

氏 名 (本籍)	いし 石	ばし 橋	まさ 正	ひこ 彦 (神奈川県)
学位の種類	農	学	博	士
学位記番号	農	第	119	号
学位授与年月日	昭和50年 2月13日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
最終学歴	昭和41年3月 東北大学大学院農学研究科 修士課程修了			
学位論文題目	雌ラットの繁殖に及ぼす精子ならび に雄性生殖器による免疫の影響			

(主 査)
論文審査委員 教授 竹内三郎 教授 津田恒之
助教授 扇元敬司

論文内容要旨

家畜の繁殖障害は、畜産経営上重大な問題であるが、とくに乳牛において、明らかな機能的あるいは遺伝的異常、もしくは疾患などが認められないにも拘らず、不受胎のものが認められ、これらのうちで、とくに3回以上の種付、または人工授精をしても不受胎のものは「リポートブリーダー」と定義されている。このリポートブリーダーについては、種々の原因が考えられているが、その一因として精子あるいは精液による免疫が考えられる。人においても、売春婦が妊娠しにくい理由として、精液に対する血中抗体の存在をあげている報告もある。ほかに、牛、豚、鶏などで精液に対する血中抗体と不妊との関連を調べた例がある。このように、精液に対する免疫とそれによる不妊が考えられるが、その詳細な検討はまだ十分ではなく、とくに基礎的研究が必要である。

ラットを用いて精巣などで免疫した際の繁殖についての検討を試みた報告もあるが、これはいずれも、免疫後の受胎率、分娩までの期間、産子数などについて調べているにすぎず、詳細な検討はなされていない。本論文は、雌ラットを精子および雄性生殖器官によって免疫し、とくに繁殖のどの過程において免疫の影響としての障害が現われるかを調べ、さらにその影響が生ずる機序について検索した。

ラットにおいては、他の家畜のように精液を得ることが出来ないため、精液を構成する雄性生殖器官を均質化して抗原として雌ラットを免疫して、繁殖に及ぼす影響を検討した。(第2章)

免疫に際して Freund の完全アジュバント法が抗体産生に有効であることが知られているが、アジュバント投与によりラットの場合、偽妊娠をおこすとの報告もあるので、繁殖についての検討には、アジュバント投与は適さないことが考えられた。そこで、アジュバントを用いず、投与抗原量を連日増加する方法(遞増法)とアジュバント法との比較を、異種蛋白質である牛と豚の精のう腺液を用いて実施した。その結果、表1に示すごとく、免疫後4週では、アジュバント法も遞増法もほぼ同様の抗体価が得られることがわかった。(第1節)

表2に示すように、ラットの精巣、精巣上体、前立腺、精のう腺、尿道球腺を均質化して免疫する各群を設け、さらに対照として雄ラット血清投与群と無処置対照群とを設けて、繁殖に及ぼす影響を調べた。免疫の結果、体重には影響が認められなかった。また、性周期も正しい4日周期を維持したことから、性周期への影響はないことがわかった。妊娠の成立については、妊娠成立までの平均発情回数を比較した結果、ラット血清投与対照群に対して、精巣上体、前立腺、精のう腺、尿道球腺の各免疫群が統計的に5%の危険率で有意に低かったことから、免疫による交尾欲の低下が推察された。

