

= ミニレビュー =

精子の自然免疫機構 —Toll like receptorによる細菌感染の認識とその受精抑制作用—

Innate immune functions of sperm –Toll like receptor family expressed on sperm recognize bacteria infection to decrease fertilization ability–

藤田 陽子^{1,2,†}, 根岸 広明², 島田 昌之¹

Yoko FUJITA^{1,2,†}, Hiroaki NEGISHI² and Masayuki SHIMADA¹

¹広島大学大学院生物圏科学研究科 生殖内分泌学, 〒739-8528 広島県東広島市

²ウイメンズ・クリニック大泉学園, 〒178-0063 東京都練馬区

[†]責任著者: y_fujita@kiyosenomori.com

要旨

精液は細菌により感染されていること、またその細菌感染が妊娠率の低下のみでなく、凍結精液や液状保存精子の運動性をも低下させることが知られている。ペニシリンなどの溶菌性抗生物質が精子の洗浄液や保存液へ添加されているが、その効果は部分的であるため、精液への細菌感染と精子の機能との関係は不明な点が多い。我々のこれまでの研究から、精液にグラム陰性菌やグラム陽性菌が検出され、さらにそれぞれが放出する内毒素が検出された。ブタ、マウス、ヒト精子における内毒素の受容体であるTLR2/4の発現を検出した結果、精子先体部に局在していた。さらに、TLR2/4のそれぞれのリガンドである内毒素の添加は、いずれの種においても精子の先体部を損傷させ、Caspase活性によるアポトーシスを引き起こし、精子生存率を低下させた。さらに、TLR4、TLR2/4ノックアウトマウスを用いた研究から、TLR2/4がそれぞれのリガンドを特異的に認識し精子生存性に影響を与えることが示され、体内および体外での受精能にも影響を与えることが明らかとなった。これらのことから、精子はTLR2/4を発現し、それが精液中の細菌感染を認識し、アポトーシスにより生存性を低下させるという、精子の初期免疫応答が初めて明らかとなった。我々は、精子の凍結保存や液状保存において、処理液や保存液中への溶菌性抗生物質とPMB複合処理が、人工授精や体外受精における受胎率や受精率を向上させることも確認していることから、精子の自然免疫応答の解析は、ヒトの高度生殖補助医療にも大きく貢献するものであると考えられる。

キーワード: peptidoglycan, lipopolysaccharide, sperm motility, sperm apoptosis, Toll-like receptor

序論

生殖器の細菌感染は、男性不妊要因の1つとなっている[5,10,11,24]。重篤な精巣への細菌感染は、精子形成不全を引き起こし、副生殖器官への細菌感染は、精漿成分の変性により、精液中の精子機能が低下する[4,25]。一方、細菌感染している精液の中には、白血球数が集積し、膿精液症となる症例も認められ、これらの精液中の精子運動性も低下することが報告されている[29]。白血球は、非自己(感染細菌など)の存在をpattern recognition receptorであるToll-like Receptor (TLR)により認識し、サイトカイン、ケモカインの分泌を誘

起する[33,34]。このときに分泌されるサイトカインの一種であるTNF- α は、多くの細胞の膜表面に発現するtype1-TNFRと結合することにより、アポトーシスを誘導する[1]。精子にもtype1-TNFRが発現しており、ヒト射出精液中にTNF- α を加えると、精子運動性が低下し、アポトーシスを起こした精子の割合が上昇することが報告されている[28]。これらのことから、精漿中の細菌感染による精子運動性の低下は、白血球からのサイトカインの分泌による自然免疫応答によって誘起されていると考えられてきた。

投稿日: 2011年11月17日

掲載決定日: 2011年12月20日

ウェブサイト事前公開日: 2011年12月21日

表1. 精液中細菌感染頻度と精液所見への影響

	グラム陽性菌	グラム陰性菌	細菌感染なし	
精液量 (ml)	2.48	2.70	2.70	N.S
精子数 (×106/ml)	87.65	82.44	121.44	N.S
運動率 (%)	54.01	58.14	43.14	N.S
奇形率 (%)	45.73	43.29	43.14	N.S
白血球数 (×106/ml)	0.8	1.38	0.42	<i>P</i> < 0.05
TUNEL 陽性率 (%)	22.0	N.D.	13.4	<i>P</i> < 0.05

