

妊娠認識物質を利用した受胎率向上技術の確立（第1報）

渡辺晃行，山口大輔，足立憲隆

Examination of use of pregnancy related substance on improvement for conception rate in cattle.
(First report)

Akiyuki Watanabe, Daisuke Yamaguchi, Noritaka Adachi

要 約

胚移植の受胎率の向上は常に重要な課題とされている。しかし全国的にその受胎率は50%を横這いで推移している。そのため受胎率の向上を目的とした試験研究が行なわれており、栄養膜細胞から産生されるインターフェロン τ などの妊娠認識物質の利用による移植胚の機能補助や受胎牛側からの改善としてホルモン剤投与による積極的な受胎率向上が図られている。本試験ではこれらの知見を活用し、発情後5日目でhCGを投与し7日目に栄養膜小胞と胚の共移植を行なう試験区と発情後7日目に胚のみの移植を行なう対照区を設け、受胎率の向上およびホルモン濃度に及ぼす影響について比較検討を行なった。結果は試験区が対照区に比べ受胎率が高い傾向があり、黄体ランク別の受胎率では、全てのランクにおいて試験区の方が対照区に比べ高い傾向があった。プロゲステロン濃度の動態については個体差があるものの試験区、対照区ともに受胎牛、不受胎牛にかかわらず同様の動態を示した。IFN- τ の測定ではTVs培養液中にIFN- τ を確認した。また、TVsの大きさに比例してIFN- τ の産出量が増加した。

キーワード：栄養膜小胞，hCG，受胎率

緒 言

近年、わが国においても栄養膜小胞（以下TVs）から産生されるインターフェロン τ （以下IFN- τ ）による妊娠認識因子の補強を目的としたTVsと胚の共移植¹⁾や受胎牛に対するヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）または性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）の投与による黄体期の主席卵胞の機能抑制と黄体機能の亢進といった積極的な受胎率向上²⁾の施策が図られてきている。しかし、これらの技術が単一で改善されても他の要因が不十分であれば胚移植成功の十分条件とはなり得ず、また試験研究においてもそれぞれの試験結果およびデータはあるもののそれらを併せた試験研究は現在見当たらない。

本研究では胚側と受胎牛側双方からの受胎率向上を目的として、栄養膜小胞の共移植を行った受胎牛に対するhCG投与が受胎成績に及ぼす影響および、TVsから産生されているIFN- τ の量について検討した。

材料および方法

TVsの作出

体外受精胚を発情からday7に移植、または過剰排卵処理を行い、day14~17に伸張期胚盤胞を子宮内還流により回収した。回収した伸張期胚盤胞の栄養膜を1.0~1.5mmに細切し、100 μ M β メルカプトエタノール加20%TCM199（GIBCO）を用いて38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、95%空気の気相条件で24時間培養後、小胞を形成したものをTVsとした。TVs3個を胚と同じ0.25mlスロー内に吸引し、エチレングリコールダイレクト法により凍結保存し共移植に使用した。

共移植試験

試験区は移植牛の発情後5日目にhCG1500IU投与し、7日目に作出したTVsと胚を共移植した。ダイレクト凍結法による胚のみの移植を対照区とする。移植の際には移植技術者が黄体ランクをA、B、Cでランク分けした。

受胎牛のプロジェステロン濃度の測定

試験区 (3 頭) および対照区 (4 頭) について、発情後 1 日おきに次期発情または妊娠が確認されるまでの間、採血を行ないプロジェステロン濃度測定のための材料とした。採血にはヘパリン採血管を用いた。採血後直ちに氷冷し、3000rpm, 15 分間冷却遠心し血漿を分離した。1.5ml のチューブに血漿を入れ-20℃から-30 で凍結保存した。

IFN- τ の測定

TVs を作出するために用いた培養液を IFN- τ 測定のための材料とした。4 穴シャーレの一つに 100 μ M β メルカプトエタノール加 20% TCM199 を 700 μ l, 細切した栄養膜細胞 3 個を 24 時間培養し、栄養膜細胞を取り出した後、培養液中の浮遊物を遠心により沈殿させ上清 500 μ l を取り出し-40℃で冷凍した。プロジェステロン濃度および IFN- τ の測定は独立行政法人農業研究機構畜産草地研究所受胎機構研究室の協力によりラジオイムノアッセイ法により行なった。

結果および考察

hCG 投与および TVs 共移植による試験区が胚のみ移植の対照区に比べ受胎率が高い傾向があった (表 1)。黄体ランク別の受胎率では全てのランクにおいて試験区の方が対照区に比べ高い傾向があった (表 2)。黄体ランクが低く移植を躊躇する受胎牛でも一定の受胎率が得られたことから、

hCG 投与および TVs 共移植による受胎率向上効果が示唆された。

プロジェステロン濃度の動態を図 1 に示した。個体差はあるものの試験区、対照区ともに受胎牛および不受胎牛でそれぞれ同様の動態を示した。これはプロジェステロン濃度を調査した対象牛の黄体がすべて A ランクであったために hCG 投与や TVs の影響が少なかったと考えられた。試験区、対照区とも、不受胎牛は発情後 21 日目前後で発情徴候が観察されたことから、hCG 投与や TVs の共移植は発情遅延など、発情周期に悪影響を及ぼさないものと思われた。

