

妊娠認識物質を利用した受胎率向上技術の確立（第2報）

渡辺晃行¹，山口大輔，足立憲隆

Examination of use of pregnancy related substance on improvement for conception rate in cattle
(Second 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、栄養膜細胞から産生される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、TVsと胚の共移植に対して7日目にhCGを投与することによる受胎率向上およびプロゲステロン濃度に及ぼす影響について検討した。その結果、受胎率は7日目にTVsと胚の共移植を行った場合に対照区より高く、TVsと胚の共移植の有効性が示唆された。またプロゲステロン濃度の動態については、どの試験区においても発情回帰が遅延する不受胎牛が認められ、プロゲステロン濃度の消長も遅れる傾向であった。また受胎牛については発情が回帰することなく、プロゲステロン濃度は低下することなく維持されていた。以上のことから、TVsと胚の共移植に対する7日目のhCG投与は、受胎牛の黄体機能増強あるいは退行阻止について影響を及ぼしていることが示唆された。

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(Trophoblastic Vesicles：以下、TVs)から産生されるインターフェロントウ(以下、IFN- τ)などの妊娠認識物質の補強を目的としたTVsと胚の共移植¹⁾(以下、共移植)や、受胎牛に対してヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(Human Chorionic Gonadotropin：以下、hCG)を投与することによる黄体期における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), 3)}が検討されている。

前報⁴⁾では、移植胚側および受胎牛側の両方からの複合的な受胎率改善について検討するため、共移植に対する5日目のhCG投与の影響を調査し、受胎率が改善される可能性があることを報告した。しかしこの試験設定では、5日目にhCG投与、7日目に共移植と処置が2回におよぶことから、共移植におけるhCG投与の労力負担軽減という検

討課題が残った。

そこで本研究では、共移植に対するhCG投与を7日目とし、それが受胎率およびプロゲ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の作出

1) 体内由来TVsの作出

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。

1 現 茨城県農林水産部畜産課

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長期胚を、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1.0~1.5mmに細切した。細切した栄養膜は、100 μ M 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TVsとした。

3) TVsと体内由来胚の凍結・融解方法

あらかじめ回収した受精後7日目の体内由来胚と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、ダイレクト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室温に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。

2 移植試験

受胚牛として黒毛和種および交雑種の雌牛を使用し、以下のように試験区を設定し、受胎成績改善効果を調べた。

試験区1(hCG+共移植区)：発情後7日目の受胚牛にhCG1500IU(プペローゲン、三共エール薬品)を筋肉内投与するとともに、共移植を行った。

試験区2(共移植区)：発情後7日目の受胚牛に共移植を行った。

試験区3(hCG区)：発情後7日目の受胚牛にhCG1500IUを筋肉内投与するとともに、ダイレクト凍結保存胚の移植を行った。

対照区：発情後7日目の受胚牛にダイレクト凍結保存胚の移植を行った。

3 受胚牛のプロジェステロン濃度の測定

試験区1(4頭)、試験区2(2頭)、試験区3(3頭)を用いて、プロジェステロン濃度におよぼす影響を検討した。発情確認後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・生物系特定産業技術研究機構 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で測定した。

結果および考察

1 受胎成績改善効果

各試験区における受胎成績を比較調査した(表1)。その結果、共移植区、対照区、hCG区およびhCG+共移植区の順に高い受胎率を示した(50.0%、44.4%、42.9%、38.6%)。共移植における受胎率改善効果について渡辺らは¹⁾、共移植と胚のみの移植を比較した場合、受胎率は前者の方が高くなる傾向であったと報告している。共移植区については受胎率が対照区より高い傾向にあったことから、その有効性が示唆された。しかし、hCG+共移植区については受胎率を改善させる効果は認められなかった。7日目のhCG投与の影響について、共移植を組み合わせたケースは本報告以外には見当たらないが、平泉らは²⁾、移植当日のhCG投与は、黄体機能を増強させ、受胎率向上に有効であったとしている。

