

単為発生卵の子宮内投与による発情周期の延長

Prolongation of Interestrus Intervals following Intra-uterine Transfer of Parthenogenetic Blastocysts in Japanese Brown Cows.

齋藤公治・森 将臣・住尾善彦

Koji SAITO, Masaomi MORI and Yoshihiko SUMIO

要 約

ウシ単為発生卵 (PA 卵) の1個または2個の子宮内投与が、発情周期および血漿中プロジェステロン濃度 (P4濃度) に与える影響を調査した。また、投与した PA 卵の子宮内における発生状況を観察した。PA 卵を2個投与したウシでは、投与しなかったウシに比べて発情周期が延長する傾向が認められ (46.3±25.2日 vs 21.0±2.2日, $p<0.1$)、P4濃度は発情周期と呼応した動きを示した。発情周期が延長したウシでは Day27 (初回発情日=Day0) 以降の子宮内観察によりエコーフリーな像が認められ、PA 卵を2個投与したウシでは胎子様構造物も観察された。このうち1頭では心拍を確認し、人工流産処置により胎子を含む受胎産物を回収した。以上の結果から、PA 卵を2個投与することで効率的に黄体退行を抑制できるが、胎子形成に至る可能性も高いことが示唆された。

キーワード：単為発生卵、子宮内投与、発情周期、血漿中プロジェステロン濃度、黄体退行抑制

I 緒言

ウシ凍結胚の受胎率は過去10年以上にわたり45%前後で推移しており、この向上が長年の課題となっている。受胎が成立するためには母体-胎子間における種々の妊娠シグナル交換が必要であり、反芻家畜においては胚の栄養膜細胞から分泌されるインターフェロン・タウ (IFN τ) が黄体退行を抑制し、妊娠を維持する鍵となる物質であることが知られている¹⁾。この機構を利用した受胎率向上の試みとして、伸長期胚から作出したウシ栄養膜小胞 (bTVs) を胚と同一のストロー内で凍結し、子宮内に共移植する取り組みがなされ、その有効性が確認されている²⁻⁴⁾。しかし、bTVs の作出には多くの時間と労力を要するという課題が残されており、より簡易に栄養膜細胞からの妊娠シグナルを補強する方法が必要と考えられた。そこで、実験室内で比較的簡易かつ安定的に作出可能であり、IFN τ の分泌も期待できる⁵⁾単為発生卵 (PA 卵) の利用に着目したが、受胎率向上を目的に PA 卵を用いた報告は少なく⁶⁾、黄体維持に有効な PA 卵の投与個数や、子宮内投与後の PA 卵の存続期間についての調査が必要と考えられた。

本研究では、PA 卵1個ないし2個の子宮内への単独投与後が黄体機能に与える影響について、発情周期延長の度合いと血漿中プロジェステロン濃度の測定を通じて調査し、あわせて子宮内における PA 卵のその後の発生状況を観察した。

II 材料及び方法

褐毛和種雌牛のべ12頭を、PA 卵を投与しない区 (対照区, n=4)、1個投与した区 (1個投与区, n=5) および2

個投与した区 (2個投与区, n=3) の3試験区に配置した。PA 卵の材料にはと場由来卵子を用いた。定法により卵胞から吸引した卵丘-卵子複合体を5%子牛血清加199培地で24時間成熟培養後、卵丘細胞を剥離し、第一極体を放出した細胞質が均一な卵子を単為発生処理に供した。単為発生刺激としてカルシウムイオノフォア A23187 (Sigma) と6-ジメチルアミノプリン (Sigma) の複合活性化処理を用い、処理日から7日目に拡張胚盤胞期に到達したものを投与試験に供試した。1個投与区および2個投与区では、Day7 (発情日=Day0) において機能的な黄体を有するウシの黄体側子宮角に、通常の胚移植と同様の方法により PA 卵を投与した。各区とも1日2回の発情行動観察を行い、次の明瞭な発情兆候の確認をもって発情周期を決定した。また、Day3から1日おきに採血し、放射免疫測定法により血漿中プロジェステロン濃度 (P4濃度) を測定した。さらに、Day27まで次回発情がみられない場合は、超音波画像診断装置 (SSD-210DX, アロカ) を用いて6日間隔で子宮内を観察した。

