

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：81602

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24248047

研究課題名(和文) 卵胞発育調節カスケードの最上流因子の同定とその発現調節によるOPU高度化技術開発

研究課題名(英文) Identification of the factor in the upstream of the cascade of regulation of follicular growth and enhancement of OPU technology by using of the identified factor

研究代表者

佐藤 英明 (Sato, Eimei)

独立行政法人家畜改良センター・その他部局等・理事長

研究者番号：80093243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,700,000円

研究成果の概要(和文)： 排卵誘起処理を併用した多排卵処置後の大及び中卵胞からの卵子回収率の良好なOPU技術を開発した。本OPU技術によって採取した卵子の体外受精率、卵割率および胚盤胞形成率は、排卵誘起処理を行わない区にくらべて有意に高くなり、移植可能胚数も多い傾向にあった。このような結果は黒毛和種のみならず褐毛和種においても確かめられた。また、FSHの上流域の卵胞刺激ホルモンであるGnRHを用いてFSH放出を促す卵胞刺激を行うことにより、より自然状態に近いホルモン環境をつくることが可能になり、卵胞の発育性向上、卵子の高品質化(受精率改善)が可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Practical OPU technology in wagyu beef cattle has been established by improvement of bovine OPU technology using follicular growth-stimulating factors. The recovery-rate of oocytes from medium and large sized follicles has been improved by the stimulation of the factor identified in this study. The percent of embryo developed to blastocyst by IVMFC is also improved in this study. These improved results were obtained in brown beef Wagyu as well as black beef Wagyu. FGT-OPU method developed in this study showed the increase of healthy oocytes and fertilization of oocytes and development of fertilized eggs. The original culture methods(hanging drop) was established for analyzing the biological safety of the agricultural chemicals in oocyte maturation, and clarified that some of the agricultural chemicals showed the harmful activity in spindle formation.

研究分野：家畜繁殖学、畜産学

キーワード：卵胞発育 血管増殖 OPU FGT-OPU IVMFC 和牛

1. 研究開始当初の背景

(1) 牛生体卵巣から卵母細胞を採取する OPU が考案され、優良雌個体生体牛から繰り返し卵母細胞を採取することが可能になり、牛の IVMFC とドッキングし、和牛において新しい技術開発が構想されていた。当初は、少数の卵母細胞しか採取できず、それが OPU 技術の高度利用のネックになっていた。さらに和牛の優占種である黒毛和種に加えて地方種である褐毛和種においても OPU の確立が必要と考えられていた。

(2) 卵母細胞発育には卵巣内の局所的な血管増殖が関係することや局所的な血管増殖には卵胞由来血管増殖因子やその活性増強が関係することが明らかにされていた。

2. 研究の目的

(1) 黒毛和種和牛に加えて、褐毛和種和牛においても OPU の基盤技術確立を目的とする。

(2) 牛卵胞の局所的な血管増殖に関与する卵胞由来血管増殖因子やその活性増強因子等の同定を行い、多数の発育卵胞を出現させる方法を開発する。

(3) 同定された因子を(1)で開発した OPU 基盤技術に応用し、和牛の OPU 技術を高度化する。また既知の卵胞発育促進ホルモンの最適投与方法などを用いて OPU 技術を高度化する。

3. 研究の方法

(1) 黒毛和種、褐毛和種の雌成熟個体を用い、卵胞発育促進因子の最適投与方法を検索するとともに、黒毛和種および褐毛和種和牛における OPU 技術を確立する

(2) マウスにおける先行研究を行い、それをもとに牛における卵胞由来血管増殖因子とその活性増強因子を同定する。

(3) 黒毛和種、褐毛和種の雌成熟個体を用い、卵胞発育促進因子の最適投与方法を検索するとともに、和牛における OPU 技術の高度化を図る。

(4) 多数の発育卵胞から卵母細胞を採取する方法を確立し、さらに採取した卵母細胞の IVMFC 法を開発する。

(5) IVMFC 培養系を用いて、家畜の生殖細胞形成に有害と考えられる農薬の安全性評価を可能とする方法についてマウスで先行研究を行う。飼料に混入した農薬の生殖細胞形成への影響がきくざされていることから研究範囲を広げ緊急に解析する。

