

妊娠認識物質を利用した受胎率向上技術の確立

山口大輔，赤上正貴，足立憲隆

Examination of use of pregnancy related substance on improvement for conception rate in cattle

Daisuke YAMAGUCHI, Masataka AKAGAMI, 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が、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、受胎率向上を目的とした様々な試験研究が行われており、その一つとして、栄養膜細胞(TVs)から産生されるインターフェロンタウ(IFN- 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、受胚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、TVsと胚の共移植に対して発情後5日目(day5)あるいは7日目(day7)にhCGを投与することによる受胎率および黄体機能に及ぼす影響について検討した。その結果、TVsからIFN- τ は産生されていることが確認され、その産生量はTVsの大きさに比例していることがわかった。受胎率は、共移植に対してday5にhCGを投与することで、day7のhCG投与および共移植と比較して有意な差はないものの高い傾向を示した。プロジェステロン濃度の動態については、どの調査牛においても発情回帰が延長し、プロジェステロン濃度の消長も遅れる傾向であった。また黄体ランクが低い場合でも、共移植にday5のhCG投与を組み合わせることで、受胎率が向上する傾向にあった。

以上のことから、TVsと胚の共移植に対するday5のhCG投与は、受胚牛の黄体機能を増強させ、受胎率を向上させる可能性があることが示された。

キーワード：栄養膜小胞，hCG，受胎率

緒 言

農林水産省による牛胚受胎率調査では、移植頭数は年々増加傾向にあるものの、受胎率は新鮮1胚移植で50～52%，凍結1胚移植では45～46%を推移しており¹⁾、さらなる受胎率向上のためには、胚移植技術や凍結保存技術だけではなく受胚牛側からのアプローチが必要である。

近年、わが国においても伸長期胚から作出される栄養膜小胞(Trophoblastic Vesicles:以下、TVs)と胚を同時に移植し(以下、共移植)、TVsから産生される妊娠認識物質であるインターフェロンタウ(以下、IFN- τ)によって母体-胚間の妊娠認識を補強し、受胎率を向上させる試みが報告されている^{2), 3), 4), 5), 6)}。また、胚移植において受胎率向上を目的として、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(Human Chorionic Gonadotropin:以下、hCG)を移植前に投与することによる黄体機能の補強といった積極的な方法も報告されている^{7), 8), 9)}。し

かし、共移植とhCGを組み合わせて受胎率や黄体機能への影響を調査した報告は少ない^{10), 12)}。

そこで本研究では、共移植に対するhCG投与が受胎率およびプロジェステロン濃度に及ぼす影響について調査した。

材料および方法

1 TVsの大きさによるIFN- τ 産生量の違い

TVsからのIFN- τ 産生を確認し、またその大きさによる産生量の違いを調査するため、TVsを作出した際に生じた培養上清をサンプルとしてIFN- τ 産生量を測定した。

1) TVsの作出

(1) 体内由来伸長期胚の回収

過剰排卵処理は、供試牛に卵胞刺激ホルモン(アントリンR10、川崎三鷹製薬)を1日2回、3日間で合計24AU(5,5,4,4,3,3)を筋肉内に投与した。また、3日目の朝に

20mgおよび夕方に15mgのジノプロスト(プロナルゴンf、ファルマシア)を筋肉内投与し、発情誘起後に人工授精を行った。伸長期胚は、人工授精日を0日として14日目から17日目に、直径約1cm×0.5cmの灌流孔を開けて加工したバルーンカテーテルを用いて子宮灌流を行い、回収した。

(2) 伸長期胚の切断および培養

切断可能な長さまで伸長しており、破れやちぎれがなく、かつ胚盤部分が明瞭な伸长期胚を、20%CS加PBSで洗浄した。同液内で外科手術用メスを用いて、胚盤の両端部を周辺細胞とともに挫滅するように切除し、残った栄養膜を1.0mmに細切した。細切した栄養膜は、100μM β-メルカプトエタノール・20%FCS加TCM199(GIBCO)を用いて、38.5°C・5%CO₂・95%airの気相条件で24時間培養後、小胞を形成したものを作成した。