IFN- τ の測定では TVs 培養液中に IFN- τ を確認した。また、TVs の大きさに比例して IFN- τ の産出量が増加した (図 2)。これにより TVs の共移植による妊娠認識物質の補強が示唆された。

今後は hCG 投与時期を発情後 7 日目の胚移植と同時にしない、受胎率とホルモン動態について検討を行なう。また、発情後 10 日目から 12 日目において TVs との共移植を行ない、移植時期の延長について検討を行なう。

引用文献

- 1) 渡辺ら (2004). 受卵牛の受胎率向上に関する研究. 茨城畜セ研報, 37 : 5-9
- 2) 西貝ら (2001). 牛凍結胚移植における受胎率の向上. JRD, 47:j27-j37

表 1 共移植試験成績

	移植頭数	受胎頭数	受胎率
試験区	62	33	53.2%
対照区	69	30	43.5%

表 2 黄体ランク別受胎成績

ランク	試験区			対照区		
	移植頭数	受胎頭数	受胎率	移植頭数	受胎頭数	受胎率
A	23	14	60.9	32	17	53.1
B	24	12	50.0	27	11	40.7
C	13	6	46.1	6	2	33.3

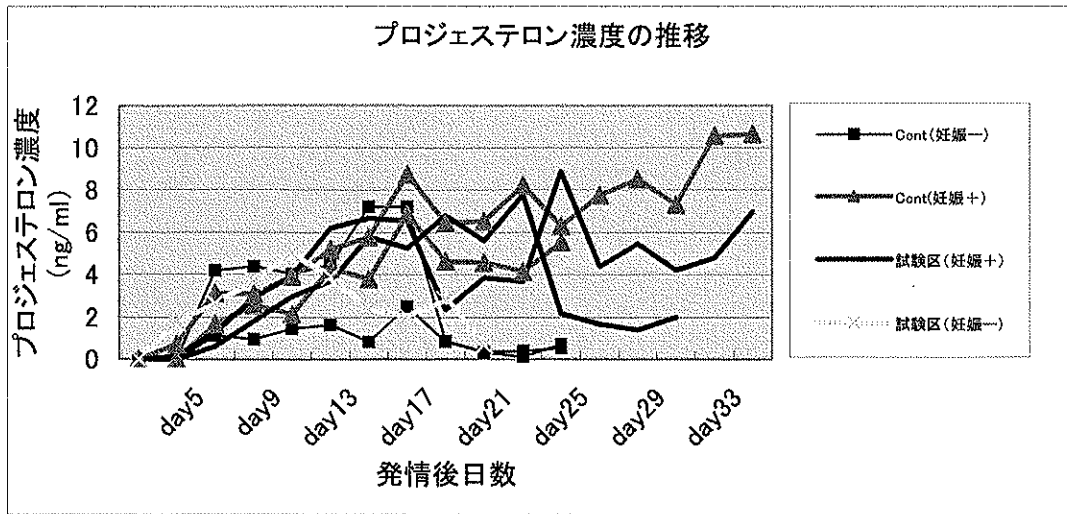


図1 試験区および対照区の受胎牛および不受胎牛のプロジェステロン濃度の動態

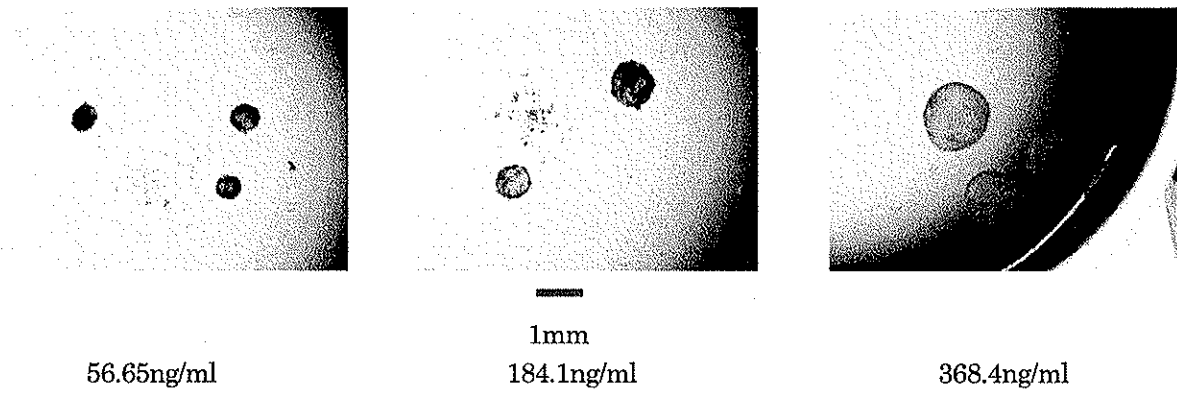


図2 TVsの大きさによるIFN- τ の生産量の違い