

# 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

宮地利江<sup>1</sup>・山崎俊雄・坂井郁雄

The examination of the conception percentage improvement and the influence which the Trophoblast vesicle exerts the time feeling period .

Rie MIYACHI, Toshio YAMAZAKI and Ikuo SAKAI

<sup>1</sup> 現 福井県家畜保健衛生所

## 要 約

ウシ栄養膜小胞(TB)を子宮内に注入し、黄体の長径を測定し退行状況を観察、同時に血中プロゲステロン(P)濃度を測定し、TB注入による影響を検討した。さらに、TBと胚を共に移植し、受胎率を検討した。子宮内注入試験は同一の供試牛を用い、PBSを注入する対照区、凍結TBを3個注入する試験区を連続して実施した。黄体長径の測定は移植(7日目)から10,12,14,16,19,22,25,28日目、血中P濃度の測定は、10,11,12,13,14,15,16,19,22,25,28日に行った。移植試験は、試験区としてダイレクト法で凍結したTB3個と胚1個の共移植、対照区としてダイレクト法で凍結した胚1個移植を行った。

その結果、TB注入した供試牛は対照区と比較して発情回帰日数が延長する個体がみられたが、成績は一定しなかった。血中P濃度は、対照区で通常の発情周期に応じた推移を示したが、試験区で低下が遅い傾向にあった。また、黄体長径に差はみられず、血中P濃度と黄体長径に相関はみられなかった。移植成績は、1.8M EG加20%CS加PBSを保存溶媒とした試験区で受胎率が68.6%、対照区で50.0%であった。また、1.8M EG加20%CS加PBS+0.1M Treを保存溶媒とした試験区では受胎率が54.8%、対照区で39.5%であった。

## I 緒 言

近年、胚盤胞の栄養膜が産出するインターフェロン $\tau$ (IF $\tau$ )が胚と母体間の妊娠認識に重要な役割を果たすことが示唆されており、子宮内IF $\tau$ 注入試験では黄体退行の延長、黄体機能の延長などが報告されている。1)

また、伸張した胚盤胞の栄養膜を細切し、培養後に形成される栄養膜小胞(Trophoblastic Vesicle 以下TB)からもIF $\tau$ の分泌があることが確認されており、TBを胚と共移植することで受胎率が向上するとの報告もある。2)3)

そこで、TBによる影響を検討することを目的として、試験1としてTBを子宮内注入し、

供試牛の黄体動向および血中プロゲステロン濃度(以下P濃度)を測定した。また、試験2としてTBと胚を共移植しその受胎率を検討した。この試験は熊本県、山口県、茨城県、奈良県、独立行政法人(独)家畜改良センター奥羽牧場、(独)畜産草地研究所との共同試験として実施した。

## II 試験方法

### 移植用胚の作出

供試牛として各県で繋養されている健康な黒毛和種、褐毛和種を用いた。過剰排卵処置は各

県の手法に準じ、卵胞刺激ホルモン (FSH) 14 ~ 24AU の漸減投与で行った。胚回収は発情後 7 日目に、1 % 子牛血清 (CS) 加乳酸リンゲルを回収液として、富士平工業 (株) 製多孔式バルーンカテーテルを用いて実施した。

伸張期胚盤胞の作出

供試牛として各県で繋養されている健康な黒毛和種、褐毛和種、ホルスタインと黒毛の交雑種を用い、過剰排卵処置は移植用胚の作出と同様に実施した。回収は発情日から 14 ~ 17 日目に、1 % 子牛血清 (CS) 加乳酸リンゲルを回収液として、先端の穴を大きく加工したバルーンカテーテルで実施した。回収した伸張期胚盤胞は長さが 3mm 以上で栄養膜に破損がないものを選別し 20 % CS 加 PBS 内にて外科用メスで 0.5 ~ 1.5mm 幅に切断分離した。切断分離後の断片は 100  $\mu$  M  $\beta$ メルカプトエタノール (ME) 加 20 % 子牛血清加 TCM199 培地内で 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Air の気相条件下で 24 ~ 48 時間培養して小胞を形成したものを TB として用いた。

