

○岡崎哲司・秋好禎一・佐藤邦雄・島田昌之¹⁾・川部太一
(大分農林水産研指畜産・¹⁾広島大院生物圏)

【目的】

近年、我々の研究チームは、凍結融解後においても高活力を有したブタ凍結精液技術を開発してきた。しかし、その技術で作出した凍結精子を、精漿を含まない融解液で人工授精 (AI) すると、受胎率は低いものであった。一方で、融解液に精漿を添加して AI すると、その繁殖成績は改善されることから、精漿には正の役割があると考えられる。その効果として、精子の受精能獲得 (capacitation) を抑制し、運動性を維持すること、AI 後の子宮内の白血球数を 48 時間以内に消失させるという、精子および子宮双方に作用することが分かっている。偏心および壁内着床を呈する齧歯類や霊長類の精漿は、免疫抑制作用を示し、着床部位への白血球の浸潤および分化を誘導する。主に、ヘルパー T 細胞 (Th-cell) の Th2 および制御性 T 細胞 (reg-T) への分化誘導を行うことで半同種移植片である胎子を許容し、妊娠が成立することが知られている。しかし、中心着床を示すブタにおいては、精漿が白血球の分化にどのような影響を及ぼすかは全く知られていない。そこで、本研究では、白血球分化の遺伝子解析が可能なマウス脾細胞を用いてブタ精漿の効果を検討した。

【材料および方法】

ブタ精漿による T-cell 分化誘導能を確認するため、マウス脾臓細胞の初代培養系を用いて Real time PCR およびマイクロアレイ解析を実施した。細胞性免疫を示す Th1 マーカーには *Tbet*, *Ifng*, および *Stat1* を、reg-T マーカーは *Foxp3*, *Il10*, *Cd25* を指標とした。また、血中、精漿および子宮粘液中のサイトカイン濃度は ELISA 法にて測定した。

【結果および方法】

マウス初代培養系によるブタ精漿の白血球分化誘導能においては、精漿無添加区においては、培養 72 時間後に自発的に Th1 へ分化したのに対して、精漿 10% (v/v) 添加した精漿区においては、Th1 マーカーである *Ifng* および *Tbet* は抑制された。これらの作用は供試した 3 頭の雄個体由来の精漿全てで観察された。また、マイクロアレイ解

析の結果、精漿を添加した区において、無添加区と比較し、同様に Th1 マーカー遺伝子は抑制状態にあっただけでなく、*Foxp3*, *Il10* および *Cd25* など regT マーカー遺伝子が増強されていた。つまり、ブタ精漿はマウスやヒトなどの精漿と同様に Th1 を抑制し、regT へと誘導する可能性が示された。

精漿には TGFβ や IL-6 といったサイトカイン存在するという報告がある。これらは炎症性 Th17 へと分化誘導する因子として近年知られている。T 前駆細胞は TGFβ 存在下で IL-6 が作用すれば Th17 へ、IL-2 が作用すれば reg-T へと分化する。つまり、精漿中のこれら因子の濃度バランスで reg-T へと誘導されずに Th17 へと誘導される可能性も考えられる。そこで、各因子の精漿中濃度を測定したところ、TGFβ と IL-6 は精漿中に検出されたが、その濃度は、子宮粘液中のものと比較して非常に低いものであった。一方、IL-2 は、子宮粘液中で非常に低く、精漿中に多く検出された。これらの結果から、精漿はその成分に依存して reg-T または Th17 に誘導する可能性が示唆された。実際に、血清 (TGFβ 存在) と精漿存在下でマウス脾細胞を培養し、その遺伝子発現を解析したところ、3 個体由来の精漿すべてが自発的な Th1 誘導を抑制したが、1 個体由来の精漿においてのみ Th17 マーカーである *Il17* を増強させた。この個体の精漿中 IL6 濃度は他の個体よりも非常に高いものであった。さらに、TGFβ 存在下で IL-2 を添加すると、濃度依存的に *Foxp3* と *Il-10* が増加し、reg-T へと誘導された。

以上の結果から、ブタ精漿は齧歯類や霊長類と同様、白血球の免疫抑制作用を有し、その作用は主に、Th1 への分化抑制能によることが示唆された。また、AI 後の免疫寛容においても精漿による白血球による reg-T 分化が関与している可能性も示された。今後、このような精漿の作用が、AI 後どの時点で、どこの白血球 (あるいは細胞) に直接的に働いているのかを詳細に検討することが必要であると考えている。