2 プロジェステロン濃度の動態

プロジェステロン濃度の動態を図1、2および3に示した。hCG+共移植区におけるプロジェステロン濃度の動態について(図1)、試験牛4頭はいずれも受胎せず、うち2頭は21日目に検出限界未満にまで低下した。それ以外の2頭については、1頭は27日目に検出限界未満にまで低下し、1頭はそれ以降も3.78~4.66ng/mlとプロジェステロン濃度が低下することはなかった。共移植区におけるプロジェステロン濃度の動態については(図2)、試験牛2頭はいずれも受胎せず、うち1頭は29日目に0.64ng/mlまで低下し、1頭はそれ以降も8.85~10.74ng/mlとプロジェステロン濃度が低下することはなかった。hCG区におけるプロジェステロン濃度の動態については(図3)、試験牛3頭中2頭が受胎した。受胎した2頭は、プロジェステロン濃度が低下することなく推移した。受胎しなかった1頭は29日目で検出限界未満にまで低下した。

hCG投与あるいは共移植による影響について

は、様々な研究が行われている。Heymanらは⁵⁾、発情周期14日目に生体から回収した胚栄養膜細胞を細切後、培養して得られた栄養膜小胞を、発情周期12日目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。またChagasらは⁶⁾、hCG処理群で補助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、前者の方がプロゲステロン濃度は有意に高かったと報告している。

本試験の結果においては、個体差は認められるものの、どの試験区においてもプロゲステロン濃度の消長が遅くなる傾向であった。受胎牛については発情が回帰せず、プロゲステロン濃度は低下することなく維持されていた。上述した報告および本試験の結果から、各試験区においてプロゲステロン濃度の消長が延長した試験牛について、共移植区ではTVsから分泌されるIFN- τ の黄体退行阻止効果によるものと考えられた。hCG+移植区では、hCG投与によって試験牛に補助黄体が形成されたことによるものと考えられた。そしてhCG+共移植区においては、その相互作用によるものと考えられた。

以上のことから、共移植に対する7日目のhCG投与は、受胎牛の黄体機能増強あるいは黄体退行阻止効果があることが示唆された。

参考文献

- 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, 37: 5-9
- 2) 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
- 3) 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回日本胚移植研究会大会講演要旨
- 4) 渡辺ら(2005). 妊娠認識物質を利用した受胎率向上技術の確立(第1報). 茨城畜セ研, 38: 63-66
- 5) 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
- 6) 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

表1 共移植試験成績

	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
hCG+共移植区	44	17	38.6
共移植区	26	13	50.0
hCG区	35	15	42.9
対照区	36	16	44.4