試験 1 : TB 子宮内注入試験は対照区と試験区を連続して同一の供試牛を用いて実施した。

供試牛は健康な黒毛和種および交雑種を用いた。TB は 0.25ml ストローに 3 個の TB を入れて凍結保存したものを利用し、保存方法は 1.8M エチレングリコール (EG) 加 20 % CS 加 PBS または 1.8M EG 加 20 % CS 加 PBS + 0.1M トレハロース (Tre) にてダイレクト法および 1.8M グリセリンを用いてステップワイズ法を用いた。TB は注入前に融解、培養し、生存性を確認したもののみを試験に用いた。融解は凍結ストローを室温に 10 秒保持後 30 ~ 35 °C の温湯に 30 秒浸漬しておこない、100  $\mu$  M  $\beta$

-ME 加 20 % 子牛血清加 TCM199 培地内で 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Air の気相条件下で 24 時間培養したものを持ちいた。対照区は、最初の発情を確認後、7 日目に 20 % CS 加 PBS を 0.25ml ストローに封入したものを黄体側子宮角へ注入した。試験区は、対照区終了後の発情回帰を確認後、7 日後に開始した。試験区は TB3 個と 20 % CS 加 PBS を 0.25ml ストローに封入したものを黄体側子宮角へ注入した。注入後の採血および黄体長径の測定は試験区、対照区とも同様に行った。血中 P 濃度測定を目的とした採血は移植日の発情後 7 日目から 10、11、12、13、14、15、16、19、22、25、28 日目…と発情が回帰するまでに行い、血漿を採取、測定まで -20 °C で保存し、ラジオイムノアッセイ法にて測定した。黄体長径の測定は発情後 7 日目から 10、12、14、16、19、22、25、28 日目…と発情が回帰するまでに行った。

試験 2 : TB・胚共移植試験は試験区では胚 1 個と TB3 個を封入し、試験区では胚 1 個を封入したストローを用いた。保存方法はダイレクト法で、保存溶媒は 1.8M EG 加 20 % CS 加 PBS と 1.8M EG 加 20 % CS 加 PBS + 0.1M

Tre の 2 つを用いた。融解は移植直前に行い、ストローを液体窒素から取り出して空気中に 6 秒保持後、30 °C または 37 °C の温湯にて融解を実施した。移植は黄体が胚移植に適する発情後 7 日目の受胎牛の黄体側子宮角へ行った。受胎確認は発情後 40 から 60 日目に超音波診断装置または胎膜スリップ法にて行った。受胎率の統計処理は  $\chi$  二乗検定を用いた。

