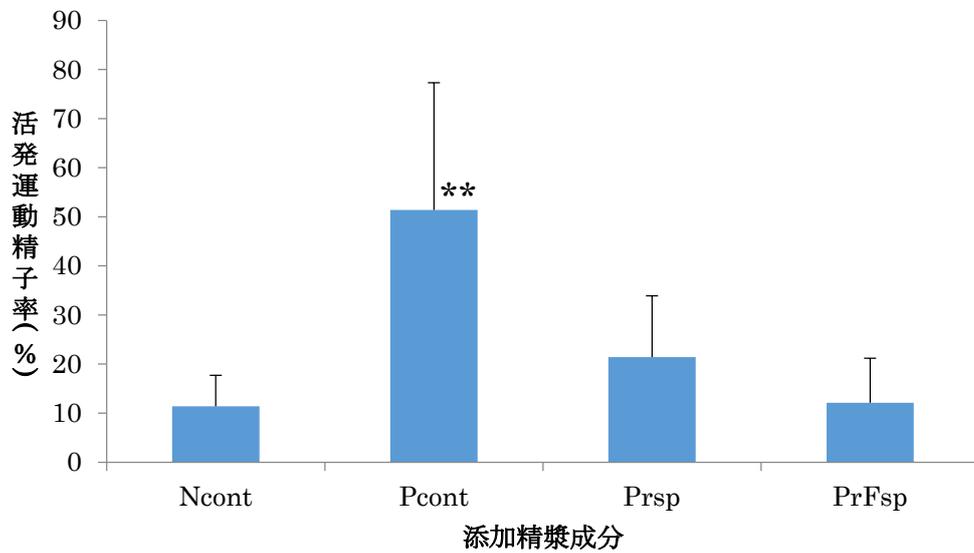


図2 馬精漿蛋白画分および除蛋白画分添加時の
活発運動精子率(n=7)

** : Ncont との間に $p < 0.01$

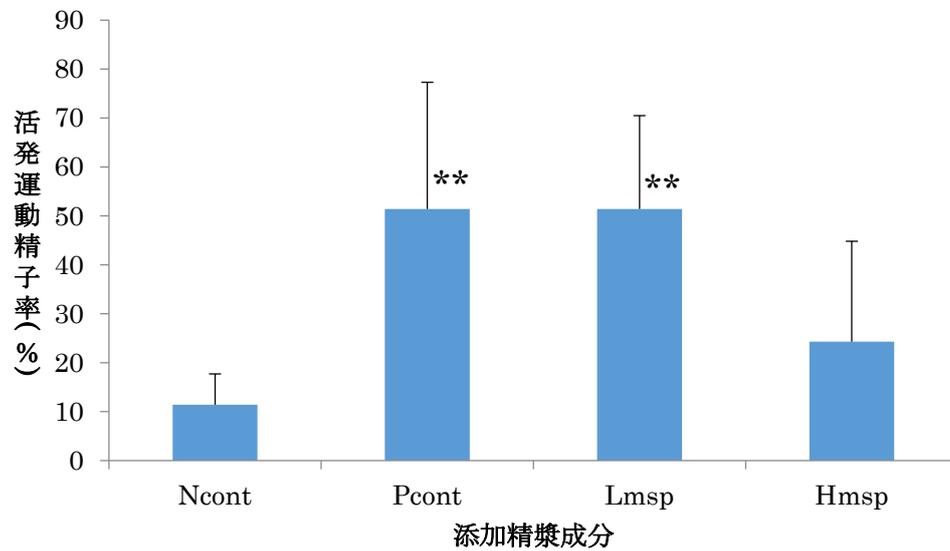


図3 限外濾過処理画分添加時の活発運動精子率(n=7)

** : Ncont との間に $p < 0.01$

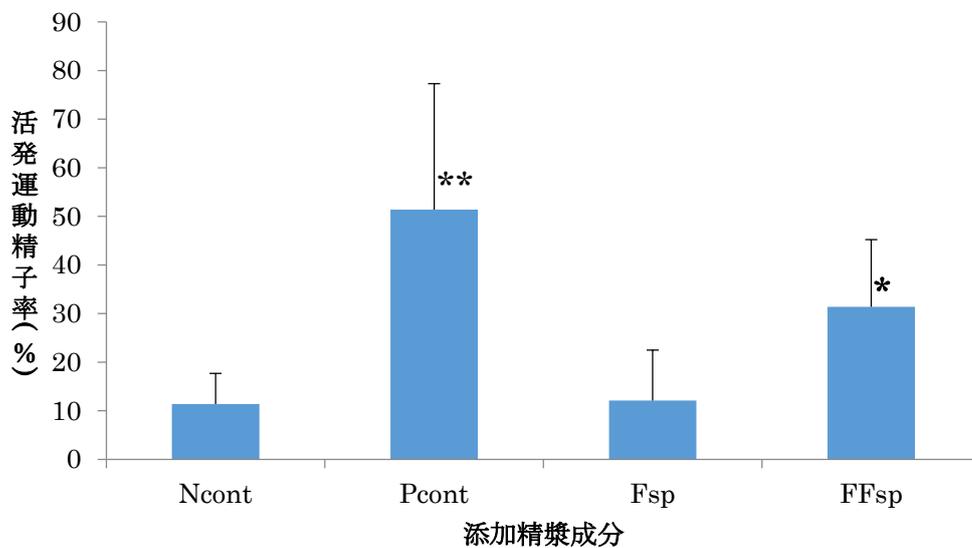


図4 馬精漿内脂質画分および馬精漿内除脂質画分添加時の
活発運動精子率 (n=7)