妊娠したラットについては、妊娠20日目に解剖して、卵巣の黄体数、着床数、生胎児数を調

べ、また、卵巣重量、胎児重量を計量した(表3-1, 3-2, 4)。黄体数は対照群と免疫群との間に有意差は認められず、免疫による影響は排卵に対しては無いものと思われた。着床数は、各免疫群とも対照群より著しく少なく、ラット精巣上体免疫群では1%の危険率で、またラット前立腺免疫群、ラット精のう腺免疫群ではそれぞれ5%の危険率でいずれも無処置対照群に対して統計的に有意差が認められた。さらに、ラット精巣上体免疫群、ラット前立腺免疫群およびラット精のう腺免疫群ではいずれも1%の危険率で、またラット精巣免疫群とラット尿道球腺免疫群では5%の危険率でそれぞれラット血清投与対照群に対して統計的に有意差が認められた。これらのうちでも、ラット精のう腺免疫群では、11例中3例に極端に着床数の少ないものが認められた。生胎児数は、ラット精巣上体免疫群とラット前立腺免疫群において1%の危険率で、またラット精のう腺免疫群とラット尿道球腺免疫群において5%の危険率で、いずれもラット血清投与対照群に対して統計的に有意差を示した。得られた黄体数、着床数、生胎児数から着床時を境にして着床前と着床後の胚もしくは胎児の死亡率(損失率)を計算した結果、ラット精のう腺免疫群、ラット前立腺免疫群、ラット精巣上体免疫群およびラット精巣免疫群において、いずれもラット血清投与対照群より着床前の胚の損失率が5%の危険率で統計的に有意に低いことがわかった。着床後の胎児の死亡率については、統計的にむしろ免疫群の方が対照群より有意に低い結果が得られたが、これは、着床前の損失率が著しく高かったことによるものである。妊娠20日令の生胎児の1匹あたりの重量について検討した結果は、とくに著しく対照より小さいものは認められなかった。これらのことから、ラット雄性生殖器による免疫で、雌ラットの繁殖に及ぼす影響で最も大きいのは、排卵から着床に至る段階における障害であることが明らかになった。さらに、各抗原とも免疫による障害を生じさせることも明らかであるが、各免疫群の中ではラット精のう腺免疫群の影響が特に著しく、次でラット精巣上体免疫群であった。(第2節)

投与する抗原量を前節の実験より増量して免疫した結果、妊娠率には著しい影響は認められなかった。また、黄体数、着床数には対照との間に差が認められなかったが、生胎児数はラット精子免疫群とラット精のう腺免疫群において著しく少ないものが認められ、着床後の胎児の死亡率はとくにラット精のう腺免疫群は対照群に対して5%の危険率で統計的に有意に高かった。このことから、抗原量を増加しても前節に認められた現象がさらに強く見られるということはなく、着床後の段階で影響が現われることが明らかになった。(第3節)

ラット雄性生殖器でうさぎを免疫して抗血清を得、その抗血清を雌ラットに投与してその繁殖に及ぼす影響について検討を加えた。その結果、妊娠成立にはとくに影響が認めら

れなかった。妊娠20日令における剖検では、抗ラット精のう腺うさぎ血清を投与した群における着床数は、正常うさぎ血清投与対照群および無処置対照群に対して1%の危険率で統計的に有意に少なかった。他の検査項目に対する抗血清投与による影響は認められなかった。

このことから、ラット精のう腺は、直接免疫の場合のみならず抗血清投与によってもラットの繁殖のとくに着床までの段階で障害を与えることが明らかになった。

次に、抗体産生の確認と第2章で認められた着床前の段階での障害のおこる機序について検討した。(第3章)

抗体産生の検討を試みたが、その結果沈降反応重層法において、抗ラット精のう腺血清は最高128倍、抗ラット精子血清は最高64倍の力価が得られ(表5)、血球凝集反応において両抗血清とも最高64倍の力価を示した(表6)。また寒天内沈降反応においては、両抗血清とも明瞭な沈降線を示した。さらに、両抗原は共通の抗原系を有し、また、ラット精のう腺の方がラット精子より強い抗原系をもつことも明らかになった。(第1節)

ラット精子およびラット精のう腺に対する抗血清を電気泳動法により分析した結果、 γ グロブリンの増加が認められた。(第2節)

in vitro における精子への免疫の影響を調べる目的で、ホールスライドグラス上での精子凝集反応を実施した結果、対照群に比べてラット精子免疫群、ラット精のう腺免疫群、ラット精巢免疫群のいずれもが明瞭な凝集を示した(表7)。その際の精子の凝集の様子は、頭部同志を付け合う、いわゆるHead-Head型であり、凝集が強度の場合は、車軸状に精子が凝集する様子が観察された。(第3節)

in vivo における交尾後の精子に及ぼす免疫の影響を調べる目的で、交尾後、経時的にラットを殺して子宮および卵管内の精子数を調べた。その結果、ラット精子免疫群、精のう腺免疫群ともに交尾5~10分後に子宮内に精子があるにも拘わらず、卵管内の精子が0の場合があり、これは15分後にもラット精子免疫群には認められた。その後の時間では、各免疫群とも対照との差は認められなかった。このことから、免疫の影響がわずかであるが精子の上走にみられた。(第4節)