(3) TVs培養上清のサンプリング

4穴シャーレ(NUNC)の1ウェルに100μM β-メルカプトエタノール加20%TCM199を700μl加え、その中に1mm以下、1mmおよび1mm以上の3区に分けたTVs3個を各ウェルに入れて38.5°C・5%CO₂・95%airの気相条件で24時間培養した。培養後にTVsを取り出して培養上清のみをスピンドラウンし、上清500μlを採取してIFN-τ測定まで-40°Cで凍結保存冷凍した。IFN-τの測定は独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 高度繁殖技術研究チームの協力により、ラジオイムノアッセイ法で測定した。

2 共移植に対するhCG投与の受胎率への影響

共移植に対するhCG投与の投与時期の検討および受胎率への影響を調査するため、以下のように試験区を設定し、移植試験を行った。

1) 試験区の設定

試験区1(day5-hCG+共移植)：発情後5日目(以下、day5)の受胚牛にhCG1500IU(ペローゲン、三共エル薬品)投与および共移植を行った。

試験区2(day7-hCG+共移植)：発情後7日目(以下、day7)の受胚牛にhCG1500IU投与および共移植を行った。

対照区(共移植)：day7の受胚牛に共移植を行った。

2) TVsと体内由来胚の凍結・融解方法

あらかじめ回収したday7の体内由来胚および試験1と同様な方法で作出したTVs3個を、10%エチレングリコールを含む20%FCS加PBSにトレハロース0.1Mを添加した凍結保存液に入れ、受精卵移植用ストローに吸引封入し、緩慢凍結法により凍結保存した。融解は、凍結保存したストローを液体窒素から取り出して空気中に10秒間保持した後、35°C～37°Cの温水に30秒間浸漬し、移植試験に供試した。

3) 移植試験

受胚牛として、黒毛和種および交雑種の雌牛を用いた。各受胚牛は、day7における直腸検査によって機能的な黄体があるものを用いて、黄体側の子宮内に移植した。なお、妊娠鑑定は超音波診断装置を用いて移植後40日目に行った。

3 共移植に対するhCG投与のプロジェステロン濃度への影響

試験区1、2および対照区の受胚牛から各2頭を用いて、共移植に対するhCG投与のプロジェステロン濃度への影響を調査した。発情確認日をday0として、day3から1日おきに次期発情あるいは妊娠が確認されるまでヘパリン採血管を用いて採血を行い、プロジェステロン濃度測定のサンプルとした。採血後直ちに氷冷し、3000rpmで15分間冷却遠心し血漿を分離した。採取した血漿は1.5mlのチューブに入れ、測定に供試するまで-20°Cで凍結保存した。プロジェステロン濃度の測定は、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 高度繁殖技術研究チームの協力により、ラジオイムノアッセイ法で測定した。

4 共移植にhCG投与を組み合わせた場合の受胎率と黄体ランクの関係

day5にhCG1500IUを投与後に共移植した場合の受胎率と黄体ランクの関係を調査するため、黄体ランクをExcellent(充実した機能性黄体), Good(充実してはいないが機能性黄体は存在する), およびFair(機能性黄体がわずかに触知できる)にランク分けした。移植の際には、移植者が直腸検査により黄体を上記のようにラン

ク分けし、移植を行った。なお、day7の受胚牛にダイレクト凍結保存胚の移植を行った区を対照区とした。

結果

1 TVsの大きさがIFN- τ 産生量に与える影響

TVs培養液中にIFN- τ が産生されていることが確認された。また、TVsの大きさが1mm以下では56.7ng/ml、1mm程度では184.1ng/mlおよび1mm以上では368.4ng/mlとTVsの大きさに比例してIFN- τ の産生量が増加した(図1)。