*: Ncont との間に $p < 0.05$
 **: Ncont との間に $p < 0.01$

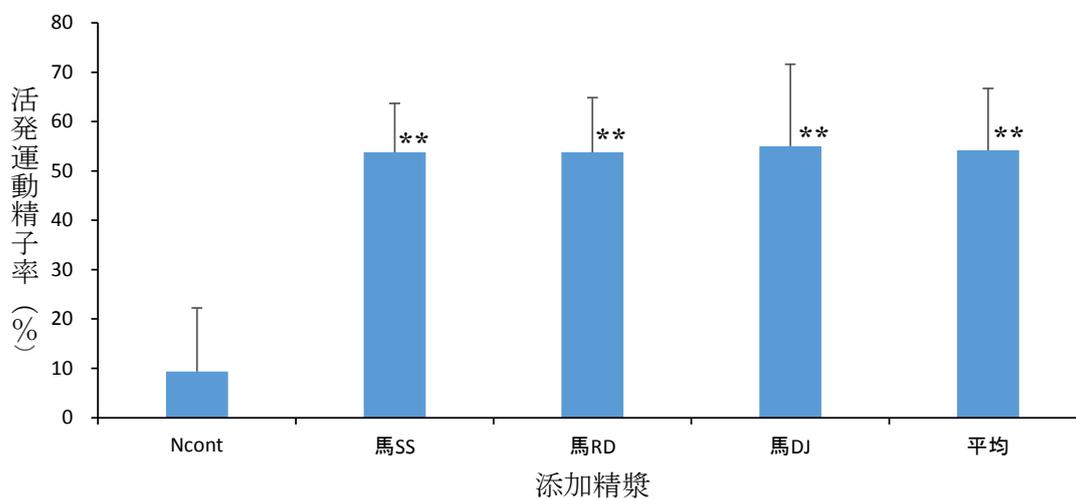


図5 陰性コントロールおよび全精漿の添加時の
活発運動精子率 (n=8)

** : Ncont との間に $p < 0.01$

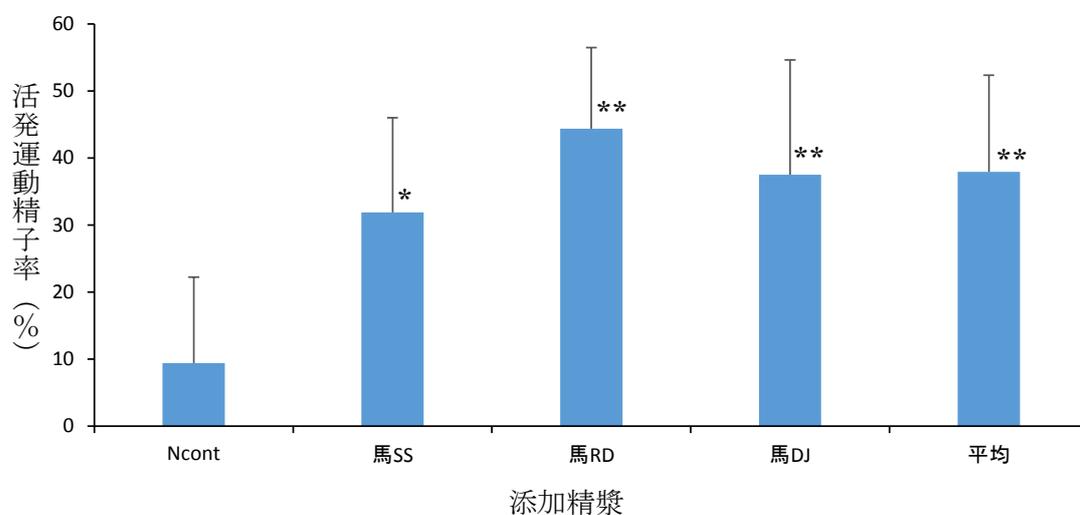


図 6 陰性コントロールおよび分子量 10,000 以下の画分 ($\leq 10K$) の添加による活発運動精子率 (n=8)