III 結果及び考察

各区の発情周期は、対照区21.0±2.2日、1個投与区25.2±6.3日、2個投与区46.3±25.2日となり、対照区に比べて2個投与区で延長する傾向 ($p<0.1$) がみられた (図1)。P4濃度は発情周期と呼応した動きを示し、対照区では Day21前後に全頭が基底値まで低下したのに対し、発情周期が延長した1個投与区の1頭と2個投与区の2頭では、長期間にわたり高値に維持された (図2-4)。これらの結果から、PA 卵が分泌する妊娠シグナルを母体側が認識して黄体の退行が抑制されたことが示唆され、黄体

機能維持の点では2個投与の方がより効果的であると考
えられた。

Day27以降の子宮内観察により、1個投与区の1頭およ
び2個投与区の2頭でエコーフリーな像が認められ(図5)、
2個投与区の2頭では胎子様構造物も観察された(図6)。
さらに、2個投与区の1頭においては Day27および Day33
に胎子の心拍が確認され、人工流産処置により Day43に
胎子を含む受胎産物を回収した(図7,8)。このことか
ら、PA 卵を2個投与した場合においては、より長期間に
わたり子宮内で PA 卵が生存し続ける可能性が示唆され
た。

以上の結果から、受胎率向上を目的として PA 卵と胚
を共移植するにあたっては、黄体機能の維持というメリ
ットだけでなく、PA 卵の長期生存がもたらすデメリッ
トについても十分に考慮する必要があるものと考えられ
た。このため、今後実施する共移植試験のなかでは、受
胎率の調査に加え、得られた産子の正常性についての調
査が必要である。

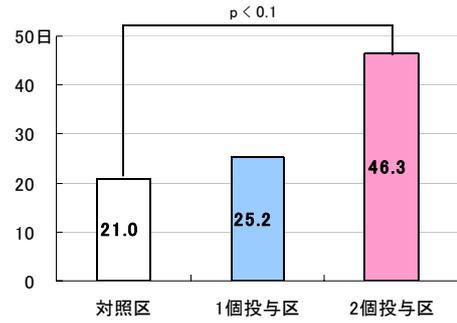


図1 各区の発情周期

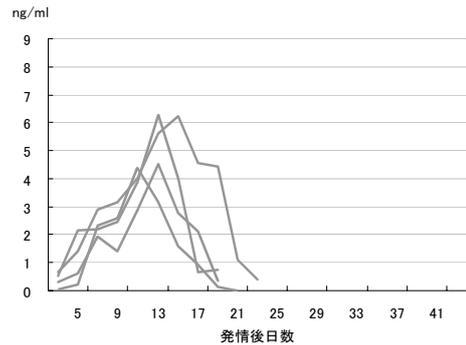


図2 血漿中プロジェステロン濃度の推移 (対照区)

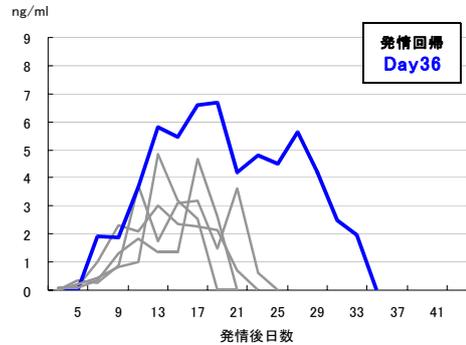


図3 血漿中プロジェステロン濃度の推移 (1個投与区)

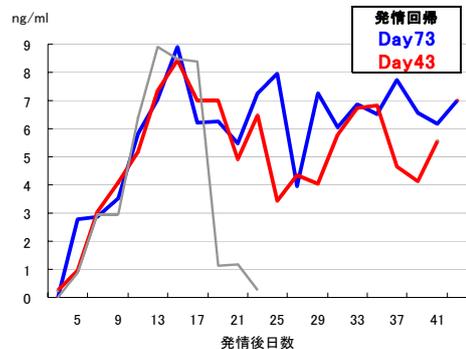


図4 血漿中プロジェステロン濃度の推移 (2個投与区)

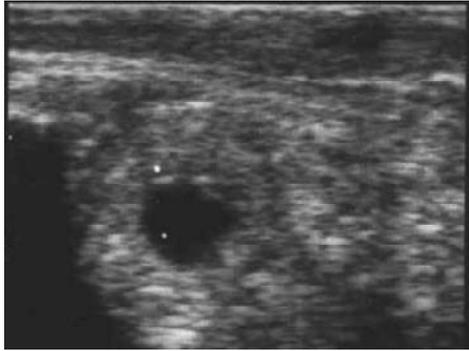


図5 子宮内のエコーフリー像 (2個投与区 Day27)