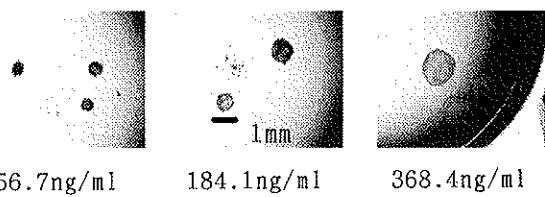


図1 TVsの大きさによるIFN- τ 産生量の違い

2 共移植に対するhCG投与の受胎率への影響

各試験区における受胎成績を調査した(表1)。その結果、試験区1、対照区および試験区2の順に高い受胎率を示した(49.6%、41.7%、38.6%)。

表1 共移植に対するhCG投与の受胎率への影響

	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
試験区1	133	66	49.6
試験区2	44	17	38.6
対照区	60	25	41.7

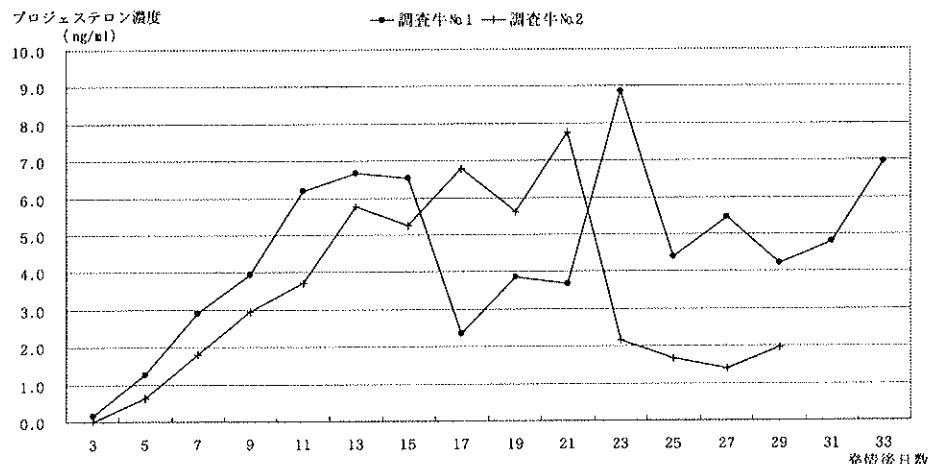


図2 試験区1(day5-hCG+共移植)におけるプロジェステロン濃度の推移

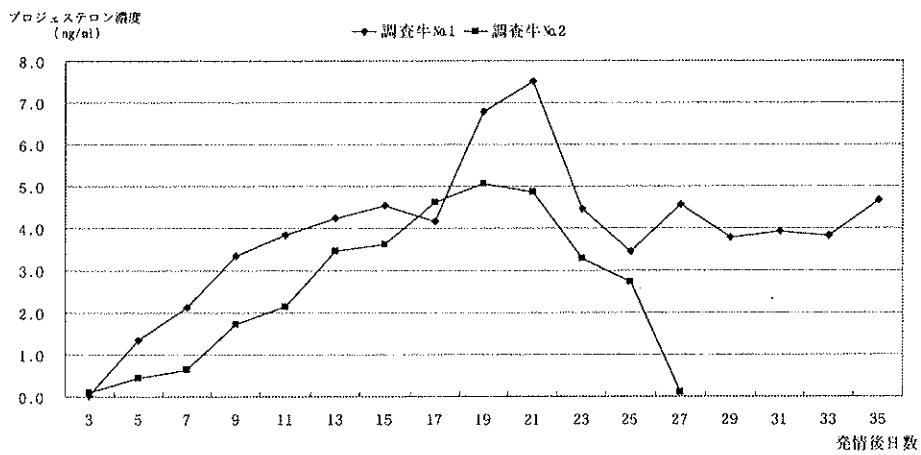


図3 試験区2(day7-hCG+共移植)におけるプロジェステロン濃度の推移

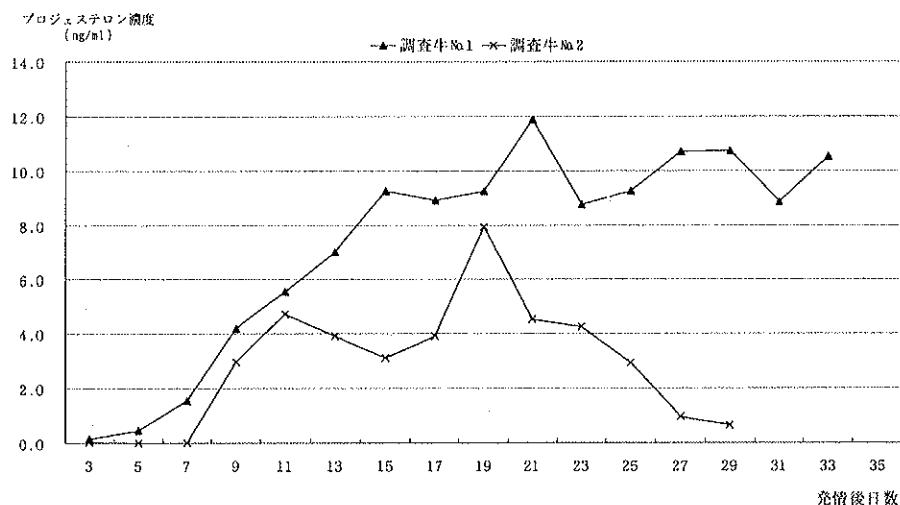


図4 対照区(共移植)におけるプロジェステロン濃度の推移

4 共移植にhCG投与を組み合わせた場合の受胎率と黄体ランクの関係

共移植にday5のhCG投与を組み合わせた場合の受胎率と黄体ランクの関係を表2に示した。ランクAでは試験区が対照区より高い傾向にあった(60.9% vs. 53.1%)。ランクBでも試験区が対照区より高い傾向にあった(50.0% vs. 40.7%)。またランクCにおいても試験区が対照区より高い傾向にあった(46.2% vs. 33.3%)。

表2 共移植にday5のhCG投与を組み合わせた場合の受胎率と黄体ランクの関係

	ランク	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
試験区	Excellent	23	14	60.9
	Good	24	12	50.0
	Fair	13	6	46.2
対照区	Excellent	32	17	53.1
	Good	27	11	40.7
	Fair	6	2	33.3

考 察