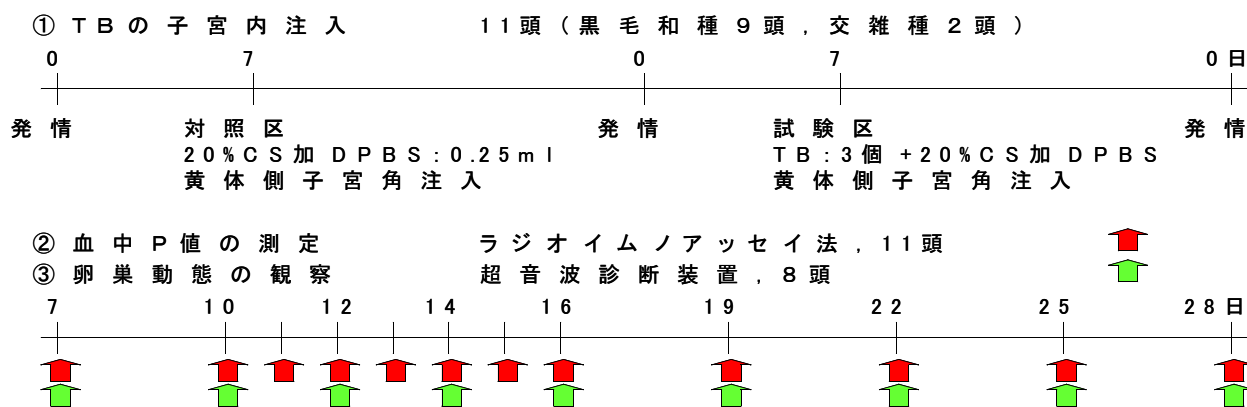


図 1 : 試験 1 の概要

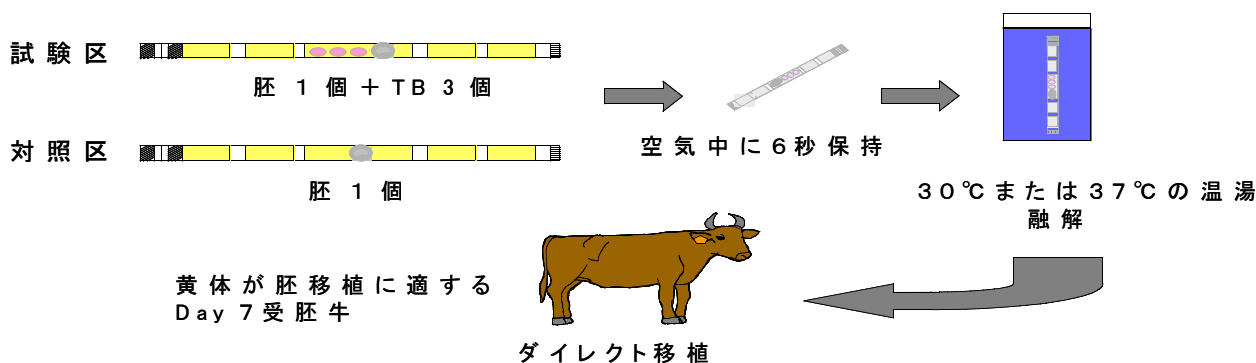


図 2：試験 2 の概要

### III 結果および考察

試験 1：発情回帰日数は対照区で 20 日から 24 日、平均が 21.9 日となった。試験区は 20 日から 29 日で平均が 23.7 日となった。試験区が対照区より発情周期の延長が見られた個体が 6 頭で +1 日から +7 日であった。短かったものは 1 頭で -1 日であった。また、同一ロットを注入した場合も成績は一定しなかったことから、TB のロットによる影響はなかったと推察された (表 1)。

表 1. 試験 1 の発情回帰日数

牛No.	TBLot.	対照区	試験区	延長日数
I004	ISOV1	21	21	0
I013	ISOV2	22	22	0
I115	ISOV2	22	29	7
I117	ISOV2	22	24	2
N001	NIVF3	21	21	0
N002	NIVF4	20	20	0
N003	NSOV5	20	21	1
Y022	YSOV6	22	27	5
Y029	YSOV6	23	22	-1
F056	FSOV7	24	27	3
F040	FSOV8	24	27	3
平均±SD		21.9±1.4	23.7±3.2	1.8±2.5

発情周期における血中プロゲステロン濃度においては、対照区では通常発情周期に応じた推移を示したが、試験区では発情後 25 日目まで平均で 1ng/ml を維持していた (図 3)

