

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660234

研究課題名(和文)同一卵巢内での黄体と第一卵泡波主席卵胞の共存はウシの受胎性をなぜ低下させるのか？

研究課題名(英文) Why the ipsilateral relationship where first follicular wave dominant follicle and corpus luteum are present in the same ovary decrease fertility in cattle?

研究代表者

松井 基純 (MATSUI, MOTOZUMI)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：20374762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：乳牛において、授精後早期の第1卵泡波主席卵胞(W1DF)と黄体との位置関係が受胎性に及ぼす影響を調べた。W1DFと黄体が同じ卵巢内に存在する共存関係では、異なる卵巢に存在する非共存関係に比べ受胎率が有意に低かった。非共存関係では、排卵後早期の血中および子宮内膜組織のプロゲステロン(P4)濃度が高く、共存関係では、P4受容体であるPGRMC2のmRNA発現が高かったことから、W1DFと黄体との位置関係が子宮内膜におけるP4濃度やP4受容体発現に作用し受胎性に影響を及ぼすと考えられた。W1DFと黄体の位置関係は、ホルモン処置により変化することから、位置関係を人為的に制御できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The effects of the locational relationship between the first follicular wave dominant follicle (W1DF) and the corpus luteum (CL) on fertility after insemination were examined in dairy cattle. In the ipsilateral relationship where W1DF and CL are present in the same ovary, the conception rate was significantly lower than that in the contralateral relationship where W1DF and CL are exist in different ovaries. In the contralateral relationship, the concentration of progesterone (P4) in the blood and endometrial tissues at the early stage after ovulation was higher, and the mRNA expression of P4 receptor (PGRMC2) was higher in the ipsilateral relationship. Therefore, the positional relationship between W1DF and CL may regulate P4 concentration and expression of P4 receptor in the endometrium, and then affect fertility. Since hormonal treatments changed the positional relationship between W1DF and CL, the positional relationship might be regulated artificially.

研究分野：獣医臨床繁殖学

キーワード：卵巢 黄体 卵胞 受胎性 乳牛

### 1. 研究開始当初の背景

ウシでは発情周期中に卵巣内で 2~3 回の卵胞の発育がみられ、これを卵胞波という。特に、発情・排卵直後に発育する卵胞波を第 1 卵胞波と呼び、その中で最大となった卵胞を第 1 卵胞波主卵胞 (W1DF) と呼ぶ。第 1 卵胞波はどのウシでも必ず発育することが知られているが、この第 1 卵胞波がウシの繁殖生理および受胎性に与える影響は十分に調べられていない。

我々は、帯広畜産大学畜産フィールド科学センター (FSC) での数年間にわたる繁殖記録の解析から、排卵後に形成される黄体と W1DF が同一卵巣内に共存する場合の受胎率 (33%) は、非共存の場合の受胎率 (62%) に比べて著しく低いことを発見した (参考: 平成 22 年度全国経産牛受胎率は 43.7%)。この新知見である、「W1DF と黄体が同一卵巣内に共存した場合、受胎性が低下する」という事象は、これまで報告されておらず、国内外において、このように授精後の卵巣の形態に着目して、ウシの受胎性を調べた研究は見当たらない。また、この事象は、経産牛だけでなく未経産牛においても確認されたため、ウシにおける普遍的な繁殖生理の一つである可能性が考えられた。

したがって、「W1DF と黄体が同一卵巣内に共存した場合、受胎性が低下する」という事象のメカニズムなどを明らかにすることは、ウシの繁殖生理の解明および繁殖技術の改善に貢献できると考えられる。

### 2. 研究の目的

「W1DF と黄体が同一卵巣内に共存した場合、受胎性が低下する」という事象は、重要な受胎要件である黄体機能および子宮機能に対し卵胞が何らかの影響を与える「卵胞 - 黄体 - 子宮のクロストーク」の存在を示すと思われる。そこで、本研究では、この事象の機構を解明し、ウシの新たな繁殖生理を理解し、受胎性向上に貢献することを目的に、試験 I : 授精後の W1DF と黄体との位置関係は、受胎性に影響するのか?、試験 II : なぜ W1DF と黄体との位置関係が、受胎性に影響を及ぼすのか?、試験 III : 畜産現場への応用応用を目指した、W1DF と黄体の位置関係の事前予測法や受胎性向上への処置法の検討、の 3 つの試験を実施した。

### 3. 研究の方法

(1) 試験 I : 授精後の W1DF と黄体との位置関係は、受胎性に影響するのか?