図6 胎子様構造物 (2個投与区 Day33)

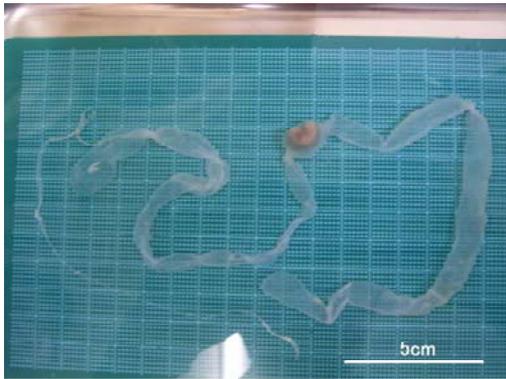


図7 PA 卵由来の受胎産物 (全体像)

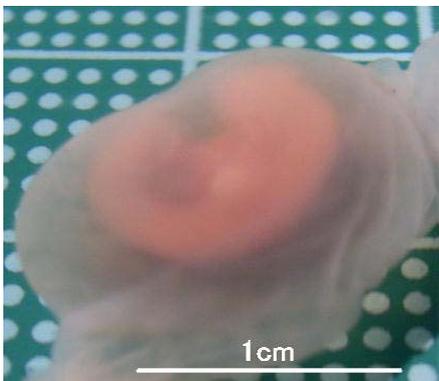


図8 PA 卵由来の受胎産物 (胎子拡大図)

IV 謝辞

試験遂行にあたって多大なるアドバイスをいただいた(独)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橋谷田豊氏、血漿中プロゲステロン濃度の測定にご協力いただいた同所、高橋ひとみ氏に深謝します。

V 引用文献

- 1) Imakawa ら, *Nature.* , 330:377-379, 1987.
- 2) 谷口雅律ら, 熊本県農業研究センター畜産研究所試験成績:126-127, 2002.
- 3) 谷口雅律ら, 熊本県農業研究センター畜産研究所試験成績:75-76, 2005.
- 4) 橋谷田豊ら, *日本胚移植学雑誌* 29:114-124, 2007.
- 5) Kuibisch ら, *Mol. Reprod. Dev.* , 64:79-85, 2003.
- 6) 小林ら, *日本胚移植学雑誌*, 27:52-58, 2005.

Summary

Prolongation of Interestrus Intervals following Intra-uterine Transfer of Parthenogenetic Blastocysts in Japanese Brown Cows.

Koji SAITO, Masaomi MORI and Yoshihiko SUMIO

Co-transfer of parthenogenetic blastocysts with embryos might be one of the techniques that possibly improve the pregnancy of embryos using signals involving interferon tau secreted from parthenogenetic blastocysts.

We investigated the effect of intra-uterine transfer of one or two parthenogenetic blastocysts on interestrus intervals in cows. Furthermore, survivability of parthenogenotes in uterus was monitored. Parthenogenetic blastocysts were prepared from in vitro matured and activated oocytes. Activation was carried out using calcimycin combined with 6-dimethylaminopurine treatment. One or two parthenogenotes were transferred into uterine horn ipsilateral to the functional corpus luteum by the cervical route in 8 Japanese Brown cows on day 7 (first estrous day = day 0). In two blastocysts transferred group, interestrus intervals showed a tendency to be prolonged than that in non-treated control group (46.3 +/- 25.2 vs 21.0 +/- 2.2 days, $P < 0.1$). Plasma progesterone concentrations reflected luteal lifespan and maintained high levels for a long duration in recipients that had prolonged interestrus intervals. In these cows, echo-free areas were imaged as fetus fluids in uterus by transrectal ultrasonography on day 27. Fetus-like structures were observed in two blastocysts transferred group (2 out of 3 recipients). Furthermore, in one of these structures, heart beat was confirmed on day 33, and morphologically normal conceptus was recovered on day 43 by induced abortion. These results suggest that parthenogenesis blastocysts could develop to fetus although these prevent luteolysis efficiently in the case of two blastocysts were transferred. Further study is required to clarify the influence of co-existing survived parthenogenotes to conceptus derived from embryos when co-transferred together into uterus as a technique to enhance the fertility of embryo transfer.