*: Ncont との間に $p < 0.05$
 **: Ncont との間に $p < 0.01$

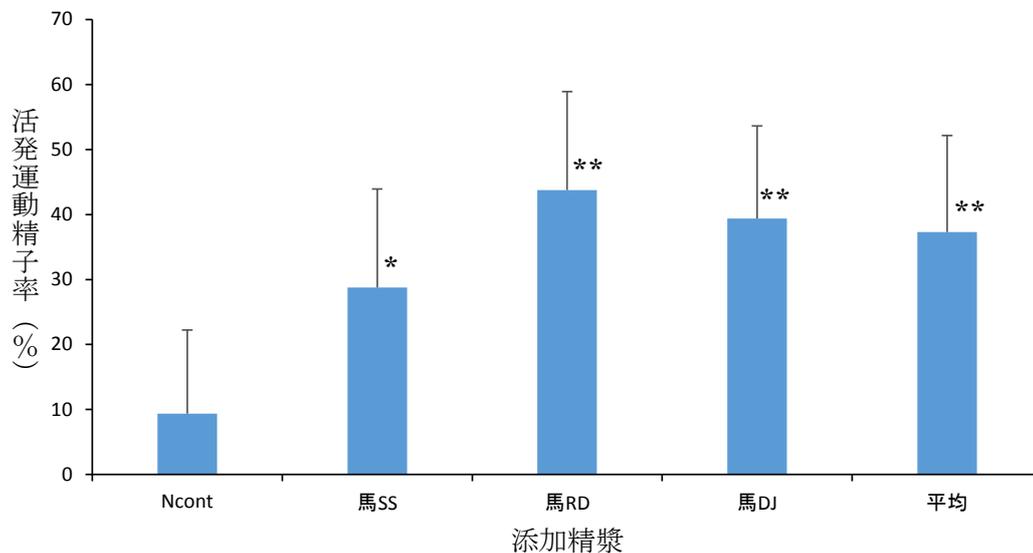


図 7 陰性コントロールおよび分子量 3,000 以下の画分 ($\leq 3K$) の添加による活発運動精子率 (n=8)

*: Ncont との間に $p < 0.05$
 **: Ncont との間に $p < 0.01$

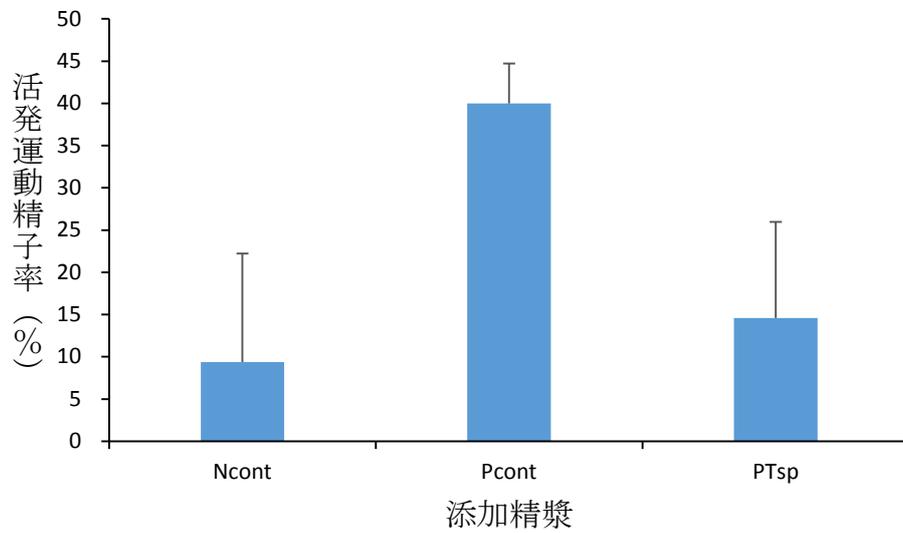


図 8 全精漿のプロテアーゼ処理試料 (PTsp) 添加時の活発運動精子率

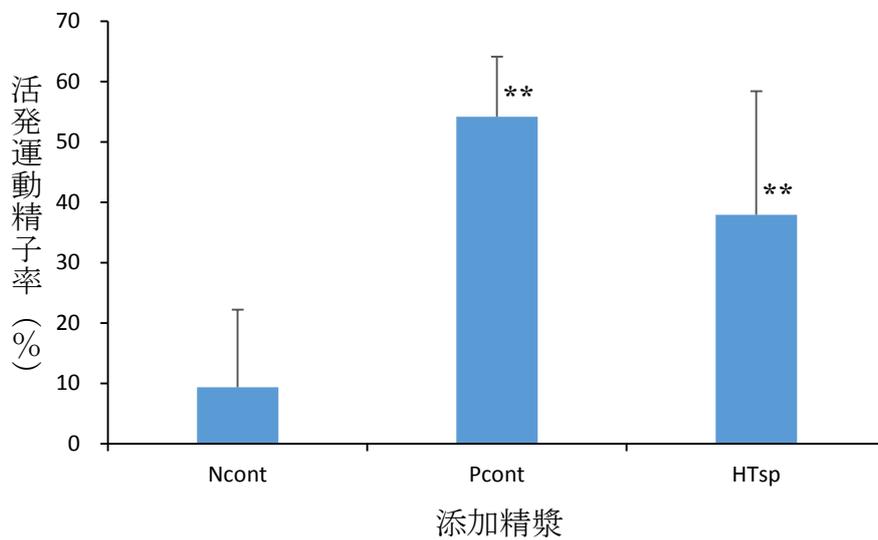


図 9 全精漿の加熱処理試料 (HTsp) 添加時の活発運動精子率 (n=8)