帯広畜産大学 FSC にて飼養されている、臨床的に健康で発情周期が正常なホルスタイン種経産牛 (153 頭) と未経産牛 (75 頭) を用いた。自然発情発見後に人工授精を実施し、排卵確認後 5~7 日後に W1DF と黄体の位置関係を調べた。授精後 40 日目に超音波画像診断装置を用いて妊娠診断を行い、受胎率を算出した。

受胎率の評価には二乗検定を用いた。受胎率に及ぼす要因を探るために、ロジスティック回帰分析を用い、同一卵巣内での黄体と W1DF の共存の有無、季節、未経産牛では体重、経産牛では分娩後日数、泌乳量、産次、ボディ・コンディション・スコアおよび体重による影響を解析した。

(2) 試験 II : なぜ W1DF と黄体との位置関係が、受胎性に影響を及ぼすのか?

W1DF と黄体との位置関係が、W1DF と黄体の機能を制御することで受胎性に影響を与えている可能性を調べた。

帯広畜産大学 FSC にて飼養されている、ホルスタイン種経産牛 (30 頭) および非経産牛 (30 頭) を用いた。自然排卵後、2 日毎に超音波画像診断装置を用いて卵胞および黄体の形態を評価するとともに、血漿を採取して、黄体ホルモン (P4) 濃度を測定した。一部の牛については、排卵後 4 日目に超音波ガイド下で卵胞を吸引し、卵胞液中のステロイドホルモン濃度を測定した。

受精卵の発育の場である子宮において、妊娠成立に重要な役割を持つ P4 の濃度やその受容体発現について、黄体と子宮との位置関係が及ぼす影響を調べた。

帯広畜産大学 FSC にて飼養されている、ホルスタイン種経産牛 (12 頭) を用いた。Ovsynch 法にて排卵誘起処置を行い、排卵後 5 日目に卵巣の観察を行い、W1DF と黄体の位置関係を確認した。排卵後 5、7 および 12 日目にバイオプシー法により子宮内膜組織を採取し、子宮粘膜組織における P4 濃度および P4 受容体の mRNA 発現を調べた。

(3) 試験 III : 畜産現場への応用応用を目指した、W1DF と黄体の位置関係の事前予測法や受胎性向上への処置法の検討

W1DF を人為的に操作することが受胎性及ぼす影響を明らかにするために、W1DF を人為的に排卵させた場合と吸引除去した場合の受胎率を調べた。

帯広畜産大学 FSC にて飼養されている、ホルスタイン種経産牛 (71 頭) を用いた。自然発情発見後に人工授精を実施し、授精後 5 日目に W1DF と黄体の位置関係を確認した。処置区では授精後 5 日目にヒト絨毛性腺刺激ホルモン (1500IU) 筋肉内投与し、W1DF の排卵を誘起した。授精後 40 日目に超音波画像診断装置を用いて妊娠診断を行い、対照区と処置区の受胎率を比較した。

次に、ホルスタイン種未経産牛 (35 頭) を用い、自然発情発見後に人工授精を実施し、授精後 5 日目に W1DF と黄体の位置関係を確認した後、超音波ガイド下で W1DF を吸引除去した。授精後 40 日目に超音波画像診断装置を用いて妊娠診断を行い、W1DF と黄体の位置関係と受胎率の関連を調べた。

W1DF と黄体の位置関係の事前予測が可能であるか調べるために、発情の前の周期の黄体と排卵卵胞との位置関係と排卵後のW1DF と黄体の位置関係の関連およびホルモン処置による発情・排卵の同期化が排卵後のW1DF と黄体の位置関係に及ぼす影響を調べた。

帯広畜産大学 FSC にて飼養されている、ホルスタイン種経産泌乳牛の繁殖管理記録から、自然発情前後の卵胞と黄体との位置関係が調べられている 269 頭の記録について、排卵前の周期の黄体と排卵卵胞の位置関係と排卵後の W1DF と黄体の位置関係を解析した。

次に、帯広畜産大学 FSC にて飼養されている、ホルスタイン種経産泌乳牛 (29 頭) を用い、プロスタグランジン F2 (PGF2 ) 単独投与による発情誘起あるいは PGF2 投与 48~56 時間後に性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) を投与して排卵誘起を行った。排卵確認後 5~7 日後に W1DF と黄体の位置関係を調べ、ホルモン処置との関連を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 試験 I : 授精後の W1DF と黄体との位置関係は、受胎性に影響するのか？