IFN- τ とは、胚の栄養膜細胞から分泌され、牛や羊などの反芻獸における母体の妊娠認識および黄体退行抑制に関する物質である¹⁵⁾。TVsからもIFN- τ が産生されており¹⁶⁾、共移植によって受胎率が向上することが多数報告されている^{2), 3), 4), 5), 6)}。しかし、いずれの報告においても試験で使用しているTVsの大きさは1mm程度であり、TVsの大きさによるIFN- τ 産生量の違いについて検討した報告は見当たらない。今回の結果から、TVsの大きさを1mm以下、1mmおよび1mm以上に区分した場合、TVsの大きさに比例してIFN- τ 産生量も増加することがわかった。従って、1mm以上のTVsを共移植に使用すれば、IFN- τ の黄体退行抑制効果をより期待できると考えられた。

胚のみの移植に対するhCGの影響として坂上ら⁸⁾は、day5, day6およびday7のhCG投与によって受胎率が向上したと報告している（day5: 60%, day6: 54.5%, day7: 70%，対照区: 41.9%）。また梅木ら¹⁰⁾も、同様の報告をしている（day5: 53.5%, 55.4%，対照区: 39.8%）。また共移植に対するhCGの影響についての報告は少ないものの、渡辺ら^{11), 12)}は、共移植に対してday5のhCG投与を組み合わせることで、受胎率向上効果が期待できると示唆している。今回の結果では、共移植に対してday5にhCGを投与した試験区1において、試験区2および対照区より有意な差はないものの高い傾向を示し、上述の報告と同様の結果が得られた。これらのことから、day5のhCG投与は共移植に対して受胎率向上効果を示すことが示唆された。

hCG投与あるいは共移植によるプロジェステロン濃度への影響についてHeymanら¹³⁾は、day14に生体から回収した胚栄養膜細胞を細切後、培養して得られたTVsを、day12の牛黄体側子宮に投与することにより、約60%の牛の発情周期が延長することを報告している。Chagasら¹⁴⁾は、hCG処理群で副黄体が形成された試験牛と形成されなかった試験牛では、前者の方がプロジェステロン濃度は有意に高かったと報告している。またNishigaiら⁷⁾も、day5にhCG1500単位を投与することによって黄体機能の増強およびP4濃度の上昇を確認している。本試験の結果では、いずれの調査牛も個体差はあるものの、発情回帰の延長が認められ、プロジェステロン濃度の消長が遅くなる傾向であった。これは、hCG投与による副黄体形成およびTVs