4. 研究成果

(1) 卵胞発育には多くの因子・遺伝子が関与

している。遺伝子発現の網羅的解析を行い、卵胞発育に係わる候補遺伝子の同定を行い、それらの作用機序の解析を進めた。そして強い活性をもち、かつ卵胞の選択的発育に係わる候補因子を同定した。

(2) 外因性因子投与による OPU の高度化を図るため、基盤となる牛 OPU 技術の確立を試み、実用可能な方法を確立した。すなわち、排卵誘起処理を併用した多排卵処置後の大及び中卵胞からの卵子回収率の良好な OPU 技術を開発した。本 OPU 技術によって採取した卵子の体外受精率、卵割率および胚盤胞形成率は、排卵誘起処理を行わない区にくらべ有意に高くなり、移植可能胚数も多い傾向にあった。以上のように OPU 由来の体内成熟卵子から、品質の高い胚を効率的に生産できることを示した。このような結果は黒毛和種のみならず褐毛和種においても確かめられた。なお、黒毛和種、褐毛和種に共通して開発した OPU 技術は次の通りである。CIDR の挿入および EB (オバホルモン) 1mg の投与 (Day0) 後、Day4 に 10ml の生理食塩水に溶解したホルモンを頸部皮下に 1 回投与し、Day6 に OPU を実施するというものである。この方法により採取した体内成熟卵子の体外受精後の卵割率は 81.7% (対照区では 41.7%) と有意に高かった。このようなことから本研究で開発した OPU-IVF の応用により、黒毛和種および褐毛和種の繁殖における OPU 技術の有効性のみならず、繁殖性に問題があるリピートブリーダーからも胚生産が可能となった。さらに本法により作出した体内成熟卵を用いることにより効率的に優良胚の作出が可能であることが明らかにされた。

(3) 黒毛和種において OPU 前に主席卵胞を制御し、豚下垂体由来 FSH を投与する FGT-OPU 法は、正常卵子数の増加、受精卵発生率の改善を可能にした。この FSH の上流域の卵胞刺激ホルモンである GnRH を用いて FSH 放出を促す卵胞刺激を行うことにより、より自然状態に近いホルモン環境をつくることが可能であるが、卵胞の発育性向上 (図)、卵子の高品質化 (受精率改善) が可能であることを明らかにした。

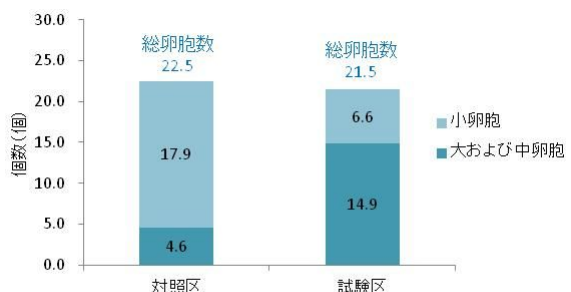


図 観察された卵胞数

(4) OPU で採卵した卵母細胞を用いる薬剤の安全性評価に資する培養法（ハンギングドロップ法）を確立した。マウスにおける先行研究では、ハンギングドロップ法によるマウス卵母細胞-卵丘細胞複合体の単培養系を利用し、ネオニコチノイド農薬の安全性/毒性評価を行った。その結果、安全性が高いとされるネオニコチノイド農薬、アセタミプリド、イミダクロピリドについても毒性誘発作用が確認された。本法は、H25年度までに行った有用化合物のスクリーニングのみならず、有害化合物のスクリーニングに効果的であることが明らかにされた。また、卵母細胞への有害性について検討を行った結果、紡錘体形成異常が高頻度にて誘発されることを明らかにした。この異常は、ニコチンによって誘発される異常と高い類似性を示した。

<引用文献>

Bjersing, I. (1982) Maturation. Morphology and endocrine function of the ovarian follicles. In *Intraovarian Control Mechanisms*. (eds. Channing, C.P. and Segal, S.J.), Plenum Press, New York, pp.1-14.

