

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870406

研究課題名(和文) 卵胞発育モデルを用いたホルスタイン種牛における分娩後の卵胞波再帰メカニズムの解明

研究課題名(英文) Effect of postpartum resumption of ovarian activity on the formation of antral follicle-like structures by bovine cumulus-oocyte complexes in Holstein cows.

研究代表者

谷口 雅康 (TANIGUCHI, MASAYASU)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：40625018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウシ体外卵胞発育モデルを活用し、生体の卵巣活動と体外卵胞用構造物(AFLS)の形成との関連を調査するため、培養法改良と生体由来血清の添加試験を実施した。その結果、培養液への卵胞刺激ホルモン(FSH)の添加の有効性を示し、4%セリシンを用いることで無血清培地でのAFLS形成に成功した。そして、生体由来血清を用いた場合、生体の卵巣活動にかかわらず、FSH添加なしでは形成率が低く、さらなる改良が必要であることが示された。一方で、黄体形成ホルモンの添加効果はAFLS形成に抑制的に働くことが示された。以上のことから、本モデルのさらなる改良がより効果的な卵巣静止の治療法の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the effects of postpartum resumption of ovarian activity on the formation of antral follicle-like structures (AFLS). The results indicate that 1) supplementation of F/P MPs in collagen gels contributed to the beneficial effects of follicle stimulating hormone (FSH) on the formation of antral follicle-like structures. 2) Supplementation with 4% sericin cumulus-oocyte complexes (COCs) formed AFLS and the same formation rates as the supplementation of FBS. 3) Supplementation with serum from postpartum Holstein cows, it is necessary to supplement FSH. Moreover, 4) supplementation with hCG was detrimental. In conclusion, culture techniques of AFLS derived from COCs might provide important insights into follicular development, and Luteinizing hormone may be harmful to a postpartum resumption of ovarian activity. Although improvement of the AFLS culture system is necessary, this system might become a technique to investigate postpartum resumption of ovarian activity.

研究分野：獣医臨床繁殖学

キーワード：ウシ体外卵胞発育モデル 分娩後卵胞波再帰 セリシン 黄体形成ホルモン

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本国内におけるホルスタイン搾乳牛の個体平均年間生産乳量は飛躍的に改良された。一方、分娩後初回受胎率、分娩間隔などの繁殖性は年々低下傾向を示している。飼養管理、ホルモン剤による改善効果など多くの研究がなされてきたが、卵巣内の特に初期胞状卵胞に与える影響についての報告はない。

(2) 我々はウシ卵巣から採取した卵丘・卵母細胞複合体 (COCs) をコラーゲンゲルに埋包し培養することで人工的に卵胞様形態 (AFLS) を作出し、卵胞発育を詳細に観察できる体外評価系を確立した。さらに、その培養液に種々の物質、ホルモン剤等を添加することにより、AFLS の形成率・直径に影響を及ぼすことを明らかにしている。

2. 研究の目的

(1) AFLS 形成率の向上と胎児血清が形成に与える影響を評価するために、無血清培地を用いた培養系の確立を目指す。それにより、無血清培地、胎児血清培地、生体由来血清培地それぞれの AFLS 形成への影響を評価し、この AFLS 培養モデルが卵巣内の初期卵胞の生育モデルとなるかどうかを検証する。

(2) さらに、通常の培養液に用いるウシ胎児血清 (FBS) を生体由来のものに置き換えることで、生体の分娩後の栄養状態などが AFLS 形成に与える影響を検討し、実際の生体での卵巣動態と共に検証することで、分娩後の卵胞波再帰に及ぼす要因を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) AFLS 形成率向上のためのホルモン輸送体の効果と形成率の関係検討として、培地への FSH 添加にホルモン輸送体としてフラグミン・プロタミン微小粒子 (F/PMPs) を用い、卵丘卵母細胞複合体を包埋するコラーゲンゲルに 10% (v/v) F/PMPs を添加したもの (MPs 群)、10% PBS に 1.0 AU/ml の FSH を添加し 0.1 AU/ml に調整したもの (FSH 群)、10% F/PMPs と 1.0 AU/ml の FSH を添加したもの (MPs/FSH 群) に区分した。対照区として、OCCGs を包埋するコラーゲンゲルに 10% PBS のみを添加した群を用いた。AFLS の直径を培養開始から 4、8 日目に計測した。AFLS 内の卵子直径は培養開始前と 8 日目に計測した。