引用文献

1. Amann, R. P. and Pickett, B. W. 2007. Cryopreservation of semen. pp. 769-789. In: Equine Reproduction. (McKinnon, A. O. and Voss, J. L. eds.) Williams & Wilkins. Baltimore and Tokyo.
2. Amann, R. P., Cristanelli, M. J. and Squires, E. L. 1987. Proteins in stallion seminal plasma. J. Reprod. Fertil., Suppl. 35: 113-120.
3. Am-in, N., Kirkwood, R. N., Techakumphu, M. and Tantasuparuk, W. 2010. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. Theriogenology 75: 897-903.
4. Ashizawa, K. and Okauchi, K. 1984. Stimulation of sperm motility and oxygen consumption of fowl spermatozoa by a low molecular weight fraction of seminal plasma. Reprod. 71: 593-598.
5. Ball, B. A., Gravance, C. G., Wessel, M. T. and Sabeur, K. 2003. Activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) in reproductive tissues of the stallion and effects of angiotensin II on sperm motility. Theriogenology 59: 901-914.
6. Bartke, A., Steele, R. E., Musto, N. and Caldwell, B. V. 1973. Fluctuation in plasma testosterone levels in adult male rats and mice. Endocrinology 92: 1223-1228.
7. Ber, A., Vardinon, N., Yogev, L., Yavets, H., Homonnai, Z. T., Yust, I. and Paz, G. F. 1990. Transferrin in seminal plasma and in serum of men: its correlation with sperm quality and hormonal status. Hum. Reprod. 5: 294-297.
8. Berndtson, W. E., Pickett, B. W. and Nett, T. M. 1974.

- Reproductive physiology of the stallion. IV. Seasonal physiology the testosterone concentration of peripheral plasma. *J. Reprod. Fertil.* 39: 115-118.
9. Bertelsmann, H., Keppler, S., Holtershinken, M., Bollwein, H., Behne, D., Alber, D., Bukalis, G., Kyriakopoulos, A. and Sieme, H. 2010. Selenium in blood, semen, seminal plasma and spermatozoa of stallions and its relationship to sperm quality. *Reprod. Fertil. Dev.* 22: 886-891.
 10. Bharshankar, R. N. and Bharshankar, J. R. 2000. Relationship of seminal plasma transferrin with seminal parameters in male infertility. *Ind. J. Physiol. Pharmac.* 44: 456-460.
 11. Boon, D. A., Keenan, R. E. and Slaunwite, W. R. Jr. 1972. Plasma testosterone in men: variation, but not circadian rhythm. *Steroids* 20: 269-278.
 12. Brown, M. H., Brightman, A. H., Fenwick, B. W. and Rider, M. A. 1996. Identification of lactoferrin in bovine tears. *Am. J. Vet. Res.* 57: 1369-1372.
 13. Buckett, W. M., Luckas, M. J., Gazvani, M. R., Aird, I. A. and Lewis-Jones, D. I. 1997. Seminal plasma lactoferrin concentrations in normal and abnormal semen samples. *J. Androl.* 18: 302-304.
 14. Byers, S. W., Dowsett, K. F. and Glover, T. D. 1983. Seasonal and circadian changes of testosterone levels in peripheral blood plasma of stallions and their relation to semen quality. *J. Endocrinol.* 99: 141-150.

15. Cek, M., Curgul, S., Ertas, M., Sozer, T. and Alpacar, Z. 1992. Seminal transferrin levels in seminal plasma of fertile and infertile men. *Urol. Int.* 49: 218-221.
16. Chang, M. C. 1947. Effects of testis hyaluronidase and seminal fluids on the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 66: 51-54.
17. Cox, J. E., Williams, J. H., Rowe, P. H. and Smith, J. A. 1973. Testosterone in normal, cryptorchid and castrated male horses. *Eq. Vet. J.* 5: 85-90.
18. Dacheux, J. L., Dacheux, F. and Paquignon, N. 1989. Changes in sperm surface membrane and luminal protein fluid content during epididymal transit in the boar. *Biol. Reprod.* 40: 635-651.
19. Farrell, P. H. O. 1975. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.
20. Foley, A. A. and Bates, G. W. 1987. The purification of lactoferrin from human whey by batch extraction. *Anal. Biochem.* 162: 296-300.
21. Foresta, C., Manoni, F., Businaro, V., Donadel, C., Indino, M. and Scandellari, C. 1986. Possible significance of transferrin levels in seminal plasma of fertile and infertile men. *J. Androl.* 7: 77-82.
22. 藤井光正, 酒徳治三郎, 中村和行, 竹尾和典. 1981. 男子不妊症における精漿蛋白の disc 電気泳動法による分析. *生物物理化学* 25: 51.
23. Gallagher, T. F., Yoshida, K., Howard, D. R., David, F. D., Elliot,