Sato, E., and Miyoshi, K. (1998) Oogenesis in mammals: A 1997 perspectives. In *Reproductive Biology Update. Novel Tool for Assessment of Environmental Toxicity*. (eds. Manabe, N.) Nakanishi Printing, Kyoto, pp.93-103.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Otaka K, Hiradate Y, Kobayashi N, Shirakata Y, Tanemura K., Distribution of the sex chromosome during mouse spermatogenesis in testis tissue sections., *J.Reprod.Dev.*, 査読有, 61(5), 2015, 375 - 381
DOI:10.1262/jrd.2015-013

Ishikawa S, Hiraga K, Hiradate Y, Tanemura K., The effect analysis of two neonicotinoid insecticides on in vitro maturation of porcine oocytes using hanging drop monoculture method., *J.Vet.Med.Sci.*, 査読有, 77(6), 2015, 725 - 728
DOI:10.1292/jvms.15-0008

Sato, E., Intraovarian control of selective follicular growth and induction of oocyte maturation in mammals., *Proc.Japan Acad. Ser.B.*, 査読有, 91, 2015, 76 - 91,
DOI:10.2183/pjab.91.76

[学会発表](計7件)

種村健太郎, マウス卵成熟過程における Tau の発現とリン酸化パターンの解析, 第108回日本繁殖生物学会大会, 2015年9月18日, 宮崎大学農学部(宮崎県宮崎市)

星野由美, マウス卵子および初期胚における Pin1 の局在解析, 第56回日本卵子学会, 2015年5月31日, 栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)

星野由美, 着床しやすい胚の特徴と選別方, 第39回家畜診療技術研究会, 2016年3月10日, 東広島(広島県)

山之内忠幸・松田秀雄・大竹正樹・相川芳雄・後藤由希・小林修司・橋谷田豊, 褐毛和種および黒毛和種の体内成熟卵子における体外受精後の卵割状況の比較, 第22回日本胚移植研究会大会, 2015年8月28日, 高知大学農学部(高知県南国市)

山之内忠幸・相川芳雄・松田秀雄・後藤由希・大竹正樹・小林修司・橋谷田豊, 成熟培地への FSH, EGF 様ペプチドおよび dbcAMP の添加がウシ体外受精胚作出に及ぼす影響について, 第108回日本繁殖生物学会大会, 2015年9月18日, 宮崎大学農学部(宮崎県宮崎市)

Tadayuki Yamanouchi, Hideo Matsuda, Masaki Ohtake, Yuki Goto, Yoshio Aikawa, Syuji Kobayashi and Yutaka Hashiyada, Effect of corpus luteum existence for the duration of follicular growth on bovine oocyte development competence., 42nd IETS Annual Conference, 2016年1月25日, アメリカ, ルイビル

山之内忠幸・松田秀雄・大竹正樹・後藤由希・小林修司・橋谷田豊, ウシ卵子の成熟培地へのプロゲステロン添加が体外受精後の胚発生に及ぼす影響, 第31回東日本受精卵移植技術研究会大会, 2016年2月5日, 石川県立音楽堂(石川県金沢市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤英明(SATO Eimei)

独立行政法人家畜改良センター・理事長

研究者番号: 80093243

(2)研究分担者

種村健太郎 (TANEMURA Kentaro)
東北大学大学院・農学研究科・教授
研究者番号：2 0 3 3 2 3 2 2

(3)研究分担者

星野由美 (HOSHINO Yumi)
広島大学大学院・生命圏科学研究科・助教
研究者番号：1 0 4 5 1 5 5 1

(4)研究分担者

橋谷田 豊 (HASHIYADA Yutaka)
独立行政法人家畜改良センター企画調整
部・技術専門役
研究者番号：5 0 4 6 2 5 3 6

(5)研究分担者

山之内忠幸 (YAMANOUCHI Tasayuki)
独立行政法人家畜改良センター企画調整
部・係長
研究者番号：3 0 7 1 3 5 8 1