全検査数 372 症例のうち、非感染症例は 253 症例で感染症例は 119 症例であった。感染症例のうち、グラム陽性菌感染は 110 症例(29.5%)でグラム陰性菌感染は 9 症例(2.4%)であった。

近年、免疫細胞以外においてもTLR familyなどの免疫細胞関連遺伝子が発現し、それぞれの器官で重要な生理的役割を果たしていることが報告されている。排卵後の卵丘細胞卵子複合体においては、卵丘細胞にTLR2とTLR4が発現し、受精過程で産生される短鎖ヒアルロン酸により活性化され、ケモカイン類を発現・分泌する[31,32]。精子には、それら卵丘細胞が分泌するケモカイン類に対する受容体が発現し、ケモカインにより精子は卵近傍に誘引され、受精能を獲得する[32,35]。これらのことから、受精には、免疫機能に関わる遺伝子の発現が必要であり、精子も免疫細胞様の機能を有していると推察された。

本ミニレビューでは、私達がこれまで明らかとしてきた「精子は、自身に発現するTLR2とTLR4を介して細菌が放出する毒素を感知し、その結果アポトーシスの誘導と受精能を低下させる自然免疫機構を有する」という研究成果を紹介し、それから考えられる精子の最適処理法について考察する。

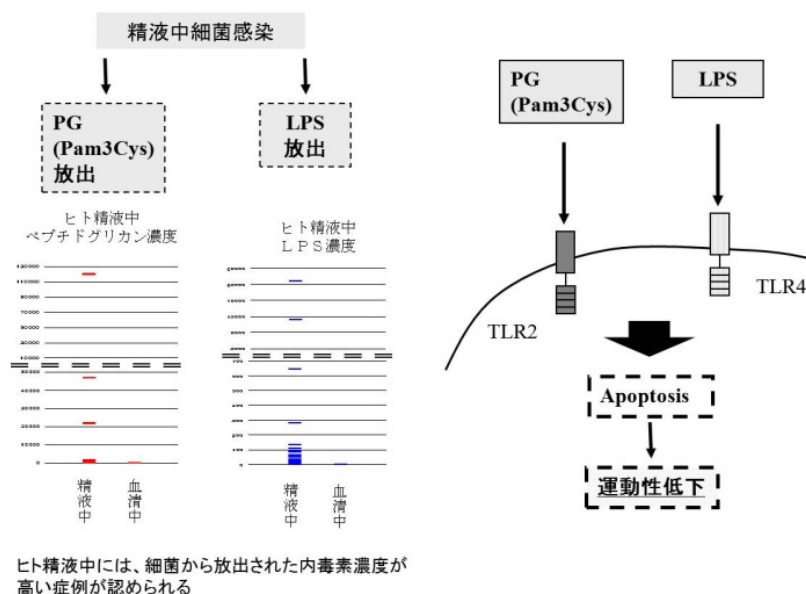
ヒト精液中の細菌感染と精子の運動性、精子の自然免疫能

ウイメンズ・クリニック大泉学園において、体外受精プログラムの精液検査施行時にインフォームドコンセントを得た患者(n=372)において、細菌検査を行った。その結果、119症例において、精液中に細菌感染が認められた。その内訳としては、グラム陽性菌感染症例は29.6% (110/372)、グラム陰性菌感染症例は2.4% (9/372)であった。細菌感染症例における精液所見では、精子数、精液量、射出直後の精子運動性および精液中の白血球数への影響は認められなかったが、TUNEL陽性率ではグラム陽性菌感染症例において有意に高い値を示した(表1)。De Francesco等は、147人の患者で精液検査を行い、その時の白血球数と細菌感染との間に有意な関係は認められないが、精子の運動性は低下することを報告している[9]。一方、重度の副生殖器官における

細菌感染は、精液中の白血球数の増加を引き起こし、白血球の分泌するTNF- α の作用により、精子の運動性低下が引き起こされる[29]。したがって、我々の結果を含む上記の報告から、重度の細菌感染とは異なり、軽度のそれでは、細菌が放出する毒素を白血球非依存的に精子自身が感知し、運動性の低下とアポトーシスを誘起している可能性が示された。

グラム陽性菌は、溶菌時に細胞膜成分のペプチドグリカンを放出し、これが毒素として作用する[19,20]。そこで、ヒト精液中におけるペプチドグリカン濃度を測定した結果、血清中の濃度と比較して、高濃度に含まれている症例が多く認められた。また、グラム陰性菌が放出する内毒素であるlipopolysaccharide(以下LPS)は、グラム陽性菌においても放出するものがあるとの報告から[14,27]、精液中のLPS濃度の測定も行った。その結果、LPS濃度は、ペプチドグリカンと同様に精液中で高濃度に含まれる症例が認められた。そこで、これら細菌性の毒素と精子との関係を明瞭化する目的で、細菌感染フリーの精液を用いて、合成ペプチドグリカンであるPam3cysあるいはLPSの添加実験を行った。Pam3cysあるいはLPS処理は、コントロールの無処理群と比較して、精子運動性を有意に低下させ、TUNEL陽性率を有意に上昇させた。これらのことから、精液中には細菌の内毒素であるLPS、ペプチドグリカンが高濃度に検出される症例が存在すること、その毒素により精子運動性の低下やアポトーシスが誘起されることが示された。LPSの毒性は、リポドA構造に依存していること、PMBは、リポドA構造に直接的に結合し、その毒性を低下させることが報告されている[16,23]。そこで、LPS濃度が比較的高濃度な症例に対して、LPSの中和剤であるpolymyxin B(以下PMB)処理を行った。その結果、精子運動性の低下が抑制され、TUNEL陽性率が低下した。これらの結果から、細菌感染症例においては、細菌が放出する毒素により、精子が直接的にアポトーシスを誘起していることが示された。

精子の自然免疫機構



ヒト精液中には、細菌から放出された内毒素濃度が高い症例が認められる

図1. ヒト精液中の内毒素放出と精子への影響について

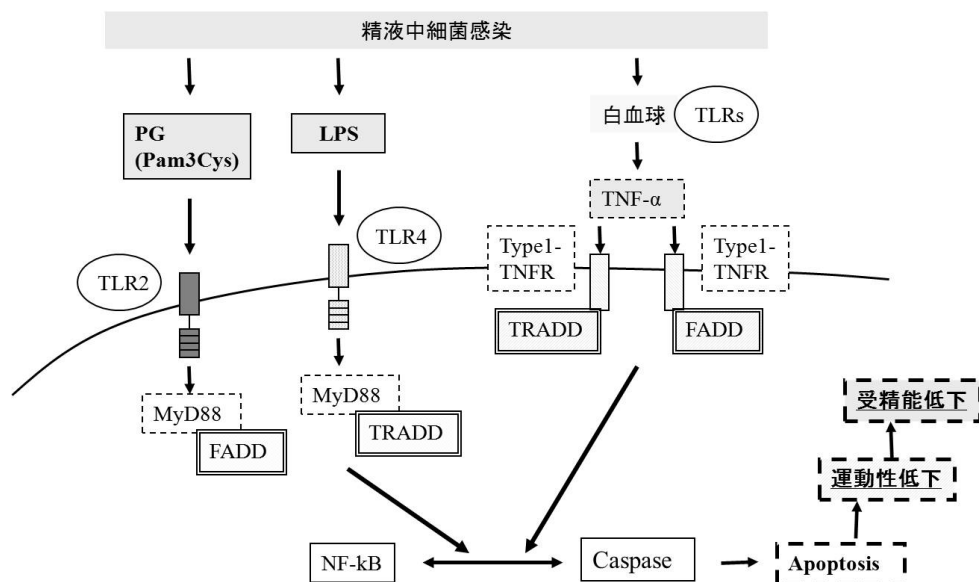


図2. マウス精子のTLR2/4の作用について

LPSの受容体としてTLR4が、PG受容体としてはTLR2が知られている[18,29,30,34]。そこで、ヒト精子にこれら受容体が発現しているか否かを、mRNAおよびタンパク質レベルで検討した。ヒト精子のRNAを抽出し、逆転写後、特異的プライマーを用いたPCR法によりTLR2とTLR4の発現を検出した。その結果、特異的なPCR産物が得られ、そのシーケンス解析からヒト精子がTLR2とTLR4を発現していることが明確化された。しかし、精子には翻訳されない擬似的RNAが存在することから、western blottingにより、タンパク質レベルでの発現も検討した。抗ヒトTLR2抗体により、ポジティブコントロールとして用いたヒト白血球サンプルと同様の110 kDa

付近にバンドが検出された。さらに、TLR4においても85 kDaのバンドが検出された。Western blottingに用いたものと同じ抗体を用いて免疫蛍光染色を行った結果、TLR2とTLR4は共に先体部位に局在していることが示された(図1)。

マウス精子を用いたTLRsの詳細な機能解析

ヒト精子にTLRsが発現し、それらが細菌を放出する内毒素を認識していること、その受容体の活性化により精子の運動性の低下とDNAの損傷を増加させることが示された。そこで、これらの詳細な作用機序と受精への直接的な影響を明らかとするために、マウスをモデルと

した基礎的研究を行った。

マウス精子にもTLR2とTLR4がmRNAおよびタンパク質レベルで発現し、それらは先体部位に局在していた。そこで、Tlr2とTlr4の遺伝子欠損マウスを用いて、それらの機能性を受精能力を含めて検討した。野生型マウス、Tlr2ノックアウトマウス、Tlr2/4ダブルノックアウトマウスの精巣上体精子を回収し、それぞれのリガンドであるLPSあるいはPam3cys添加培地で培養し、その精子の運動性、TUNEL陽性率、体外受精能の検討を行った。その結果、野生型マウスでは、LPSあるいはPam3cys処理区において、無処理区と比較して運動性が有意に低下し、TUNEL陽性率は有意に増加した。Tlr4ノックアウトマウスでは、LPS処理区では運動性の低下、TUNEL陽性率の増加は認められず、Tlr2/4ダブルノックアウトマウスにおいては、LPS、Pam3cysどちらの処理区においても、運動性の低下、TUNEL陽性率の増加は認められなかった。これらのことからマウス精子に発現するTLR2とTLR4が、それぞれのリガンドを特異的に認識し、精子運動性の低下やアポトーシスを誘起していることが明確化された。この結果は、免疫細胞から分泌されるサイトカイン・ケモカインからの影響を受けていない精巣上体精子の体外培養における実験結果であり、細菌が放出する毒素が直接的に精子を刺激し、精子機能性を低下させることが示された。

マクロファージなどの免疫細胞では、細菌により活性化したTLRsはMYD88を介してNF- κ Bのリン酸化や、caspase3を活性化し、アポトーシスを誘起する[2]。マウス精子においても、LPSもしくはPam3cysのどちらの刺激においてもNF- κ Bのリン酸化とcaspase3の分解による活性型への移行が認められたことから、精子に発現するTLR2とTLR4は、マクロファージと同様のシグナル伝達系を活性化させていると考えられた。免疫細胞において、TLR2とTLR4がMYD88を介して活性化するシグナル伝達経路としてTNFR-1 associated death domain protein (TRADD)がある。物質名から推察できるようにTRADDは、MYD88のみでなく、Type I TNFRにも直接的に結合し、活性化する因子である[7,17]。実際にTradd欠損マウスは、TNF- α もしくはTLR4のリガンドのどちらの刺激に対しても、NF- κ Bとcaspase3の活性化が起らないことが報告されている[12]。TLR2においてはFas-associated death domain protein(FADD)系がアポトーシス誘起に関与するが[2]、この経路もまたTNF- α により活性化されることが報告されている[3,28]。さらに、精液中の白血球によるTNF- α の分泌は、精子のType I TNFRを介してアポトーシスを誘起する[3,28]。これらのことから、精液中に細菌から放出され内毒素が存在すると、白血球が集積しTNF- α が分泌されることと、内毒素が直接精子のTLRsを刺激することにより両経路が活性化し、精子のア

ポトーシスが誘起されると考えられる。一方、LPSやpam3cysは、TLRsを介して細胞内のCa²⁺を上昇させるとの報告もある[8]。精子内のCa²⁺濃度の急激な上昇は、精子膜の変化を引き起こし、精子のネクローシスを誘起する[22]。したがって、精子TLRsを介した精子の運動性の低下は、caspase3の活性化によるアポトーシスと、Ca²⁺濃度の上昇によるネクローシスによるものと考えられる。

ヒトの体外受精において、高頻度に精子アポトーシスが起きている症例では、受精率の低下、移植胚の流産率の上昇が認められる[6]。そこで、細菌感染に伴う細菌性毒素に曝された精子の受精能力について検討を行った。体外受精を行うため、野生型雌マウスにeCGとhCGを投与し、hCG投与16時間後に卵管から成熟卵を回収した。精子は、Tlr4ノックアウトマウス、Tlr2/4ダブルノックアウトマウスおよび野生型マウスの精巣上体から回収し、BSA含有の前培養液にLPSあるいはPam3Cys添加条件で受精能獲得処理を行った。この前培養した精子を用いて体外受精を行い、媒精12時間後に前核形成によって受精を確認した。受精率は野生型マウス精子では、コントロールの無処理区と比較してLPSあるいはPam3cys処理により有意に低い値を示した。Tlr4ノックアウトマウスの精子をLPSで処理した時、受精率の低下は認められず、Tlr2/4ダブルノックアウトマウスの精子では、LPSあるいはPam3cysで処理した場合にも、受精率の低下は認められなかった。体内での精子受精能を検討するため、マウス精巣上体精子を不活化した大腸菌と供培養し、それを外科的人工授精に用いた。その結果、不活化大腸菌と供培養した精子を注入した子宮や卵管での炎症反応は認められなかったが、大腸菌数に依存して受精率が低下した。しかし、LPSの中和剤であるPMBを大腸菌との供培養下に添加した時、受精率の低下が抑制された。これらのことからマウス精子に発現するTLR2とTLR4は、それぞれのリガンドである内毒素を認識することにより、受精能を低下させることが示された(図2)。

人および家畜の精子処理法への応用

ブタは凍結精液を用いた人工授精が実用化技術に至っていないことから、ウシとは異なり液状精液を15°Cで保存して、それを用いた人工授精が行われている。このブタの液状精液は、1週間程度の保存が可能であるが、個体によっては3日間程度で、精子の運動性が急速に低下する場合がある。この液状保存における保存可能期間について、抗生物質を添加しているにも関わらず、射出直後の精液中の細菌数が負の影響をもたらしていることが明らかとなった[26]。ブタ精液においては、

70%以上の個体から細菌感染が認められ、その多くはグラム陰性菌である。射出精液を3時間以上37°Cで培養すると、ペニシリンGやアミカマイシン添加条件にも関わらず射出時の細菌数と培養後の運動性に負の相関が認められる。この抗生物質の添加により、グラム陰性菌が放出するLPS濃度が精液中で上昇し、この上昇と精子の運動性低下はLPSの中和剤であるPMBにより完全に抑制される。さらに、マウスやヒト精子と同様にブタ精子の先体部位にもTLR4が発現していることから、ブタ精液中に感染した細菌は内毒素を放出し、それが精子に作用して、精子の機能性を失わせていることが示された。したがって、15°Cの保存条件においても抗生物質が細菌の増殖を抑制するが、内毒素の放出を促進するために、細菌感染数が高値な精液では保存可能期間が短くなったと考えられる。

そこで、この15°C保存時にPMBを既存の保存液に添加することにより、いずれの個体から採取した精液においても長期間の精子保存を可能とした。また、実験レベルではあるが、この保存液を用いた時、保存10日目の精液の人工授精で受胎率が80%以上の成績が得られた。さらに、射出精液の洗浄および希釈液にこのPMBを添加し、凍結精液を作製する手法を開発した[26]。これは、ブタにおいては、15分間程度のLPS刺激期間で、細胞膜の変性が誘起されることから、これが、ブタ精子の凍結保存を困難にしている原因と考えたからである。その結果、融解後の生存性が維持され、人工授精による受胎率も向上することが明らかとなった。我々はブタ射出精液を常温輸送し、それを1日あるいは2日後に凍結する技術の確立を目指しているが、このPMBなどの内毒素による精子への負の影響を緩和させる処理が解決へのキーとなると考えて開発を進めている。

ヒト精液の処理においても、マウスおよびヒトにおける基礎的知見に加えて、上述のブタにおける知見を参考にすることが必要である。すなわち、ヒト精漿中には、グラム陽性菌が多く含まれ、その内毒素であるペプチドグリカンも高濃度で含まれていた。さらに、ヒト精漿中には、LPSと強く結合し、その活性を変化させ可溶性のsCD14 (soluble CD 14 α , β)や[15]、LBPが存在することが報告されており[21]、これらの複合体は今回測定した遊離LPSとは異なるため、精漿中には検出値以上のLPSが存在している可能性が推測される。したがって、ヒト精子においてもできるだけ射出後ただちに内毒素を不活化する、あるいは精子から分離する必要がある。ブタにおいては、感染細菌はグラム陰性菌が主であり、その内毒であるLPSの中和剤であるPMBが利用可能である。しかし、ヒトではグラム陽性菌が多く、ペプチドグリカンが精子に負の影響を与えていた[13]。ペプチドグリカンは、タンパク

質が混在していない試験管内では、プロテアーゼにより不活化することができる。しかし、生体成分中では中和する薬剤は今のところ存在しない。一方、TLR2とTLR4へのリガンド結合を抑制する、あるいは下流シグナル系を特異的に阻害することは将来応用できる可能性がある。すなわち、TLR2あるいはTLR4に対する中和抗体を精液処理液に添加する方法や[32]、敗血症の治療薬を用いる方法である。敗血症は細菌感染症の治療時に抗生物質により急激に細菌性の(内)毒素が放出され、重篤な症例では死に至る疾患である。現在治験段階にある薬剤は、TLR2およびTLR4の下流を標的とする化合物であり、これがヒト精液の処理に利用できるかもしれない。しかし、現状においては、採精直後の精液から速やかに精漿と精子を分離するだけでなく、同時に精漿中の細菌や内毒素を除去するため、密度勾配遠心法を行うことが有効であると考えられる。

これらのことをまとめると、精子にはいくつかの免疫様の作用があり、TLRsの発現もその1つである。精子に発現しているTLR2/4は、精漿中の細菌から放出される内毒素を認識し、運動性を低下させアポトーシスを誘起している。このように機能性が失われた精子は受精能も低下することが示された。ヒト生殖医療でも精子の質の低下はその後の胚発生や妊娠率へ影響を及ぼすと考えられ、ART成功のためには、ARTに用いる精子の処理を検討することが必要であると考えられる。

謝辞

本研究の一部は、生物系特定産業技術研究支援センター イノベーション創出基礎的研究推進事業 発展型研究として、実施した。

参考文献

1. **Aggarwal BB.** Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 745–756.
2. **Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A.** Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 1999 30; 285: 736–739.
3. **Allam JP, Fronhoffs F, Fathy A, Novak N, Oltermann I, Bieber T, Schuppe HC and Haidl G.** High percentage of apoptotic spermatozoa in ejaculates from men with chronic genital tract inflammation. *Andrologia* 2008; 40: 329–334.
4. **Althouse GC, Kuster CE, Clark SG, Weisiger RM.** Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology* 2000; 53: 1167–1176.
5. **Anderson DJ, Hill JA.** Cell-mediated immunity in infertility. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 1988; 17: 22–30.
6. **Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L,**

- Flamigni C and Coticchio G.** Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum. Reprod.* 2006; 21: 2876–2881.
7. **Chen NJ, Chio II, Lin WJ, Duncan G, Chau H, Katz D, Huang HL, Pike KA, Hao Z, Su YW, Yamamoto K, de Pooter RF, Zúñiga-Pflücker JC, Wakeham A, Yeh WC, Mak TW.** Beyond tumor necrosis factor receptor: TRADD signaling in toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2008; 105: 12429–12434.
 8. **Chun J, Prince A.** Activation of Ca²⁺-dependent signaling by TLR2. *J. Immunol.* 2006; 177: 1330–1337.
 9. **De Francesco MA, Negrini R, Ravizzola G, Galli P, Manca N.** Bacterial species present in the lower male genital tract: a five-year retrospective study. *Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care* 2011; 16: 47–53.
 10. **Diemer T, Ludwig M, Huwe P, Hales DB and Weidner W.** Influence of urogenital infection on sperm function. *Curr. Opin. Urol.* 2000; 10: 39–44.
 11. **Eley A, Pacey AA, Galdiero M, Galdiero M and Galdiero F.** Can Chlamydia trachomatis directly damage your sperm? *Lancet Infect. Dis.* 2005; 5: 53–57.
 12. **Ermolaeva MA, Michallet MC, Papadopoulou N, Utermöhlen O, Kranidioti K, Kollias G, Tschopp J and Pasparakis M.** Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nat. Immunol.* 2008; 9: 1037–1046.
 13. **Fujita Y, Mihara T, Okazaki T, Shitanaka M, Kushino R, Ikeda C, Negishi H, Liu Z, Richards JS, Shimada M.** Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 on human sperm recognize bacterial endotoxins and mediate apoptosis. *Hum. Reprod.* 2011; 26: 2799–8206.
 14. **Ginsburg I.** The role of bacteriolysis in the pathophysiology of inflammation, infection and post-infectious sequelae. *APMIS* 2002; 110: 753–770.
 15. **Harris CL, Vigar MA, Rey Nores JE, Horejsi V, Labeta MO, Morgan BP.** The lipopolysaccharide co-receptor CD14 is present and functional in seminal plasma and expressed on spermatozoa. *Immunology* 2001; 104: 317–323
 16. **Hosseinzadeh S, Pacey AA, Eley A.** Chlamydia trachomatis-induced death of human spermatozoa is caused primarily by lipopolysaccharide. *J. Med. Microbiol.* 2003; 52: 193–200.
 17. **Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV.** TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 1996; 4: 387–396.
 18. **Iwaki D, Mitsuzawa H, Murakami S, Sano H, Konishi M, Akino T, Kuroki Y.** The extracellular toll-like receptor 2 domain directly binds peptidoglycan derived from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 24315–24320.
 19. **Kengatharan KM, De Kimpe S, Robson C, Foster SJ, Thiemermann C.** Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J. Exp. Med.* 1998; 188: 305–315.
 20. **Lefrancier P, Bricas E.** Synthesis of the peptidic subunit of cell wall peptidoglycan of 3 gram positive bacteria and of peptides of analogous structure. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1967; 49: 1257–1271.
 21. **Malm J, Nordahl EA, Bjartell A, Sørensen OE, Frohm B, Dentener MA, Egesten A.** Lipopolysaccharide-binding protein is produced in the epididymis and associated with spermatozoa and prostasomes. *J. Reprod. Immunol.* 2005; 66: 33–43.
 22. **Mishra DP, Pal R, Shara C.** Changes in cytosolic Ca²⁺ levels regulate Bcl-xS and Bcl-xL expression in spermatogenic cells during apoptosis death. *J. Biol. Chem.* 2006; 123: 315–322.
 23. **Morrison D.C., D.M. Jacobs.** Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry* 1976; 13: 813–818.
 24. **Ochsendorf FR.** Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia* 2008; 40: 72–75.
 25. **Ochsendorf FR.** Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum. Reprod. Update* 1999; 5: 399–420.
 26. **Okazaki T, Mihara T, Fujita Y, Yoshida S, Teshima H, Shimada M.** Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar T sperm during liquid storage and cryopreservation. *Theriogenology.* 2010; 74: 1691–1700.
 27. **Osborn MJ, Rosen SM, Rothfield L, Zeleznick LD, Horecker BL.** Lipopolysaccharide of the gram-negative cell wall. *Science* 1964; 145: 783–789.
 28. **Perdichizzi A, Nicoletti F, La Vignera S, Barone N, D'Agata R, Vicari E, Calogero AE.** Effects of tumour necrosis factor-alpha on human sperm motility and apoptosis. *J. Clin. Immunol.* 2007; 27: 152–162.
 29. **Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, Evenson DP, Alvarez JG.** Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 2002; 78: 1215–1224.
 30. **Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ.** Peptidoglycan and lipoteichoic acid induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 17406–17409.
 31. **Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robanya I, Richards JS.** Induced expression of pattern recognition receptors in cumulus oocyte complexes: novel evidence for innate immune-like functions during ovulation. *Mol. Endocrinol.* 2006; 20: 3228–3239.
 32. **Shimada M, Yanai Y, Okazaki T, Noma N, Kawashima I, Mori T, Richards JS.** Hyaluronan fragments generated by sperm-secreted hyaluronidase stimulate cytokine/chemokine production via the TLR2 and TLR4 pathway in cumulus cells of ovulated COCs, which may enhance fertilization. *Development* 2008; 135: 2001–2011.
 33. **Takeda K, Akira S.** TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 2004; 16: 3–9.
 34. **Takeda K, Akira S.** Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 2005; 17: 1–14.
 35. **Tamba S, Yodoi R, Segi-Nishida E, Ichikawa A, Narumiya S, Sugimoto Y.** Timely interaction between prostaglandin and chemokine signaling is a prerequisite for successful fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2008; 105: 14539–14544.