排卵 5-7 日後に W1DF と黄体が同じ卵巣に位置する共存群と異なる卵巣に位置する非共存群に区分して受胎率を比較したところ、経産泌乳牛および未経産牛のどちらにおいても、非共存群で受胎率が有意に高かった (図 1)。

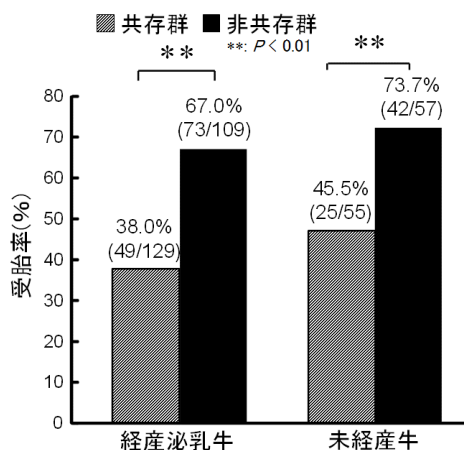


図1. 授精後5日目のW1DFと黄体との位置関係が受胎率に及ぼす影響

また、この現象は、季節による影響を受けず、未経産牛では体重、経産泌乳牛では分娩後日数、泌乳量、産次、ボディ・コンディション・スコアおよび体重の影響を受けなかったことから、牛において普遍的に起こる生理的現象である可能性が示唆された。

本知見に関する情報は、これまで報告はなく、これまで理解されていなかった牛の繁殖

生理について新たな情報を提供するものと考えられた。さらに、授精後の卵胞と黄体の位置関係が何らかの作用をもって、受胎性に影響を及ぼしていると考えられることから、本知見の背景にある生理メカニズムを解明することで、牛の受胎性改善へ向けた臨床応用へと展開できる可能性が考えられた。

(2) 試験 II : なぜ W1DF と黄体との位置関係が、受胎性に影響を及ぼすのか？

W1DF と黄体との位置関係が、W1DF と黄体の機能を制御することで受胎性に影響与えている可能性

排卵後 6 日目に W1DF と黄体が同じ卵巣に位置する共存群と異なる卵巣に位置する非共存群に区分して、W1DF の直径と血中 P4 濃度を比較したところ、W1DF の直径は共存群で大きく、血中 P4 濃度は非共存群で高かった (表 1)。

表1. 共存群と非共存群における排卵後6日目のW1DFの直径と血中P4濃度の比較

	共存群	非共存群	P-value
直径 (mm)	15.5±0.2	14.7±0.2	P < 0.01
P4濃度 (ng/ml)	2.7±0.3	3.5±0.3	P < 0.01

mean±SEM

排卵後の黄体の大きさの変化を調べた結果、両群間で黄体の大きさに差異はなかった。

次に、排卵後 5 日目に採血および W1DF の卵胞液を吸引採取した。血中と卵胞液中の P4 および E2 濃度を測定したところ、共存群において血中の E2 濃度および卵胞液中の P4 濃度が高かった (表 2)。

表2. 排卵後5日目ににおけるW1DF直径と血中および卵胞液ステロイドホルモン濃度

	共存群	非共存群	P-value
直径 (mm)	12.2±0.3	11.0±0.2	NS
血中E2濃度 (pg/ml)	1.69±0.12	1.51±0.15	P < 0.1
卵胞液中濃度			
P4 (ng/ml)	48.8±12.7	16.2±3.2	P < 0.05
E2 (ng/ml)	419.2±33.2	339.4±53.5	NS

mean±SEM

以上の結果から、非共存群では、排卵後早期の血中 P4 濃度が高く、共存群では、血中 E2 濃度が高い傾向にあった。このような性ステロイドホルモンの血中濃度の違いが、両群の受胎性の差異を引き起こしている可能性が示された。血中のホルモン濃度の違いに加え、排卵後 5 日目の W1DF の卵胞液中のホルモン濃度に差異が見られたことから、両群間で、W1DF および黄体の機能が異なることが示唆された。W1DF および黄体の機能について、相互の位置関係により区分した解析は報告されておらず、本知見は、W1DF および黄体の卵巣内での局所作用が相互の機能を制御し、受胎性に参与している可能性を示した初めての報告である。