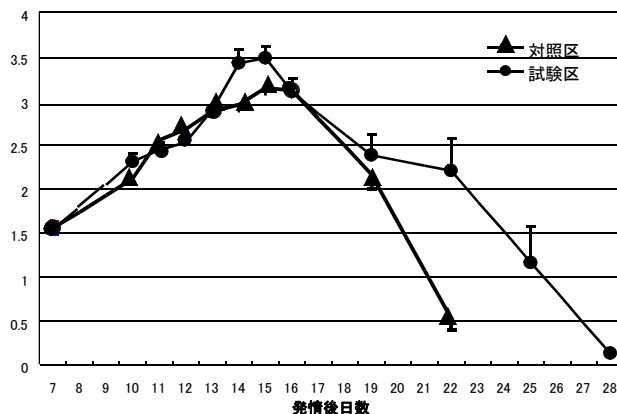


図 3. 血中プロゲステロン濃度の推移

黄体長径を測定した個体 8 頭のうち、5 頭で発情回帰の遅延がみられたが、試験区と対照区における黄体長径に差はみられなかった (図 4)。

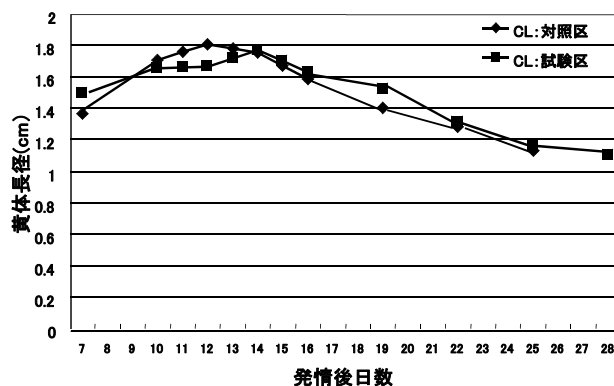


図 4. 黄体の長径の推移

血中プロゲステロン濃度と黄体長径には相関はみられなかった(図5)

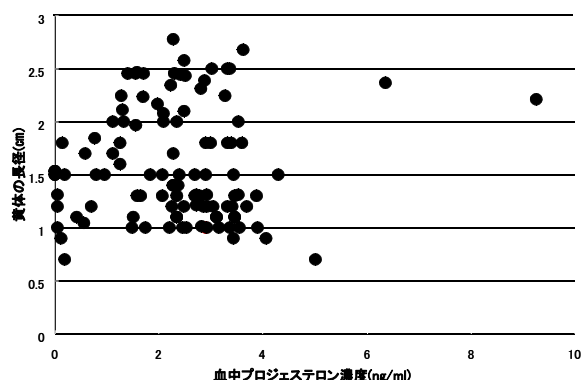


図5. 血中P濃度と黄体長径の相関

試験2: TB・胚共移植試験は、1.8M EG加20% CS加PBSを保存溶媒とした試験区で受胎率が68.6% (22/32)であり、対照区で50.0% (16/32)であった。また、1.8M EG加20% CS加PBS + 0.1M Treを保存溶媒とした試験区では受胎率が54.8% (17/31)であり、対照区で39.5% (17/43)であった(表2)。

表2. 移植成績

		移植数	受胎数	受胎率
1.8M EG + 20% CS 加DPBS	試験区	32	22	68.8
	対照区	32	16	50.0
1.8M EG + 20% CS 加DPBS + 0.1M Tre	試験区	31	17	54.8
	対照区	43	17	39.5

TBを注入することで、発情周期の延長がおこる個体が存在することが確認された。また、発情周期が延長した個体は血中プロゲステロン濃度においても発情後14日目以降から高い値で推移する傾向がみられ、緩やかに減少することが確認された。しかし、血中プロゲステロン濃度と黄体長径に相関はみられなかった。

その要因としては黄体の長径が黄体の容積を反映しているとは限らず、同時期の同程度の長径でも黄体容積に差があり、血中プロゲステロン濃度に個体差がみられたためと推察された。

また、TB・胚共移植試験では、2つの保存溶媒いずれも試験区が高くなる傾向がみられ、子宮内へのTBの注入により黄体退行を抑制し、TBと胚の共移植により受胎率が向上する一定の効果が認められ、野外応用へ可能性が示唆された。

#### 参考文献

- 1) 下司雅也. インターフェロン $\tau$  (IF $\tau$ ) 反芻獣における妊娠認識物質. Etニューズレター, 27: 1-5 (2003)
- 2) 渡辺晃行・蕪沢圭二郎・浦田博文・藤井陽一. ウシ栄養膜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. 東日本ET研究会報, 19: 50-51 (2003)
- 3) 谷口雅律・松本道夫. ウシ栄養膜共移植による受胎率向上の検討. 西日本畜産学会報大会号, 28: (2003)

The examination of the conception percentage improvement and the influence which the Trophoblast vesicle exerts the time feeling period .

Rie MIYACHI <sup>1</sup>, Toshio YAMAZAKI and Ikuo SAKAI

<sup>1</sup> Fuki Prefectural Livestock Hygiene Service Center

This examination is observed the influence which inculcates Trophoblast Vesicle (TB) in the cow. Also, it aimed for the conception percentage to improve in transplanting TB and an embryo together. In examination 1, it poured TB into the cow.

As for some cows, the time feelings regression became late. But there was not a difference in two groups. There was not correlation in the P concentration in the blood with the size of the corpora lutea.

In examination 2, it transferred TB and an embryo together to cows.

The conception percentage tended to become high.