着床時の子宮への免疫の影響を調べるために、脱落膜腫形成の様子を調べたが、重量、組織学的検査共に差がなく、免疫の影響は認められなかった。(第5節)

受精卵の活性への免疫の影響を調べるために、受精卵のこはく酸脱水素酵素活性を組織化学的に調べた。その結果、ラット精のう腺免疫群で胎胚期において染色性の悪いものが多く見られたことから、免疫の影響が受精卵に認められることがわかった。(第6節)

これらのことから、ラットの精子もしくは雄性生殖器による雌ラットの繁殖に及ぼす影響は、精子の凝集および上走、受精卵の活性などに少しずつではあるが認められ、それらが総合して着床までの段階で強い障害となってあらわれるものと思われる。

表 1 アジュバントの使用有無と抗体価の推移

グループ	抗原	アジュバントの有無	反 応			
			1	2	3	4 (週)
1	豚精のう腺液	有	±~+	+~++++	+++	+++
2	豚精のう腺液	無	+	++~++++	+++	+++
3	牛精のう腺液	有	-~±	-~±	±~+	+~++
4	牛精のう腺液	無	-	-	±~+	+~++

反応の強さの判定

++++.....最強 (絮状物 2 個以上)

+++.....強 (絮状物約 1.5 個)

++.....弱 (絮状物約 1 個)

±.....微弱 (絮状物約 0.5 個)

-.....反応なし

表 2 投与抗原とグループ分け

グループ	ラット数	投与した抗原
1	12	精 巢
2	12	精巢上体
3	12	前立腺
4	12	精のう腺
5	12	尿道球腺
6	12	雄ラット血清 (対照 1)
7	12	無投与 (対照 2)

表 3-1 生殖器投与の黄体数、着床数、生胎児数に及ぼす影響

		(平均値±s.e.)						
グループ		1	2	3	4	5	6	7
ラット数		11	12	9	11	9	12	9
黄体数		18.18 ±0.75 (22-14)	17.08 ±0.86 (22-13)	17.89 ±1.02 (23-15)	17.00 ±0.80 (22-14)	17.67 ±1.22 (24-15)	19.00 ±0.85 (23-15)	18.11 ±0.59 (21-15)
着床数		14.56 ⁺ ±0.45 (16-12)	13.17 ⁺⁺ ±0.55 (16-10)	13.11 ⁺⁺ ±0.68 (16-9)	11.88 ⁺⁺ ±1.57 (16-3)	14.22 ⁺ ±0.55 (16-11)	15.92 ±0.38 (17-13)	15.22 ±0.32 (16-13)
生胎児数		12.36 ±0.58 (15-9)	11.75 ⁺⁺ ±0.66 (15-7)	12.22 ⁺⁺ ±0.55 (14-9)	10.55 ⁺⁺ ±1.50 (16-3)	11.00 ⁺ ±1.55 (16-4)	14.33 ±0.48 (16-12)	12.78 ±0.55 (15-11)

+ グループ6との間に有意差が認められた(+..... P<0.05 ++ P<0.01)

* グループ7との間に有意差が認められた(*..... P<0.05 **..... P<0.01)

表 3-2 生殖器投与の卵巣重量，生胎児重量に及ぼす影響

	(平均値±S.E.)						
グループ	1	2	3	4	5	6	7
卵巣重量 (mg)	118.75 ±3.70	113.53 ±7.30	116.00 ±2.31	115.47 ±3.77	112.18 ±5.02	124.34 ±3.63	121.60 ±5.09
1腹の子の 重量(g)	30.64 ±1.21	27.53 ⁺ ±1.97	28.29 ⁺⁺ ±0.59	25.22 ⁺ ±3.56	25.68 ⁺ ±3.83	33.51 ±0.83	29.71 ±1.89
生胎児重量 (g)	2.41 ⁺⁺ ±0.02	2.34 ±0.03	2.31 ±0.03	2.39 ⁺ ±0.02	2.35 ±0.03	2.33 ±0.02	2.35 ±0.02