子宮における P4 の濃度やその受容体発現に黄体と子宮との位置関係が及ぼす影響

黄体を有する卵巣に近接する子宮内膜組織中の P4 濃度は、排卵後 5 日目に、共存群に比べ非共存群で高かった。

子宮内膜における P4 受容体の発現を調べた結果、PGR および PGRMC1 の mRNA 発現は、共存、非共存に関わらず、排卵後 5 日目に、黄体を有する卵巣に近接する子宮で高くなっていた。黄体を有する卵巣に近接する子宮内膜組織における PGRMC2 の発現は、排卵後 5 日目において、共存群で高い傾向が見られた。

以上のことから、共存群と非共存群とでの、子宮内膜の P4 濃度の差異や P4 受容体の発現の違いが、両群間での受胎性の違いをもたらしている可能性が示唆された。

これまで、子宮内膜における P4 濃度あるいは P4 受容体の発現を調べた報告はいくつかあるが、卵巣と黄体の位置関係を考慮して解析したものはなく、本知見は全く新しい情報を提供するものである。

### (3) 試験 III : 畜産現場への応用応用を目指した、W1DF と黄体の位置関係の事前予測法や受胎性向上への処置法の検討

W1DF を人為的に排卵、あるいは吸引除去した場合の受胎率

授精後 5 日目の卵巣状態から共存群、非共存群に区分した後、hCG を投与した場合の受胎率を調べたところ、非投与の場合に受胎率低かった共存群において、hCG の投与により受胎率が改善した。一方、非共存群の受胎率は低下し、両群間の受胎率の差がなくなった (図 2)。

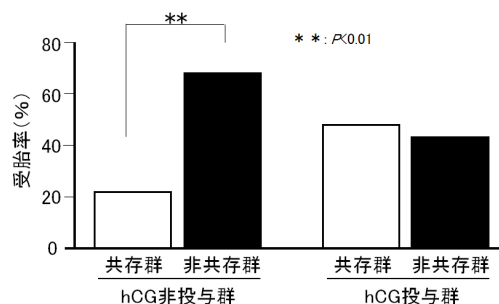


図2. hCG投与によるW1DFの排卵誘起が受胎率に及ぼす影響

次に、未経産牛において、授精後 5 日目の W1DF を超音波ガイド下で吸引除去し、その後の受胎率を調べた結果、受胎率は、共存群では 44.4%、非共存群では 76.5%であった。これは、試験における未経産牛の受胎率 (共存群 : 45.5%、非共存群 : 73.7%) と差異はなかったことから、W1DF の吸引除去は、共存群および非共存群の受胎性を変化させないことが明らかとなった。

hCG 投与試験では、W1DF の排卵によって形成された副黄体による受胎性への影響もあると考えられる。一方、W1DF の吸引除去が受胎性を変化させなかったことから、授精後 5

日目までに、W1DF と黄体の位置関係が、受胎性に何らかの影響を与えていることを示唆している。

発情の前の周期の黄体と排卵卵胞との位置関係あるいはホルモン処置による発情・排卵の同期化が排卵後の W1DF と黄体の位置関係に及ぼす影響

黄体と排卵前卵胞の位置関係と排卵後の W1DF と黄体との位置関係の関連を調べた結果、黄体と排卵前卵胞が共存関係にあった場合、排卵後に共存関係となるのは 44.9%であった。一方、排卵前に非共存関係であった場合、排卵後に共存関係となるのは 62.6%であった。排卵後に受胎性の高い非共存関係となった牛の 60.8%は、排卵前に共存関係であった。

次に、発情・排卵誘起を目的に、PGF2 を単独投与した場合と PGF2 投与と GnRH 投与を組み合わせた場合を比較したところ、PGF2 単独投与では、排卵後に 60.5%の割合で共存関係となり、PGF2 と GnRH を投与した場合には 38.2%が共存関係となった。PGF2

と GnRH を投与した試験区では、処置時の卵巣状態は排卵後の卵巣状態に影響を与えなかった。しかし、PGF2 単独投与の場合、処置時に非共存関係であった場合、84.6%が共存関係となり、処置時に共存関係で排卵後に共存関係となる割合 (45.0%) より高かった。

これらの知見は、排卵後の W1DF と黄体の位置関係は、排卵前卵胞と黄体との位置関係の影響を受けていることを明らかにした。さらに、排卵前後の位置関係の関連は、ホルモン処置により変化することが明らかとなった。これらのことから、発情・排卵誘起処置により、排卵後の W1DF と黄体の位置関係を人為的に制御できる可能性が示された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Hiroto TAKAHASHI, Shingo HANEDA, Mitsunori KAYANO, Motozumi MATSUI. Differences in progesterone concentrations and mRNA expressions of progesterone receptors in bovine endometrial tissue between the uterine horns ipsilateral and contralateral to the corpus luteum. Journal of Veterinary Medical Science, 査読有、Vol.78、No.4、2016、pp.613 - 618、doi: 10.1292/jvms.15-0366.