- W. and Heileman, L. 1973. ACTH and cortisol secretory in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36: 1058-1068.
24. Ganjam, V. K. 1979. Episodic nature of the delta 4-ene and delta 5-ene steroidogenic pathways and their relationship to the adreno-gonadal axis in stallions. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 27: 67-71.
25. Gilmont, R. R., Senger, P. L., Sylvester, S. R. and Griswold, M. D. 1990. Seminal transferrin and spermatogenic capability in the bull. *Biol. Reprod.* 43: 151-157.
26. Goodman, R. L., Hotchkiss, J., Karsch, F. J. and Knobil, E. 1974. Diurnal variations in serum testosterone concentrations in the adult male rhesus monkey. *Biol. Reprod.* 11: 624-630.
27. Goodman, S. A. and Young, L. G. 1981. Immunological identification of lactoferrin as a shared antigen on radioiodinated human sperm surface and in radioiodinated human seminal plasma. *J. Reprod. Immunol.* 3: 99-108.
28. Goverde, H. J., Bisseling, J. G., Wetzels, A. M., Braat, D. D., Pesman, G. J., Sweep, F. C. and Meuleman, E.J. 1998. A Neuropeptide in Human Semen: Oxytocin. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 41: 17-22.
29. Hafez, E. S. E., Jainudeen, M. R. and Rosnina, Y. 2008. Hormones, Growth Factors and Reproduction. pp. 33-54. In: *Reproduction in Farm Animals*, 7th ed. (Hafez, B. and Hafez, E. S. E.), Williams & Wilkins.
30. 原 三郎. 1986. 精漿蛋白質の検査: γ -Seminoprotein(γ -Sm)と

は何か、その化学的性状。臨床病理，臨時増刊特集 68: 50-56.

31. 原 三郎・井上徳治・小柳嘉子・山崎春生・福山 武・壺岐裕志 .
1969. 免疫電気泳動上からみた精漿成分、特にその特異成分 . 日法
医学誌, 23: 117-122.
32. Harrison, R. A. P. and White, I. G. 1969. Distribution and
behavior of some glycolytic enzymes in spermatozoa and
cytoplasmic droplets from mammalian semen. *Biochem. J.* 111: 36.
33. Heitland, A. V., Jasko, D.J., Squires, E. L., Graham, J. K.,
Pickett, B. W. and Hamilton, C. 1996. Factors affecting motion
characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Eq. Vet. J.*
28: 47-53.
34. Hellman, L., Fujinori, N., Joseph, C., Elliot, D. W., Jacob, K.,
Howard, R., Steuen, E., David, K. F. and Gallagher, T. F. 1970.
Cortisol is secreted episodically by normal man. *J. Clin.*
Endocrinol. Metb. 30: 411-422.
35. 広江一正, 和出 靖, 富塚常夫, 正木淳二 . 1960. 家畜精液の生化学
的研究 . I. 馬の精漿の化学組成について(その 1). 農技研報
G19: 53-57.
36. Hoffmann, B. and Landeck, A. 1999. Testicular endocrine function,
seasonality and semen quality of the stallion. *Anim. Reprod. Sci.*
57: 89-98.
37. 穂坂正彦, 今野 稔, 間宮紀治, 西村隆一, 牧野拓雄 . 1972. 血
中 Dihydrotestosterone の Radioimmunoassay(第 1 報). 日内分泌会
誌 49: 1391-1393.
38. 星 元紀, 森沢正昭 . 1992. 精子学 . 東京大学出版 .

39. Hoskins, D. D., Brandt, H. and Acott, T. S. 1978. Initiation of sperm motility in the mammalian epididymis. *Fed. Proc.* 37: 2534-2542.
40. Inagaki, M., Kikuchi, M., Orino, K., Ohnami, Y. and Watanabe, K. 2002. Purification and Quantification of Lactoferrin in Equine Seminal Plasma. *J. Vet. Med. Sci.* 64: 75-77.
41. Indino, M. and Scandelari, C. 1986. Possible significance of transferrin level in seminal plasma of fertile and infertile men. *J. Androl.* 7: 77-82.
42. 入谷 明. 1992. 畜産. pp.302-308. 精子学(毛利秀雄 監修), 東京大学出版会.
43. Johnson, L. 1999. Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. *Biol. Reprod.* 44: 284-291.
44. 蒲池 信一, 石橋利伸. 1986. 精漿蛋白質の検査: γ -Sm の測定法. *臨床病理, 臨時増刊特集* 68: 65-72.
45. 上条桂一, 鈴木三章, 大原弘通, 和田武雄. 1975. 視床下部-下垂体-副腎系ホルモン分泌の日内リズムと feedback 機構に関する研究. 高位中枢の感受性の日内変動について. *日内分泌会誌* 51: 210-217.
46. 金川弘司. 1995. 人工授精. pp.206-217. 獣医繁殖学(森 純一編), 文永堂出版.
47. 柏原孝夫. 1947. 牡馬の睾丸機能に関する研究. II. 精液の性状の季節的消長に就て. *日獣学雑誌* 9: 39-44.
48. Katongole, C. B., Naftolin, F. and Short, R. V. 1971. Relationship between blood levels of luteinizing hormone and testosterone in