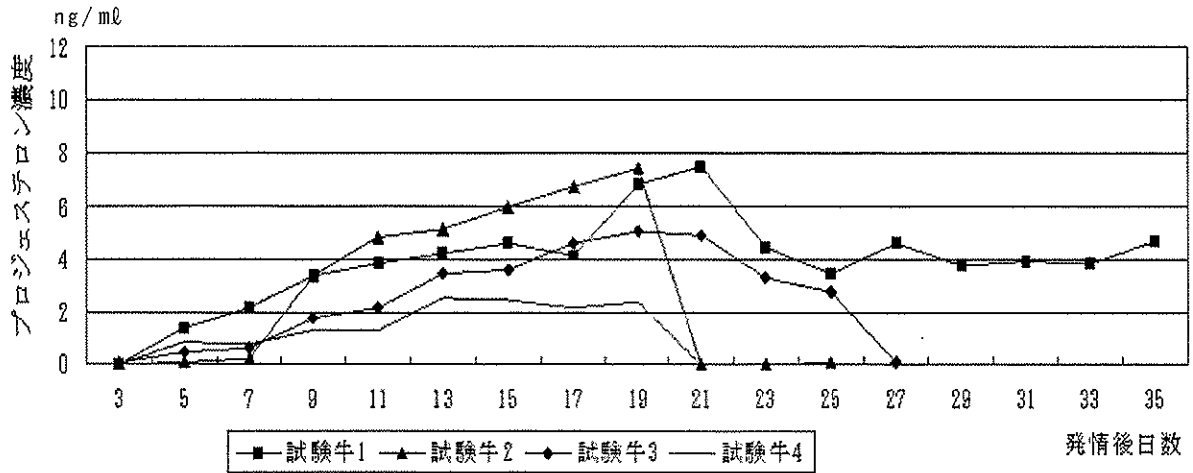


図1 hCG+共移植区におけるプロゲステロン濃度の推移

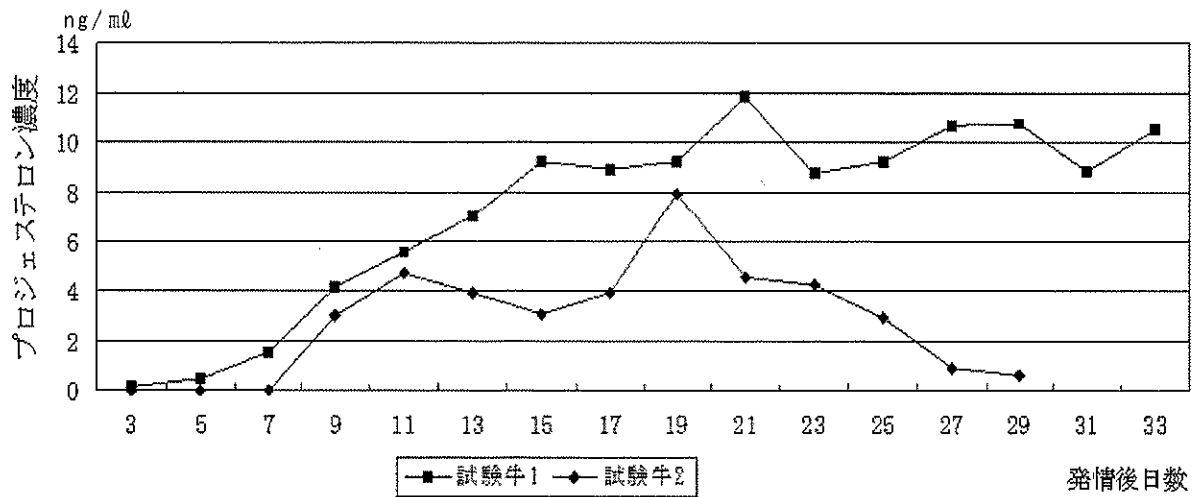


図2 共移植区におけるプロゲステロン濃度の推移

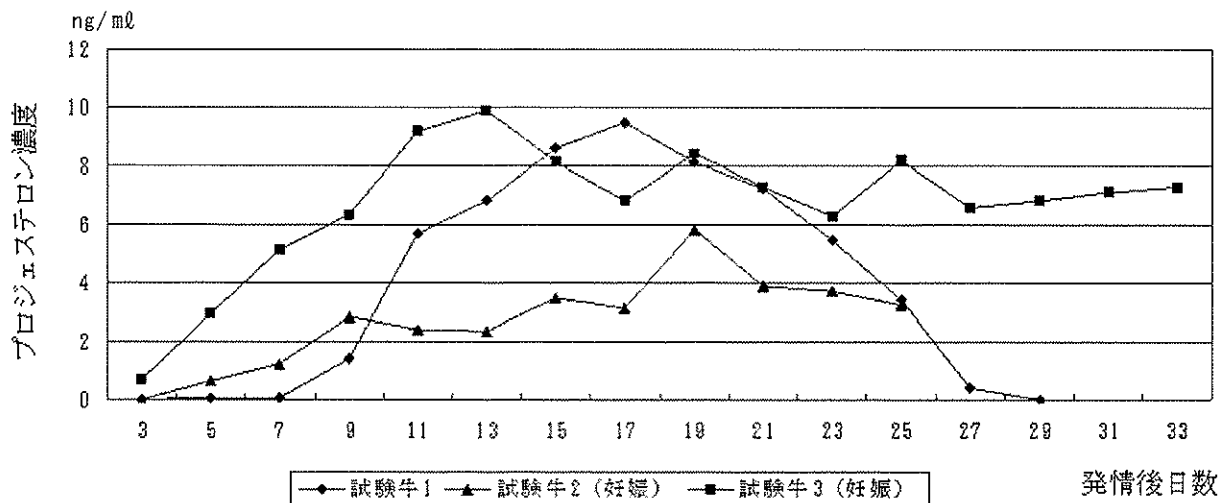


図3 hCG区におけるプロゲステロン濃度の推移