Ryotaro MIURA, Shingo HANEDA, Motozumi MATSUI. Ovulation of the preovulatory follicle originating from the first-wave dominant follicle leads to formation of an

active corpus luteum. Journal of Reproduction and Development, 査読有、Vol.61、No.4、2015、pp.317 - 323、doi: 10.1262/jrd.2014-099.

吉岡乃生、三浦亮太郎、羽田真悟、松井基純、授精後5日目のhCG投与時における第1卵胞波主席卵胞と黄体との位置関係が受胎率に及ぼす影響、繁殖技術、査読無、Vol.35、No.2、2015、pp.37 - 38.

三浦亮太郎、松井基純、排卵後の第1卵胞ウェーブ主席卵胞と黄体との位置関係が人工授精後の受胎率に及ぼす影響に関する研究、繁殖技術、査読無、Vol.35、No.2、2015、pp.22 - 25.

Ryotaro MIURA, Shingo HANEDA, Mitsunori KAYANO, Motozumi MATSUI. Development of the first follicular wave dominant follicle on the ovary ipsilateral to the corpus luteum is associated with decreased conception rate in dairy cattle. Journal of Dairy Science, 査読有、Vol.98、No.1、2015、pp.318 - 321、doi: 10.3168/jds.2014-8388.

〔学会発表〕(計8件)

碓野 健、服部 昌大、三浦 亮太郎、高橋 啓人、羽田 真悟、松井 基純、ウシ人工授精後の第一卵胞波主席卵胞と黄体の位置関係が卵胞および黄体の機能と受胎率に及ぼす影響、第159回日本獣医学会学術集会、2016年9月16日、日本大学(神奈川県藤沢市)

三浦亮太郎、卵胞の発育に影響をおよぼす卵巣内局所の要因、平成27年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会(招待講演)、2016年2月26日、秋田キャッスルホテル(秋田県・秋田市)

高橋啓人、三浦亮太郎、武富敏郎、羽田真悟、松井基純、交雑種雌牛への受精卵移植前のP4濃度と黄体および第1卵胞波卵胞の直径が受胎性に及ぼす影響について、第66回北海道地区三学会(日本産業動物獣医学会)、2015年9月12日、酪農学園大学(北海道・江別市)

吉岡乃生、三浦亮太郎、羽田真悟、松井基純、授精後5日目のhCG投与時における第1卵胞波主席卵胞と黄体との位置関係が受胎率に及ぼす影響、第70回北海道家畜人工授精技術研修記念大会、2014年10月16日、さっぽろ芸術文化の館(北海道・札幌市)

古山敬祐、小山毅、松井義貴、大坂郁夫、草刈直仁、三浦亮太郎、松井基純、乳用経産牛における第一卵胞波主席卵胞と黄体の位置関係が受胎率および産子の性別に及ぼす

影響、第65回北海道地区三学会(産業動物獣医学会北海道地区学会)、2014年9月11日、北海道大学(北海道・札幌市)

三浦亮太郎、吉岡乃生、羽田真悟、松井基純、ウシにおける同一卵巣内での第1卵胞波主席卵胞と黄体との共存が主席卵胞の発育に与える影響、第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月9日、北海道大学(北海道・札幌市)

Ryotaro MIURA, Shingo HANEDA, Mitsunori KAYANO, Motozumi MATSUI, Dose the ipsilateral location of the first wave dominant follicle and corpus luteum affect conception rate in cattle?, Ninth International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants, 2014年8月26日、Hotel Nikko Northland Obihiro (Hokkaido, Obihiro)

三浦亮太郎、吉岡乃生、羽田真悟、松井基純、黄体が同一卵巣内に共存する第1卵胞波主席卵胞に及ぼす影響、第107回日本繁殖生物学会、2014年8月21日、帯広畜産大学(北海道・帯広市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 基純 (MATSUI, Motozumi)  
帯広畜産大学・畜産学部・教授  
研究者番号：20374762

(2)研究分担者

羽田 真悟 (HANEDA, Shingo)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：40553441

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )