

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580339

研究課題名（和文）高泌乳牛・低受胎牛における卵子成熟・受精動態の解明

研究課題名（英文）Investigation of oocyte maturation and fertilization in high-producing and sub-fertile dairy cows

研究代表者

高橋 芳幸（TAKAHASHI YOSHIYUKI）

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：70167485

研究成果の概要（和文）：

現代の高泌乳牛にみられる繁殖性低下の原因となる卵子の成熟・受精の動態の特性・異常について検討、排卵直前の成熟卵子微細構造の特徴と排卵時期が確認され、体内における精子移送・貯蔵時間、排卵卵子の老化時期を推定できた。また、体外成熟卵子を用いて発生能獲得期・喪失期の特徴を捉えるとともに、初期胞状卵胞卵子の個別発育培養法を開発した。さらに、腔温変動を指標にした排卵時期と異常排卵の予知法、精漿成分投与による低受胎牛の治療法を開発した。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the causes of low fertility in modern high producing dairy cows, we investigated the characteristics of oocyte maturation and fertilization. As the results, the time of ovulation after LH surge and the ultrastructure of in vivo matured preovulatory oocytes were revealed. The time required for the sperm transport to the oviduct reservoir and functional life span of ovulated oocytes were estimated. By using in vitro mature oocytes, we defined the characters of acquisition of developmental capacity. Moreover, we developed a novel treatment of repeat breeding cows by using seminal plasma proteins, and a new in-vitro oocyte growth culture system to examine the effects of stresses on oocyte growth and maturation. The possibility of prediction of the time of ovulation and abnormal ovulation by monitoring vaginal temperature changes was also indicated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード：牛、繁殖、受胎、卵子成熟、受精、卵子発生、高泌乳牛、低受胎牛

1. 研究開始当初の背景

近年、乳用牛の臨床現場では泌乳能力の向上に伴い、発情の微弱化、受胎率の低下、分娩間隔の延長、リピートブリーダー牛の増加など、繁殖性の低下が問題になっている。このような現代の高泌乳牛にみられる種々の問題について、国外を中心に卵胞発育・排卵、黄体形成やホルモン動態の研究が進められ、「高泌乳に伴う飼料摂取の増加が消化管・肝臓への血流増加を招き、それによってステロイドホルモンの代謝亢進、血中エストロゲンおよびプロジェステロンの減少が起これ、卵子の早期減数分裂再開・排卵遅延・老化卵子の排卵、さらに胚の発生障害・胚死滅などにより受胎性が低下する」という機序が提案されている。しかし、牛の体内における卵胞内卵子の発育・減数分裂の進行や排卵（発育・成熟・排卵動態）に関する情報は少なく、卵胞内および排卵卵子の発生能獲得や老化に関する情報は体外成熟卵子を用いた僅かな知見に限られている。また、卵胞・卵子の発育異常があれば卵管における精子の貯蔵・放出機構も異常をきたし、貯蔵精子の早期離脱・放出あるいは排卵時の放出抑制などにより、受精に関与できる精子の数が不足して受精不成立（不受胎）や早期胚死滅に陥ることが想像されるが、受精動態に関する検討は殆ど行われていない。

現代の高泌乳牛における卵子の発育・成熟・排卵および受精・発生動態の特性、さらに暑熱ストレス、エネルギー・栄養不足などの卵子の成熟・受精・発生に及ぼす影響を明らかにできれば、受胎性の低下、分娩間隔の延長、低受胎牛・リピートブリーダー牛の増加といった問題の解決・予防に役立つ。

2. 研究の目的

現代の高泌乳牛における受胎性の低下、胚の死滅、低受胎牛・リピートブリーダー牛の増加といった臨床現場での問題を解決するために、受精から受胎にいたる過程、とくに、卵子の成熟（発育・成熟・排卵）と受精・発生動態の特性を明らかにする。また、体外受精系を活用した指標づくり、

体外で卵子の発育から成熟にいたる過程を再現できる体外卵子発育培養モデルの開発

を行い、高泌乳牛における繁殖性低下の要因・原因の解明、予防・解決策の開発を図る。

(1) 卵子の発育・成熟動態

① 体外成熟・受精・発生培養系を活用して、卵子の発生能獲得・老化の動態（発生能の高まる時期、老化の始まる時期、発生能を失う時期）を特定するとともに、それぞれの時期における卵子の形態と機能の特徴を明らかにし、体内成熟・排卵卵子の検討に必要な指標を開発する。

② 体内成熟・排卵卵子の排卵時期を特定するとともに、体外成熟卵子で得られた指標を基に、卵胞内および排卵卵子の発生能獲得・老化動態を究明し、低受胎牛の原因の解明、予防・解決策を探る。

③ 卵巣予備能（卵巣内卵胞数）と繁殖性、とくに分娩後の卵胞・卵子の発育・成熟と受胎性の関係を調べる。

④ 発育途上の卵子を個別に体外で発育・成熟させ、その受精・発生能を調べることができる培養系を開発し、暑熱ストレス、エネルギー・栄養不足などが卵子の発育・成熟過程に及ぼす影響を検討する。