- bulls and the effects of sexual stimulation. *J. Endocrinol.* 50: 457-466.
49. 河上栄一, 堀 達也, 筒井敏彦. 2001. 無精子症犬およびセルトリ細胞腫罹患犬における精巣内トランスフェリン濃度と血中エストラジオール-17 β 濃度の関連性. *J. Vet. Med. Sci.* 63: 579-581.
50. 河上栄一, 堀 達也, 筒井敏彦. 2001. テストステロン・デポおよびPMSG併用投与後の精子活力減退症犬3頭の血中テストステロン・精巣内トランスフェリン濃度、精巣組織所見および精液性状の変化. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 203-206.
51. Kenan, C., Nuri, B., Mustafa, N. B., Pinar, P., Akalm, M. Bozkurt, A., Ali, D. O., Sukru, G., Sadik, K., Birol, O. and Seriozkan. 2010. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Res. Vet. Sci.* 89: 426-431.
52. 菊池元宏, 大沼秀男, 小平由美, 鈴木昭宏, 川上 徹, 中西信吾. 1993. 雄馬の血中テストステロンとジヒドロテストステロンの日内変動ならびに24時間平均濃度に対する年齢と季節の影響. *J. Reprod. Devel.* 39: j17-j21.
53. Kirkpatrick, J. F., Vail, R., Devous, S., Schwend, S., Baker, C. B. and Wiesner, L. 1976. Diurnal variation of plasma testosterone in wild stallions. *Biol. Reprod.* 15: 98-101.
54. Kirkpatrick, J. F., Wiesner, L., Kenney, R. M., Ganjam, V. K. and Turner, J. W. Jr. 1977. Seasonal variation in plasma androgens and testosterone in the North American wild horse. *J. Endocrinol.* 72: 237-238.

55. 楠瀬 良. 1996. 歴史と分類. pp.3-10. 馬の医学書(日本中央競馬会競走馬総合研究所編), チクサン出版社.
56. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
57. Lindholmer, C. H. 1974. The importance of seminal plasma for human sperm motility. *Biol. Reprod.* 10: 533-542.
58. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
59. 前川久太郎, 清水 澄. 1980. 光周期と性周期と運動周期. pp.117-132. ホルモンと時間, 生殖周期の内分泌学(石井 進編), 学会出版センター, 東京.
60. Magistrini, M., Chanteloube, P. and Paimer, E. 1987. Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. *J. Reprod. Fertil.* 35: 127-133.
61. 牧野拓雄, 稲富顕二, 吉田孝夫, 田根 培, 高木繁夫, 神戸川明. 1973. 性ステロイドホルモンの Radioimmunoassay(その 4). Testosterone の Radioimmunoassay. *ホルモンと臨床* 21: 107-113.
62. Mann, T. 1964. *Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract.* pp. 120-121, pp.343-350. Methuen, London.
63. Mann, T. 1964. Chemical composition of semen: Stallion and Jackass. pp. 107-112. In: *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*, (Mann, T.), Methuen & Co., London.
64. Marden, T. and Werthessen, N. T. 1956. Influence of seminal fluid on sperm motility. *Fertil. Steril.* 7: 508-515.

65. 正木淳二. 1972. 副生殖腺の分泌機能. pp. 180-195. 哺乳動物の精子(飯田 勲編), 学窓社, 東京.
66. 正木淳二. 1972. 精液の化学的性状. pp. 223-253. 哺乳動物の精子(飯田 勲編), 学窓社, 東京.
67. 正木淳二. 1992. 精液の生化学. pp. 121-137. 精子学(毛利秀雄監修, 森沢正昭, 星 元紀編), 東京大学出版会, 東京.
68. Masson, P. L. and Heremans, J. F. 1966. Study on lactoferrin, the iron-binding protein of secretion. *Prot. Biol. Fluids*. 14: 115-124.
69. Masson, P. L., Heremans, J. F. and Dive, C. 1966. An iron-binding protein common to many external secretions. *Clin. Chim. Acta*. 14: 735-739.
70. 瑞穂 当, 丹羽太左衛門, 副島昭彦. 1963. 家畜精子の代謝に関する研究. IV. 精子代謝量の季節的消長について. *家畜繁殖雑誌* 9: 92-96.
71. Mohapatra, S. K., Duraiswami, S. and Chari, S. 1985. On the identity of bovine seminal plasma inhibin. *Mol. Cell Endocrinol*. 41: 187-196.
72. 森沢正昭, 森沢幸子. 1992. 精子運動の調節. pp.104-120. 精子学(毛利秀雄監修, 森沢正昭, 星 元紀編), 東京大学出版会, 東京.
73. 毛利秀雄. 1972. 精子の運動性. pp.258-290. 哺乳動物の精子(飯田 勲編), 学窓社, 東京.
74. Muduuli, D. S., Sanford, L. M., Palmer, W. M. and Howland, B. E. 1979. Secretory patterns and circadian and seasonal changes in luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, prolactin and

- testosterone, in the male pygmy goat. *J. Anim. Sci.* 49: 543-553.
75. 村上 昇. 1980. 時間生物学の基礎と応用. *日獣会誌* 37: 356-361.
76. 中野道晴, 長谷川伸作, 金島広恭. 1988. チーズホエー由来のラクトフェリンの静菌活性について. *北海道立衛生研究所報* 38: 75-76.
77. 名和田新, 度師正文, 小河淳. 1990. 加齢に伴う下垂体-副腎皮質-性腺系の変動. *ホルモンと臨床* 38: 71-80.
78. Nett, T. M. 1993. Reproductive Endocrine Function Testing in Stallions. pp. 821-824. In: *Equine reproduction* (McKinnon, A. O. and Voss, J. L. eds.), Lea & Febiger, Philadelphia.
79. 日本中央競馬会競走馬総合研究所. 1977. 競走馬の生理基準値第2版. pp. 72. 日本中央競馬会競走馬総合研究所, 東京.
80. 西川義正. 1959. 馬の精液性状並に人工授精技術. pp. 176-242. 馬の繁殖に関する研究, 日本中央競馬会, 東京.
81. 西川義正. 1972. 精液の一般性状. pp. 198-222. 哺乳動物の精子(飯田 勲編), 学窓社, 東京.
82. 西川義正, 和出 靖. 1951. 馬の人工授精に関する研究. V. 精液の一般性状及びこれに関係のある要因. *農技研報* G1: 13-26.
83. Nyland, G. 1955. The electrophoretic pattern of prostatic lipid secretion in normal and pathological conditions. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 7: 250-253.
84. Pesch, S., Bergmann, M. and Bostedt, H. 2006. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlation to semen quality. *Theriogenology* 66: 307-317.

85. Pickett, B. W. 1993. Factors Affecting Sperm Production and Output. pp. 689-704. In: Equine reproduction, (McKinnon, A. O. and Voss, J. L. eds.), Lea & Febiger, Philadelphia.
86. Pickett, B. W., Amann, R. P., McKinnon, A. O., Squires, E. L. and Voss, J. L. 1989. Frequency of ejaculation. pp. 73-81. In: Management of the stallion for maximum reproductive efficiency, II. Univ. Colorado.
87. Pincus, G. 1943. Diurnal rhythm in excretion of urinary ketosteroids by young man. J. Clin. Endocrinol. Metb. 3: 195-199.
88. Raeside, J. I. 1979. Seasonal changes in the concentration of estrogens and testosterone in the plasma of the stallion. Anim. Reprod. Sci. 1: 205-212.
89. Resko, J. A. and Kristen, B. E. 1978. Diurnal testosterone levels in peripheral plasma of human male subjects. J. Endocrinol. 76: 67-74.
90. Retamal, C., Urzua, J., Lorca, C., Lopez, M. L. and Alves, E. W. 2000. Changes in the plasma membrane proteins of stallion spermatozoa during maturation in the epididymis. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 32: 229-239.
91. Roberts, T. K. and Bournsnel, J. C. 1975. The isolation and characterization of lactoferrin from sow milk and boar seminal plasma. J. Reprod. Fertil. 42: 579-582.
92. Rose, R. M, Gordon, T. P. and Bernstein, I. S. 1978. Diurnal variation in plasma testosterone and cortisol in rhesus monkeys living in social groups. J. Endocrinol. 76: 67-74.

93. Rowe, P. H., Lincoln, G. A., Racey, P. A. and Glover, T. D. 1974. Temporal variations of testosterone levels in the peripheral blood plasma of men. *J. Endocrinol.* 61: 63-73.
94. Rozin, S. 1960. Studies on seminal plasma. I. The role of seminal plasma in motility of spermatozoa. *Fertil. Steril.* 11: 278-285.
95. Saceed, S., Khan, F. A., Rahman, S. B., Khan, D. A. and Ahmad, M. 1994. Biochemical parameter in evaluation of oligospermia. *J. Pak. Med. Assoc.* 44: 137-140.
96. 蔡 誠偉. 1984. 思春期前ラットにおける成長ホルモン分泌と睡眠, (第2報)覚醒サイクル, 3時間周期ウルトラディアンリズム, 日内分泌会誌 60: 769-778.
97. 佐藤邦忠, 三宅 勝, 角田修男, 中川 明, 岩村俊春. 1981. 3歳種雄候補馬の精液性状、血中テストステロン値ならびにエストロゲン値について. *日本畜産学会報* 52: 447-450.
98. Sharma, O. P. 1976. Diurnal variation of plasma testosterone in stallions. *Biol. Reprod.* 15: 158-162.
99. 志田圭三, 伊東善一. 1975. 男性内分泌. pp.224-229. 不妊症診断のすべて(飯塚理八編), 南江堂書店, 東京.
100. Sophie, F., Métayer, S., Locatelli, A., Dacheuxand, F. and Dacheux J. L. 2000. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol. Reprod.* 62: 1790-1803.
101. Steve, D. H., Luke, R. B., Lipshultz, L. I. and Roy, G. S. 1983. Transferrin bind specifically to pachytene spermatocytes. *Endocrinology* 113: 1916-1918.