(2) 無血清培地を用いた AFLS 発育モデルの検討として FBS 代替物として絹由来タンパク質であるセリシンを 1% から 6% 添加し、その添加効果を評価するとともに、最適添加濃度を決定した。AFLS の直径を培養開始から 4、8 日目に計測した。AFLS 内の卵子直径は培養開始前と 8 日目に計測した。

(3) 生体由来血清が AFLS 発育に及ぼす影響と黄体形成ホルモンの添加効果を検討するために、同一牛群で管理されるホルスタイン種搾乳牛から血清を採取した。分娩後 30~40 日において、卵巣活動の再開していない卵巣静止群と、黄体の形成が確認された発情回帰群 (各群 20 頭) から血液を採取し、遠心分離にて血清を得た。発情回帰群においては、そのステロイドホルモンの影響を考慮し、発卵後 1~3 日に採血を行い、血清を得た。対照群を FBS 添加群とし、卵巣静止群、発情回帰群の血清を添加した場合の AFLS 形成を評価した。AFLS の直径を培養開始から 4、8 日目に計測した。AFLS 内の卵子直径は培養開始前と 8 日目に計測した。さらに、培地への黄体形成ホルモンの添加効果を検証するため、異なる濃度 (1, 10 or 100 IU/mL) のヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) を添加した培養液を用いて 8 日間培養した。

4. 研究成果

(1) 図 1 に示す通り、卵胞増殖培養 4 日目ではコラーゲンゲル包埋群 (C)、FSH 添加群 (F)、10% (v/v) F/PMPs を添加群 (M) と比較し、MPs/FSH 群 (MF) の AFLS 形成率が高い傾向 ($p < 0.1$) がみられた (図 1)。

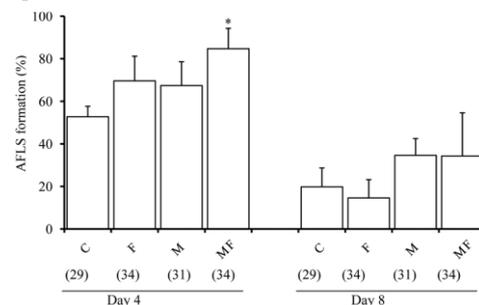


図 1 培養 4 日目 8 日目における AFLS 形成率
培養 4 日目と 8 日目では MPs/FSH 群が対照群に比較し有意 ($p < 0.05$) に AFLS 直径が大きくなっていった。培養 8 日目では AFLS を形成した卵子の直径が $91.4 \pm 0.5 \mu\text{m}$ から $116.2 \pm 1.3 \mu\text{m}$ に大きくなっていったが、成長度は $23.7 \mu\text{m}$ から $28.2 \mu\text{m}$ と群間で有意な差はなかった (図 2)。

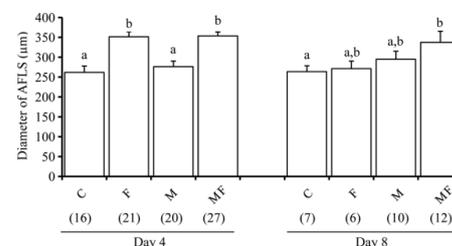


図 2 培養 4 日目 8 日目における AFLS 直径
F/PMPs と FSH の添加は卵子の成長は促進せず、AFLS の形成と大きさを向上させることが示唆され、牛における前期胞状卵胞から得られた卵子の増殖培養において F/PMPs はホルモン輸送体としても働く可能性が示唆された。

