

## 単為発生卵が産生する妊娠認識物質を利用した受胎率向上技術の確立

櫻井貴博・戸田尚美・赤上正貴<sup>1)</sup>・山口大輔<sup>2)</sup>・足立憲隆

Method for improvement of conception rate in cattle using parthenogenetically activated eggs which secretes an interferon tau related pregnancy recognition.

Takahiro SAKURAI, Naomi TODA, Masataka AKAGAMI, Daisuke YAMAGUCHI and Noritaka ADACHI

### 要 約

インターフェロントウ (IFN- $\tau$ ) は栄養膜小胞の他、単為発生卵からも産生される妊娠認識物質であり、その作用によって受胎率が向上することが報告されている。そこで単為発生卵の産生するIFN- $\tau$ が受胎率などに及ぼす影響を調査し、生産現場で実用可能な受胎率向上技術として確立を図ることを目的とした。単為発生卵の効率的な作出方法の検討では、6DMAPによる活性化処理法によると卵割率、胚盤胞発生率ともに高いことが示唆された。また、単為発生卵を従来の凍結方法により凍結、解凍し生存率を調べたところ、24時間、48時間後の生存率は低いものの、胚盤胞脱出率では受精卵と同等であった。単為発生卵のIFN- $\tau$ の産生量は体外受精卵と同等であり、胚が脱出し成長するに従ってIFN- $\tau$ 産生量も増加した。これらのことから、単為発生卵は、一般的に普及している受精卵の凍結方法により凍結保存が可能であることが示唆された。

作出した単為発生卵の胚盤胞を移植することにより発情回帰日数の延長が認められたが、受精卵との共移植による受胎率の向上は認められなかった。人工授精の場合においても、人工授精を行った7日後に単為発生卵3個を追い移植したが、有意な受胎率の改善は見られなかった。

キーワード：単為発生卵，インターフェロントウ，胚盤胞，共移植

### 緒 言

ウシ凍結受精卵の受胎率は平成20年度の調査では46%と、最近10年間横ばい状態である（家畜改良事業団調べ）。また、人工授精による受胎率は肉用牛で62.5%、乳用牛で47.2%と毎年低下し（（社）日本家畜人工授精師協会）、牛の繁殖成績低下は全国的な課題となっており、受胎率向上は生産現場から求められている重要なニーズの一つであると考えられる。

そのような中、近年妊娠認識を増強する物質としてインターフェロントウ（以下、IFN- $\tau$ ）が注目されている。栄養膜小胞（以下、TBV）と受精卵を共移植した場合、TBVから産生される妊娠認識物質であるIFN- $\tau$ の作用によって受胎率が向上する可能性が報告されている<sup>1)</sup>。また、最近の報

告により、IFN- $\tau$ はTBVの他、単為発生卵からも産生されていることが明らかとなり<sup>2)</sup>、TBVの作出より時間やコスト的にも簡便な手法として、その応用が期待されている。

そこで、我々は単為発生卵の効率的な作出方法について検討するとともに、単為発生卵が産生するIFN- $\tau$ が受胎率などに及ぼす影響を調査し、生産現場で実用可能な受胎率向上技術として確立を図ることを目標に試験を実施した。

### 材料および方法

#### 1 単為発生卵の作出方法

電気パルス、Caイオノフォア (Calcium Ionophore A23187, SIGMA-ALDRICH)、エタノール、6DMAP (6-Dimethylaminoprine, SIGMA-ALDRICH) の処理方法の違いによる単為発生卵発生率を比較した。

試験には食肉処理場由来のウシ卵巣の直径3

1) 現所属：茨城県畜産課

2) 現所属：茨城県北家畜保健衛生所

～5mmの小卵胞から吸引した卵子で、卵丘細胞が緊密に密着した卵胞卵子を卵子成熟共培養用培養液(IVMD101,機能ペプチド研究所)を用いてCO<sub>2</sub>インキュベーター(38.5℃, 5%CO<sub>2</sub>)内で20～24時間培養した。第1極体を放出し、かつ卵細胞質が均一な卵子を試験に供した。