(2) 卵子の受精・発生動態

① 授精精子の移送・放出、排卵および排卵卵子の受精時期・動態を明らかにする。

② 排卵異常の前兆を把握・予測する方法を開発し、低受胎牛における卵子老化防止・予防策を探る。

③ 低受胎牛・リピートブリーダー牛における受精・胚発生動態の解明と予防・治療法の開発を図る。

3. 研究の方法

(1) 卵子の発育・成熟動態

① 体外受精系、すなわち、卵巣内卵胞由来卵子を用い成熟・受精・発生培養を行い、卵子の核成熟（第二減数分裂中期：MII期）から精子侵入（受精）までの時間と発生能の関係を解析し、卵子の発生能保有時間と卵子の発生能獲得・老化時期を特定する。さらに、各期の指標となる卵子の形態・機能の違いを調べる。

② 性腺刺激ホルモン（GnRH）処理を施して黄体形成ホルモン（LH）分泌と排卵時期を調べるとともに、排卵前の卵子を超音波ガイド法（OPU）で吸引採取し、その形態・機能を検査、上述の体外成熟卵子を用いた検

討・解析で得られた指標と比較評価する。
③ 分娩後の乳牛における卵胞発育・成熟排卵動態を超音波診断装置で追跡するとともに、卵巣予備能 (≥ 3 mm の卵胞数) と血中の抗ミュラー管ホルモン (AMH) 濃度を測定し、繁殖性・受胎性との関係を調べる。
④ マイクロウェル (96-well) を用いた成熟培養と超微小マイクロウェル (Well of the Well: WOW) 用いた発育培養を行い、従来の微少滴を用いた群培養法と比較する。併せて、体外受精系の改善 (少数精子での媒精法) を図る。さらに、マイクロウェルを用いて発育途上にある初期胞状卵胞の卵子を 10~14 日間体外で発育培養した後、体外成熟・受精・発生培養 (一部は成熟培養前に前培養を加える) を行い、受精発生能を調べる。

(2) 卵子の受精・発生动態

① 発情確認・人工授精後、超音波診断装置を用いて 6 時間間隔で排卵時期を確認するとともに妊娠の有無を調べ、授精-排卵間隔と受胎率の関係を解析する。
② 膈内に温度センサーを留置して連続測定 (データロガーで記録) するとともに、発情時には超音波診断装置を用いて排卵時期 (排卵異常) を特定し、排卵時期の予知・排卵異常の予測の可能性を検討する。
③ 子宮内膜上皮成長因子 (EGF) の発現異常を示す低受胎・レピートブリーダー牛に対して、発情・人工授精時に精漿あるいは精漿成分タンパクを投与して、その後の EGF 発現パターンの回復と受胎性改善効果について検討する。

4. 研究成果

(1) 卵子の発育・成熟動態

① 体外受精系モデルを用い、MII 期卵子の発生能について解析した結果、体外成熟卵子の発生能は、MII 期到達後 12~13 時間に精子が侵入・受精した場合にピークを示した。回帰分析により発生能獲得期 (発生能向上期: MII 到達 0~7 時間後)、成熟期 (高発生能維持期: 8~16 時間後)、老化期 (発生能低下・喪失期: 17~25 時間後) が特定できた。また、各期卵子の機能特性の指標解明が可能になったことから、各期の卵子の指標となる超微形態と機能についての解析を進めることができた。
② GnRH 投与牛の LH サージと排卵は、それぞれ約 2 時間後と約 30 時間後 (27~33 時間後) にみられ、排卵直前 (GnRH 投与 25~26 時間

後) の MII 期卵子の超微形態の特徴 (ミトコンドリア・表層顆粒の均一分布など) が確認された。また、卵胞刺激ホルモン (FSH) 処置後に採取して体外成熟させた卵子は、上記の体内成熟・排卵直前の MII 期卵子に近似した発生能と超微形態学的特徴を示すことから、体内成熟 MII 期卵子のモデルとして活用できることが明らかになり、体外受精系で得られた指標を用いた解析を継続している。

③ 胞状卵胞 (≥ 3 mm) の数と血中の抗ミュラー管ホルモン (AMH) 濃度の高い相関が確認された。また、胞状卵胞の数が多く (≥ 25 個) AMH 濃度の高い牛は、分娩後早期 (40 日以内) に卵胞成熟・排卵がみられ、しかも受胎性が高い傾向にあったことから、卵巣予備能も繁殖性にかかわる要因の 1 つであることが示唆された。

④ マイクロウェルを用いた卵子の個別成熟培養法と超微小マイクロウェル (WOW) を用いた胚の個別発生培養法は、従来の群培養法 (多数の卵子・胚を微小滴内で培養) と同等あるいは、それ以上の高い成熟・受精・発生成績の得られることが明らかになった。また、受精・媒精培地 (ヘパリン無添加) に、ペニシラミン、ヒポタウリン、エピネフリンを添加すると受精促進効果がみられ、低濃度精子でも雄牛のよる差異が少なく、高い受精・胚発生率が得られることも分かった。