102. Steven, R. S. and Michael, D. G. 1984. Localization of transferrin and transferrin receptors in testes. *Biol. Reprod.* 31: 195-203.
103. Steven, Y. W. C., Tatt-Tuch, L., Christina, W. and Lawrence, C. H. T. 1986. Seminal plasma transferrin and seminiferous tubular dysfunction. *Fertil. Steril.* 45: 687-691.
104. Stewart, B. L. and Roser, J. F. 1998. Effect of age, season and fertility status on plasma and intratesticular immunoreactive (IR) inhibin concentration in stallions. *Domest. Anim. Endocrinol.* 15: 129-139.
105. Stradaioli, G., Sylla, L., Zelli, R., Chiodi, P. and Monaci, M. 2004. Effect of L-carnitine administration on the seminal characteristics of oligoasthenospermic stallions. *Theriogenology* 62: 761-777.
106. Szumowski, P. and Stoeber, M. 1955. Sur les proteines du plasma seminal du cheval. *Ann. Zoot. I. N. R. A.* 2: 165-171.
107. 高橋清久, 高橋康郎, 本多 裕, 対馬敏夫, 入江 稔, 北浜邦夫. 1974. イヌにおける睡眠中の成長ホルモン(CGH)分泌の研究, (第3報)明暗条件および断眠の影響について. *日内分泌会誌* 50: 273.
109. Thompson, D. L. Jr., St. George, R. L., Jones, L. S. and Garza, F. Jr. Patterns of secretion of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and testosterone in stallions during the summer and winter. *J. Anim. Sci.* 60: 741-748.
108. Thompson, D. L. Jr., Pickett, B. W., Berndtson, W. E., Voss, J. L., and Nett, T. M. 1977. Reproductive physiology of the stallion. VIII. Artificial photoperiod, collection interval and seminal characteristics, sexual behavior and concentrations of LH and

- testosterone in serum. *J. Anim. Sci.* 44: 656-664.
110. Turner, J. W. Jr. and Kirkpatrick, J. F. 1982. Androgens, behaviour and fertility control in feral stallions. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 32: 79-87.
111. Watson, E. D., Nikolakopoulos, E., Gilbert, C. and Goode, J. 1999. Oxytocin in the semen and gonads of the stallion. *Theriogenology* 51: 855-865.
112. Weitzman, E. D., Boyar, R. M., Kapen, S. and Hellman, L. 1975. The relationship of sleep and sleep stages to neuroendocrine secretion and biological rhythms in man. *J. Anim. Sci.* 44: 656-664.
113. Wettemann, R. P. and Desjardins, C. 1973. Relationship of LH to testosterone in rams. *J. Anim. Sci.* 36: 212.
114. Yamane, J. 1920. Studien über die physikalische und chemische Beschaffenheit des Pferdespermas mit besonderer Berücksichtigung der Physiologie der Spermatozoen. *J. Coll. Agric. Hokkaido Imp. Univ.* 9: 161-236.
115. 吉田重雄. 1970. 性細胞と精液. pp.27-71. 新家審繁殖講座 I. (西川義正, 星修三, 加藤浩編), 朝倉書店, 東京.
116. 吉田重雄. 1972. 精子の代謝. pp.293-311. 哺乳動物の精子(飯田勲編), 学窓社, 東京.
117. 吉田重雄, 西川義正. 1992. 精子研究の歴史. pp.13-15. 精子学(毛利秀雄 監修), 東京大学出版会.
118. Yu, L. C. and Chen, Y. H. 1993. The developmental profile of lactoferrin in mouse epididymis. *J. Biochem.* 296: 107-111.

謝 辞

本稿を終えるに当たり、終始御懇篤な御指導と論文の御校閲を賜りました北里大学獣医臨床繁殖学研究室教授 坂口実博士、並びにかつて研究に対する基本的な考え方からご教授いただきました元北里大学獣医臨床繁殖学研究室教授 故大沼秀男博士に深甚なる謝意を捧げます。

また、ホルモン測定に関してご指導いただきました元北里大学獣医臨床繁殖学研究室教授 大浪洋二博士、並びに生化学的な分野の御指導を賜りました元北里大学生化学研究室教授 渡辺清隆博士に甚大なる謝意を捧げます。また、本研究に対して御協力と御援助を惜しまれなかった北里大学獣医臨床繁殖学研究室講師 三浦弘博士ならびに獣医臨床繁殖学研究室専攻生各位に対し心から感謝致します。

最後に本研究の遂行に当たり御便宜をはかって下さいました公益社団法人日本軽種馬協会関係者各位に対し、厚く御礼申し上げます。