調査項目として発生培養3日目の卵割率、発生培養7, 8日目の胚盤胞の発生率および形態的品質評価について調査した。形態的品質評価は家畜人工授精講習会テキストに準じた<sup>3)</sup>。またAランク<sup>3)</sup>以上の胚を2重蛍光染色<sup>4)</sup>し、細胞数(内細胞塊と栄養膜細胞)を調査した。

## 2 単為発生卵のIFN- $\tau$ 産生量

単為発生卵のIFN- $\tau$ 産生量を調査した。単為発生卵は6DMP処理により作出したものを使用し、単為発生卵の発生培養7日および8日目に得られた胚盤胞を各々24時間培養した上清を測定した。

また、発生培養7日目の受胎牛に単為発生卵を1個移植し、発生培養16日に子宮還流法(1%子牛血清加リンゲル液)により単為発生卵を回収し、還流液中のIFN- $\tau$ 濃度を測定した。

## 3 凍結保存が単為発生卵の生存性に与える影響

6DMP処理により作られた単為発生卵を10%エチレングリコール(和光純薬工業(株))、または10%エチレングリコール+0.1Mトレハロース(SIGMA-ALDRICH)の耐凍剤を用いて凍結保存したものを試験区とし、対照区として凍結された体外受精卵を用いた。

解凍後の各凍結方法による24, 48時間後の生存率、および72時間目の胚盤胞脱出率を調査した。

## 4 単為発生卵の黄体機能増強効果

試験区では単為発生卵を1個または2個移植し、対照区には未受精卵1個を移植し発情回帰までの日数を比較した。

## 5 単為発生卵共移植による移植試験

受精卵移植と同時に非黄体側に単為発生卵(2もしくは3個)を共移植した区、受精卵移植と共に黄体側子宮角に単為発生卵(1もしくは2個)を共移植した区の2区を試験区とした。受精卵のみを移植した区を対照とし、各試験区の受胎率の比較を行った。

## 6 人工授精後の単為発生卵移植試験

人工授精において単為発生卵が受胎率に影響を与えるか検討した。人工授精後5～7日目に単

為発生卵3個を非黄体側子宮角に追い移植し、人工授精のみの受胎率と比較した。

## 結果および考察

### 1 単為発生卵の作出

各処理における卵割率および胚盤胞発生率を表1に示した。4方法を比較したところ、分割率および胚盤胞発生率共に6DMPによる処理が最も高く、次いでCaイオノフォア、電気パルス+Caイオノフォア、エタノールによる処理の順に高かった。

表 1. 卵割率および胚盤胞発生率に及ぼす活性化処理の効果

	Ca	パルス+Ca	エタノール	6DMP
卵割率 %	63.6	60.5	28.3	87.2
胚盤胞発生率 %	21.8	18.4	10.9	30.4

作製された単為発生卵の細胞数の比較では、栄養膜細胞は6DMPとCaイオノフォアがほぼ同じで電気パルスで多い傾向が見られた(表2)。また、内細胞塊については3方法間に差は認められなかった。

表 2. 単為発生卵の細胞数に及ぼす活性化処理の効果

処理方法	Ca	パルス+Ca	6DMP
内細胞塊	21.8±9.3	20.5±7.8	20.6±9.1
栄養膜細胞	51.5±20.4	58±27.2	51.1±25

以上のことから、今後の体外受精胚との共移植試験で利用する単為発生胚は6DMPによる方法で作成すると効率がよいと考えられる。

### 2 単為発生卵のIFN- $\tau$ 産生量

単為発生卵のIFN- $\tau$ 産生量を表3に示した。未受精卵と単為発生卵との間に培養上清中IFN- $\tau$ 産生量に差は見られなかった。単為発生卵から作出した栄養膜小胞(以下、TBV)の培養上清および単為発生卵を移植した還流液で比較的高い数値を示したことから、胚が脱出し伸長するにつれてIFN- $\tau$ の産生量も増加する可能性があることが示唆された。そのため、受胎率の向上が期待される十分なIFN- $\tau$ 産生量を得るには単為発生卵がウシの子宮内で胚が透明帯から脱出し伸長する必要があると考えられる。