(2) 無血清培養系の確立のため、FBS の代替物としてセリシンを添加した結果、2% 及

び4%添加群が1%、6%、さらに無添加の対照群と比較して有意に高い形成率を示した($p < 0.05$)。さらに、2%、4%セリシン添加群はFBS添加群と比較してその形成率に有意な差は見られなかった(図3)。

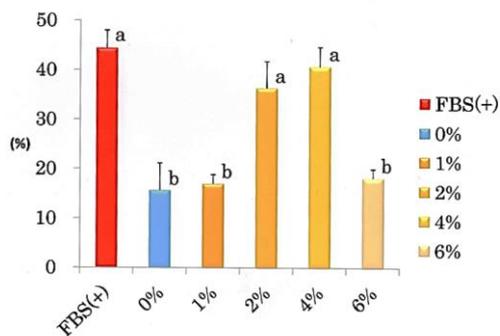


図3 ALFS形成に及ぼすセリシンの添加効果

しかし、ALFS直径においては、培養4日目および6日目において2%および4%セリシン添加群はFBS添加群と比較して有意に低い値を示した。

(3) これまでの研究から、FSHの添加によりAFLS形成率、直径ともに向上し、さらにFBS添加とセリシンを用いた無血清培地との比較から、4%セリシン添加で同等の形成率が得られるものの、培養4日目、さらに6日目での直径が低い傾向がみられ、FSHとは異なるAFLS発育因子が存在することが示唆された。そこで、さらに、FBSの代替物質としてホルスタイン搾乳牛から採取した血清を用いて同様にAFLS形成試験を行った。血清は分娩後30日から40日、同一牛群で飼養され、周産期疾病など既往歴もないウシを用いた。超音波診断装置を用いた卵巣診断により、卵巣静止群と発情回帰群に分類した。まず、FSHの添加なしに培養を試みたところ、両試験群ともにAFLSは形成するものの形成率が非常に低かったことから、培養液にそれぞれの血清とFSHを添加し、培養を行ったところ、形成率が上昇し、FBS添加群と有意差は認められなかったものの、その値は生体由来の2群で低い傾向がみられた。一方で、卵巣静止群と発情回帰群の間においてもその結果はほぼ同等であり、培養液中にFSHを添加した場合には、血清由来生体の卵巣状態が大きく影響しないことが示唆された(図4)。

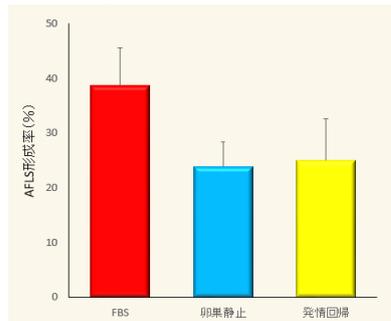


図4 AFLS形成に及ぼす生体由来血清の添加効果

生体由来血清を用いてもAFLSが形成されることが明らかとなり、これによりより生体の状況を反映した卵胞波の回帰の解明が進む可能性が示されたものの、FSHを培養液に添加しなければ十分な形成がみられず、また添加することにより実際の卵巣活動とリンクしたAFLS形成には至らなかった。一方で、搾乳牛における分娩後の卵巣静止は、分娩後の低エネルギー状態などにより血中のFSH濃度が低いことにより引き起こされることが知られているが、治療としてウシにFSHを投与しても治療効果はあまり高くない。しかし、本試験の結果からは卵巣静止牛の血清にFSHを添加することでAFLSの形成がみられたことから、卵巣静止への治療法としてのFSHの投与量に検討の余地があること、さらにFSH製剤は生体に投与した場合半減期が非常に短いことから、その用法についても改良の酔いがあることが示唆された。当初計画においては、さらに生体由来血清を分娩後の泌乳ステージによってその変化、効果を解明する計画であったが、生体由来血清単体の添加(FSH添加なし)ではその形成率が低く、評価が難しいことが判明したことから、FSH以外のAFLS形成に有効な添加効果を持つ物質の検討が必要となった。

(4) そこで本モデルを用いたAFLS形成へのホルモン剤の添加効果を検討するために、黄体形成ホルモンとして、hCGの添加試験を行ったところ、hCG添加培地でのCOCs培養において、hCG100 IU/mL添加群のALFS形成率が、他の濃度添加群に比べて有意に低下した。さらにhCG1.0 IU/mL添加群の培養4日から8日目までの平均AFLS直径は、hCGを添加しない対照群に比べて有意に小さくなった($P < 0.05$)。その上、培養4日目以降のAFLS直径は、対照群に比べhCGの添加濃度に関わらずhCG添加群で小さくなる傾向が認められた(図5)。

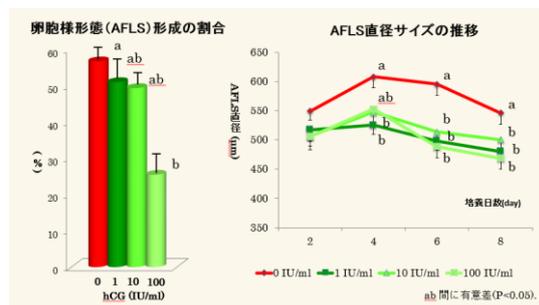


図5 AFLS形成に対するhCGの添加効果

以上の結果は、同じ性腺刺激ホルモンでもFSHにはAFLS形成において有用な効果が認められるものの、LHには抑制的効果があるということを示唆した。一般にFSHとLHは相補的な効果を持っており、FSHとLHの作用連携は、初期胞状卵胞における卵胞腔形成と卵母細胞の減数分裂能の獲得を促進し、LHは、FSHの影響下で顆粒層のアロマターゼ活性を高

めるアンドジェンの産生を促進する。さらに、初期胞状卵胞の発育にはFSHが作用するものの、主席卵胞へ選抜された後はLHがその発育を担うとされる(引用1)。本研究が解明しようとした卵巣静止状態からの卵胞波回帰をこのモデルが反映しているとする、初期胞状卵胞の発育に対してLHは抑制的に働く可能性が示唆される。一方で、現在でも卵胞発育不全などの卵巣静止の場合にはhCGなどのLH製剤がその治療薬として認められているが、卵胞発育の見られない場合にはその効果は限定的であるし、本研究の結果とは矛盾する。今後、本モデルを用いた研究が、卵胞波回帰への要因解析と、より効果的な卵巣静止の治療法の開発につながるものと期待される。

<引用文献>

- ① 中尾敏彦, 津曲茂久, 片桐成二, 獣医繁殖学 第4版 文永堂出版2014.

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 2件)

- ① Ono T, Takaoka A, Morita Y, Do L, Tanihara F, Taniguchi M, Otoi T. Effects of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate and human chorionic gonadotropin on the formation of antral follicle-like structures by bovine cumulus-oocyte complexes. Acta Vet Hung, 査読有, 2015 Vol.63, pp. 485-498.
Doi: 10.1556/004.2015.045.
- ② Morita Y, Karja NW, Do LT, Tanihara F, Taniguchi M, Otoi T. Formation of an Antral Follicle-Like Structure by Bovine Cumulus-Oocyte Complexes Embedded with Fragmin/Protamine Microparticles. Anim Sci J, 査読有, 2015, Vol. 26, pp. 273-275.
Doi: 10.1080/10495398.2015.1015681.

[学会発表] (計 1件)

- ① 吉村梓、LAHNH Do Thi Kim、谷口雅康、音井威重. ウシ卵丘卵母細胞複合体を用いた無血清培地における卵胞発育モデルの検討. 山口県獣医学会、2014/8/24、山口県獣医師会館、山口県山口市

[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
谷口 雅康 (TANIGUCHI Masayasu)
山口大学・共同獣医学部・准教授
研究者番号：40625018

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()