による黄体退行阻止効果の相乗効果によって黄体機能が増強されたことによるものと考えられた。

共移植にday5のhCG投与を組み合わせた場合の受胎率と黄体ランクの関係について平泉ら⁹⁾は、黄体ランクFairの牛に対してday5にhCG1500単位を投与することにより、受胎率が向上する可能性を示唆している。今回の結果においても、Excellent, GoodおよびFairのいずれのランクにおいても受胎率が高くなる傾向であった。これらのことから、共移植にday5のhCG投与を組み合わせることによって、黄体ランクがFairの場合でもTVsおよびhCGの相乗効果による受胎率向上が期待できると考えられた。

以上のことから、day5に1500IUのhCGを投与し、day7に1mm以上のTVsを用いて共移植を行うことによって、受胎率向上および黄体機能増強が可能であることが示された。また、通常の直腸検査により移植不適と判断されるような黄体ランクでも、共移植にhCG投与を組み合わせることで移植可能となり、受胎牛の増頭、ひいては受精卵産子の増頭につながると考えられた。

参考文献

- 農林水産省畜産部, 2007, 牛受精卵移植実施状況
- 渡辺ら, 2003, ウシ栄養膜小胞の効率的な作出における伸長期胚盤胞の回収時期の検討, 第18回東日本受精卵移植技術研究会大会講演要旨
- 後藤ら, 2004, ウシ栄養膜小胞の共移植が受胎成績に及ぼす影響, 第19回東日本受精卵移植技術研究会大会講演要旨
- 渡辺ら, 2004, 受胎率向上を目的とした栄養膜小胞の利用, 第19回東日本受精卵移植技術研究会大会シンポジウム講演要旨
- 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, 5-10
- 宮地ら, 2004, ウシ栄養膜小胞が発情周期に及ぼす影響および共移植による受胎率向上の検討, 第19回東日本受精卵移植技術研究会大会講演要旨
- Nishigai,M, 2003, The Development and Prevalence of the Transfer Technique for Frozen-Thawed Embryos of Japanese Black Beef Cattle in Tochigi Prefecture, J.Reprod.Develop., 49, 23-36

- 8) 坂上ら, 2005, 牛の受精卵移植におけるhCG投与が受胎率に与える影響, 神畜研研報, 90, 1-7
- 9) 平泉ら, 2005, ウシ胚移植における受胎率向上のためのhCG投与の効果, 第12日本胚移植研究会大会講演要旨
- 10) 梅木ら, 受胎率向上のための前後処置法の検討, 2004, 大分畜試研報, 33, 5-11
- 11) 渡辺ら, 2005, hCG投与および栄養膜小胞との共移植がウシ胚の受胎率に及ぼす影響, 第19回東日本受精卵移植技術研究会大会講演要旨
- 12) 渡辺ら, 妊娠認識物質を利用した受胎率向上技術の確立（第1報）, 2005, 茨城畜セ研報, 38, 63-66
- 13) Heyman,Y.et al, 1984, Maintenance of the corpus luteum after uterine transfer of trophoblastic vesicles to cyclic cows and ewes, J.Reprod.Fertil., 70, 533-540
- 14) Chagas,S.et al, 2005, Luteotrophic influence of early bovine embryos and the relationship between plasma progesterone concentrations and embryo survival, Theriogenology, 64, 49-60
- 15) Roberts,RM.et al, 1992, interferons as hormones of pregnancy, Endocr.Rev., 13, 432-452
- 16) Hashiyada Y.et al, 2005, Transition of the pregnancy rate of bisected bovine embryos after co-transfer with trophoblastic vesicles prepared from in vivo cultured in vitro fertilized embryos, J.Reprod.Develop., 51, 749-756