表 3. 単為発生卵のインターフェロン $\tau$ 産生量

処 理	分析溶液	濃度 (ng/mL)	分布
体外受精卵 <sup>1)</sup>	培養上清	0.422	—
単為発生卵 <sup>2)</sup>	培養上清	0.554	—
単為発生卵TBV <sup>3)</sup>	培養上清	10.4	8.7~11.7
単為発生卵移植 <sup>4)</sup>	子宮灌流液	31.3	18.4~56.3
受精卵TBV <sup>5)</sup>	培養上清	56.7	—

<sup>1)</sup>体外受精卵の24時間培養上清

<sup>2)</sup>単為発生卵の24時間培養上清

<sup>3)</sup>単為発生卵から作出したTBV(栄養膜小胞)の24時間培養上清

<sup>4)</sup>単為発生卵1個を子宮内へ移植して9日後の灌流液

<sup>5)</sup>H16~19試験参考データ(1mm以下のTBV)

また、単為発生卵から作出されたTBVの培養上清よりも、受精卵から作出されたTBVの培養上清の方が比較的高い値のIFN- $\tau$ 産生量が示された。

このことから、単為発生卵は受精卵と比べ、胚の伸長が少ない、もしくは伸長しにくい可能性が考えられる。そのため受精卵と同等量のIFN- $\tau$ を産生するには単数移植では不十分であり、複数個移植する必要があると推察される。

### 3 凍結保存が単為発生卵の生存性に与える影響

単為発生卵の凍結保存の影響を比較したところ、10%エチレングリコールと10%エチレングリコール+0.1Mトレハロースとの凍結保存による生存率に差は見られなかった。しかし、対照区とした体外受精(IVF)卵と比べ、24時間後において生存率が低く(P<0.05)、48時間後においても低い傾向が見られた(表4)。胚盤胞脱出率では各凍結方法間に有意な差は認められなかった。24時間後、48時間後の生存率は対照区と比べて低いものの、胚盤胞脱出率では差が認められなかった。表3の結果で示すように、単為発生卵が成長し、胚が脱出して伸長するに伴ってIFN- $\tau$ の産生量も増加していくと考えると、単為発生卵の凍結利用は十分に可能であると考えられる。

表 4. 単為発生卵の凍結保存の影響

凍結方法	供試卵数	24h生存率(%)	48h生存率(%)	72h脱出率(%)	備考
1.8Mエチレングリコール(対照)	24	79.1 <sup>a</sup>	62.5	20.8	IVF卵
1.8Mエチレングリコール	182	45.6 <sup>b</sup>	40.7	18.7	
1.8Mエチレングリコール+トレハロース	92	41.3 <sup>b</sup>	41.3	22.8	

a, b: P<0.05

### 4 単為発生卵の黄体機能増強効果

単為発生卵移植による発情回帰延長効果を表5に示した<sup>5)</sup>。

表 5. 単為発生卵移植による発情回帰延長効果

移植胚	移植頭数	発情回帰延長頭数	発情回帰日数
未受精卵(対照区)	8	0	21.6±1.6 <sup>a</sup>
単為発生卵1個	8	4	26.0±8.5
単為発生卵2個	4	2	41.0±23.2 <sup>b</sup>

a, b: P<0.05

未受精卵を移植した対照区と比較すると、単為発生卵1個移植した場合には発情回帰日数に有意な延長効果は見られなかったが、単為発生卵2個移植した場合には発情回帰日数が有意に延びた(P<0.05)。これらのことから、単為発生卵を移植することで母体に対して妊娠認識効果があることが示唆された。受精卵と共移植することで受胎率向上効果が認められているTBVにおいても、TBVを移植することで発情回帰が遅延することが知られており<sup>6)</sup>、単為発生卵を共移植することによる受胎率の向上が期待される。

### 5 単為発生卵共移植による移植試験

単為発生卵共移植による移植試験の結果を表6に示した<sup>7)</sup>。

表 6. 単為発生卵(PA)の共移植による受胎率

処 理	移植卵	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
対 照	受精卵 <sup>*</sup> のみ	32	15	46.9
黄体側子宮角移植	受精卵+PA1個	11	4	36.4
	受精卵+PA2個	5	2	40.0
両側子宮角移植	受精卵+PA2個	21	8	38.1
	受精卵+PA3個	2	1	50.0