+グループ6との間に有意差認められた (++++P<0.05 ++……P<0.01)

表 6 タンニン酸処理羊赤血球凝集反応による抗体価

群	1	2	3
投与抗原	精子	精のう腺	無処置
ラット数	16	18	18
X 2	0	1	7
X 4	3	2	8
X 8	1	5	3
X 16	5	5	0
X 32	4	3	0
X 64	3	2	0
X 128 \leq	0	0	0

表 7 ラット雄性生殖器免疫雌ラット血清と精子凝集

群	1	2	3	4
投与抗原	精子	精のう腺	精巣	無処置
実験 I	+++ (X 4~X 64)	+++ (X 2~X 8)		+~++ (X 4~X 8)
実験 II	+++ (X 64)	+~++ (X 16)	+~++ (X 16)	+~+ (X 4)

実験 I …… 第 1 節に使用したラットの血清を用いた。

実験 II …… 第 5 節に使用したラットの血清を用いた。

() …… タンニン酸処理羊赤血球凝集反応の抗体価

審査結果の要旨

家畜の繁殖障害は畜産経営上大きな問題であり、その繁殖障害の原因の一つに精子または精液による免疫の影響が考えられているが、なお詳細な基礎的研究がなされていない。本論文は、ラットを用いて同種雄性生殖器の免疫による雌ラットの繁殖への影響並びにその機序について検討を行ったものである。

著者はまずラットにおいては、精液を多重に得ることが困難なため、精液を構成する副生殖器、すなわち、精巣、精巣上体、前立腺、精のう腺、尿道球腺をそれぞれ均質化したものを抗原として免疫に用いた。免疫の4週間後より交配し、妊娠20日令における剖検で黄体数、着床数、生胎児数、卵巣重量、胎児重量につき検討した。その結果、とくに着床数が各免疫群とも対照（雄ラット血清投与群および無処置群）に比べて統計的に有意に減少していることから免疫の繁殖に及ぼす影響は卵子が着床するまでの段階で強くあらわれることを認め、とくに精のう腺免疫群で着床数が著しく少ないことを認めた。さらに抗原量を増量して同様の検討を試みたが、抗原増量により影響が増大することはなかった。また、うさぎを免疫して得た抗血清を雌ラットに投与して同様に調べた結果においても、抗ラット精のう腺うさぎ血清投与群の着床数が対照より統計的に有意に減少することを認めた。次にこれらの免疫群につき、血中抗体価を沈降反応重層法および血球凝集反応により調べた結果、32～64倍の力価を示したものが多く、最高は128倍であった。寒天内沈降反応においても沈降線が明瞭に認められ、さらに電気泳動法によって γ グロブリンが増加することを認め、次ぎに着床までの段階における免疫の影響につき検討するために精子については凝集反応を実施した結果、対照に比べて強い精子の凝集が認められ、また交尾後の各時間における子宮および卵管内精子数を調べた結果、免疫群の精子の上走がやや遅いことを認めた。一方、卵子についてはコハク酸脱水素酵素活性を調べた結果、免疫群の胚盤胞期の卵子に染色性の弱いものが多いことを認めた。これらの結果から、精子の凝集、上走、卵子の活性などに少しずつ免疫の影響が加わり、これらが総合して着床までの段階で強い影響となってあらわれることを認めた。一方着床時に重要な役割を演ずる脱落膜反応については免疫の影響を認め得なかった。

以上のように本論文は雄性生殖器による免疫の雌の繁殖に及ぼす影響の詳細に検討し、その機序を明らかにしたもので、その間いくつかの新知見を含み、家畜繁殖学の進歩に寄与するところが大きい。よって、審査員一同は著者に農学博士の学位を授与される資格を有するものと認定した。