さらに、発育途上にある初期胞状卵胞由来卵子をマイクロウェル内で個別に発育・成熟培養を行い、発育培養法・期間および前成熟培養の効果について検討した結果、体内発育・体外成熟卵子 (通常の体外成熟卵子) に近似する発生能を有する卵子が生産可能な体外発育・成熟培養系 (発育培養 12 日、イソブチル・メチルキサンチンと卵胞発育刺激ホルモン添加培地で成熟前培養) を開発できた。この体外発育・成熟培養系を用いて、初期胞状卵胞から成熟卵胞にいたる比較的長期の卵子の発育・成熟過程における各種ストレス (暑熱、栄養不足、毒性物質など) の影響の検討、低受胎の原因究明が可能になった。

(2) 卵子の受精・発生动態

① 授精-排卵間隔と受胎成績の関係を解析した結果、授精後 6 時間以内の排卵あるいは 24 時間以降の排卵では受胎率が低下するが分かった。このことから、受精成立に必要な数の精子が卵管に移送・貯蔵されるためには、少なくとも 6~12 時間を要すること、排卵卵子は 12 時間以降老化すること、貯蔵精子は授精 30~36 時間以降に減少することが示唆され、受精動態異常の解明に役立つ指標が得られた。

さらに、低受胎牛におけるデータを蓄積、解析を進めている。

② 正常排卵牛の腔温は発情時（エスラジオールのピーク時）に特異的な上昇を示し、この特異的腔温上昇から排卵までの時間は一定範囲（ 25 ± 3 時間）にあることが分かった。また、過剰排卵処理牛でも同様の結果（ 26 ± 5 時間）が得られた。さらに、無排卵の牛では発情・排卵に特異的な腔温変化がみられず、腔温の変動パターンから正常な排卵時期の予測と排卵異常の予知ができる可能性が示唆された。

③ レピートブリーダーにみられた子宮内膜上皮成長因子(EGF)の発現異常は、牛の精漿あるいは精漿中の特定タンパク質成分を腔内に注入することにより正常パターンに回復し、受胎率も改善されることが明らかになった。

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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

- 1) Huang W、永野昌志、Kang S-S、古山敬祐、柳川洋二郎、高橋芳幸、牛卵胞由来卵子の体外発育培養期間と成熟前培養が核成熟および発生能に及ぼす影響、第 54 回北海道生殖医学会、2012 年 2 月 25 日、札幌医科大学、札幌。
- 2) Kang S-S、Huang W、古山敬祐、柳川洋二郎、永野昌志、高橋芳幸、今井 敬、牛胚の体外培養におけるWOWの有効性、第54回北海道生殖医学会、2012年2月25日、札幌医科大学、札幌。
- 3) Kang S-S、古山敬祐、Huang W、永野昌志、高橋芳幸、テオフィリンとPHEを添加した媒精培地を用いた牛の体外受精、第 53 回日本生殖医学会北海道地方会学術講演会、2011 年 2 月 19 日、酪農学園大学、江別市。
- 4) Katagiri S、Takahashi Y、Shirasawa A、Kaneko E、Akemi Y、Nakata Y: Seminal plasma contains protein to normalize the epidermal growth factor profile in the uterine endometrium and to restore fertility in repeat breeding cows. XXVI World Buiatrics Congress. 2010 年 11 月 18 日、Santiago, Chile.
- 5) Kaneko E, Shirasawa A, Katagiri S, Akem

Y, Nakata Y, Takahashi Y, Effect of seminal plasma on uterine EGF profile and fertility in high yielding repeat breeder cows. International Symposium on Declining Fertility in Dairy Cows in the World, 2010 年 1 月 30 日、ワールドコンベンションセンター、宮崎市。

- 6) 白澤 篤、片桐成二、金子絵美、高見野枝、明見好信、中田善雄、高橋芳幸、牛精漿による子宮内膜上皮成長因子の発現増強および受胎促進効果、第 102 回 日本繁殖生物学会、2009 年 9 月 11 日、近畿大学農学部、奈良市。

[図書] (計 3 件)

- 1) 高橋芳幸、日本家畜人工授精師協会・家畜改良事業団、家畜人工授精講習会テキスト(家畜体内受精卵・体外受精卵移植編)、2010、pp53-58、pp88-100。
- 2) 高橋芳幸、畜産技術協会、畜産技術発達史、2011、pp 62-69。
- 3) 高橋芳幸、文永度出版、獣医繁殖学、2012、pp142-161。

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 芳幸 (TAKAHASHI YOSHIYUKI)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：70167485

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

片桐 成二 (KATAGIRI SEIJI)
酪農学園大学・獣医学部・教授
研究者番号：00292061

永野 昌志 (NAGANAO MASASHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号：70312402