<sup>\*</sup>卵はすべてエチレングリコール(EG)によるダイレクト緩慢凍結

今回の実験では受精卵との共移植による受胎率の向上は認められなかった。また、黄体側子宮角移植と両側子宮角移植に差は見られなかった。しかし、例数は少ないものの非黄体側子宮角移植において、単為発生卵を3個移植することにより受胎率が高くなる傾向が認められた。

受胎率の向上が認められなかった原因として、単為発生卵は通常の受精卵よりIFN- $\tau$ 産生量が少ないため、IFN- $\tau$ 産生量が不足していた可能性や、ウシの子宮内に移植された単為発生卵が十分に成長せずに死滅し、受胎率に影響を

与える量のIFN- $\tau$ が産生されなかった可能性、移植したウシの子宮内に疾患があり、受精卵が正常に成長しても着床することが出来なかった可能性が考えられる。今後、単為発生卵の移植では、個数を3個以上に増やすとともに、受胎牛の選定を十分に行い、検討を続ける必要があると考える。

6 人工授精後の単為発生卵移植試験

単為発生卵を非黄体側に追い移植することにより受胎率の有意な向上は見られなかった(表7)。

例数は少ないものの、試験区、対照区共に平均的な受胎率であった。このことから、少なくとも単為発生卵を追い移植することで受胎率に悪影響は及ぼさないと考えられる。また、受胎しなかった2頭はリピートブリーダーであった。移植するウシの子宮内もしくは卵管に問題があった可能性も考えられる。この実験は例数が少なく、受胎率も平均的な値を示しているため効果の有無は明らかとならなかった。今後は移植するウシの選定を行い、単為発生卵の移植個数を増やして検討を続ける必要があると考える。

表 7. 人工授精後の単為発生卵(PA)の追い移植による受胎率

処 理	移植卵	授精・移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
対 照	授精のみ	6	3	50.0
非黄体側子宮角 追い移植	授精後 PA3個	5	3	60.0

※内2頭はリピートブリーダー(4.5回目の受精)

- 3) 家畜人工授精講習テキスト(家畜受精卵移植編). p287. 2000.
- 4) 牛における核移植胚作出と胚の品質評価のためのマニュアル. 農研機構畜産草地研究所. p28. 2011.
- 5) 齋藤公治・森 将臣・住尾善彦・山口大輔・億 正樹・笹木教隆・高橋ひとみ・橋谷田豊・高橋昌志・下司雅也. ウシ単為発生胚の黄体退行抑制作用と子宮内における発生. 日本胚移植学雑誌. 31(1):59. 2009.
- 6) 渡辺晃行・宮地利江・藤井陽一・谷口雅律・浦田博文・高橋ひとみ・橋谷田豊. 受精卵向上を目的とした栄養膜小胞の利用. 東日本家畜受精卵移植技術研究会大会報. 20:16-18. 2004.
- 7) 笹木教隆・齋藤公治・山口大輔・億 正樹・安川幸子・高橋ひとみ・橋谷田豊・下司雅也. 単為発生胚と共移植が凍結-融解後のウシ体内受精胚の受胎成績に及ぼす影響. 日本胚移植学雑誌. 37(1):1-8. 2012.

参考文献

- 1) 橋谷田豊・谷口雅律・藤井陽一・宮地利江・渡辺晃行・小財千明・高橋ひとみ・岡田真人・菅原 徹・藤井満貴・横田昌己・浦田博文・高橋昌志・今井 敬. 凍結-融解したウシ栄養膜小胞の子宮内投与が発情周期および移植胚の受胎率に及ぼす影響. 日本胚移植学雑誌. 29(3):114-124. 2007.
- 2) Kubisch HM, Rasmussen TA, Johnson KM. Interferon- $\tau$  in Bovine Blastocysts Following Parthenogenetic Activation of Oocytes: Pattern of Secretion and Polymorphism in Expressed mRNA Sequences. Mol Reprod Dev. Jan;64(1):79-85. 2003.