

## 牛の胚移植と早期妊娠因子

大阪府立大学農学部 森岡 宏至

家畜の中でも牛の早期妊娠診断は生産者にとって重要な課題である。現在、牛の妊娠診断は主としてノンリターン法、直腸検査法およびホルモン測定法などで行われているが、いずれも一長一短があり、より優れた確実な早期妊娠診断法の開発が待たれている。特に、胚移植による効果的な家畜の改良増殖が実用化されつつある現在、胚のモニターを兼ねた早期妊娠診断法開発への期待は大きい。

1974年、Mortonらは受精後極めて早期の母体血清中に免疫抑制因子が出現することを見つけ、これを早期妊娠因子 (early pregnancy factor; EPF) と名づけた。以来、現在までにマウス、ヒツジ、ブタ、ヒトなどで、EPFが検出されている。しかし、牛のEPFに関する報告は少なく、その詳細は不明である。

今回は我々が確立した牛のEPF活性測定法を用いて、牛における人工授精後および胚移植後並びに過剰排卵処置後に人工授精した供卵牛の胚回収前後における母体血清中のEPF活性の出現とその変動について調べ、胚とEPFとの関係から早期妊娠診断への可能性について検討したので報告する。

[方法] EPF活性の検出は抗牛リンパ球血清 (ALS) を用いたロゼット形成抑制試験により行った。ロゼット抑制試験はリンパ球と異種赤血球との間で形成されるロゼットをALSが抑制する能力をもって測定する。この方法によるロゼット抑制力価 (Rosette inhibition titre; RIT) はALSを含まない対照のロゼット形成率に対して75%以下に抑制する能力をもっているALSの最大希釈倍数で表示される。解体直後の年齢3才前後の去勢黒毛和種雄牛の脾臓から分離したリンパ球を血清試料で処理し、このリンパ球浮遊液にALS、モルモット補体およびヒツジ赤血球を加えてロゼット抑制試験を行い、そのRITを測定した。本研究に用いたALSはウサギを免疫動物として我々が作製したもので、異種赤血球としてはヒツジ赤血球を用いた。

人工授精後のEPF活性の出現と変動については、年齢5~6才のホルスタイン種10頭を用いて調べた。これらの牛に凍結精液による通常の人工授精を施し、妊娠0 (人工授精当日)、1、2、3、5、7、10、15、21日に採血し、血清を採取した。

一方、胚移植後のEPF活性の出現と変動については、黒毛和種成雌牛12頭を用いて調べた。移植に供した胚は、黒毛和種成雌牛にFSH減量投与法とPGF $2\alpha$ 投与の併用による過排卵処置を施した後、誘起発情時に人工授精して授精後7~8日目に子宮灌流法によって回収し、桑実胚または胚盤胞まで发育した正常胚を選び、凍結保存されたものである。胚は移植時に融解し、自然発情後7日目の受卵牛に移植した。採血は胚移植日 (0日で自然発情の7日目に相当)、移植1、2、3、5、10、15日後の午前中に行い、血清を採取した。

過剰排卵処置後、人工授精を施した供卵牛の胚回収前後におけるEPF活性については黒毛和種牛6頭を用いて調べた。過剰排卵処置は上述とほぼ同じ方法で行った。誘起発情時に人工授精し、授精7日後に子宮灌流法により胚を回収した。採血は0日(人工授精当日)、人工授精後1、2、3、7日(胚回収日)8、9、10、21日(胚回収後14日)の午前中に行い、血清を採取した。

〔結果〕人工授精例10頭のうち、妊娠成立例5頭では人工授精日(0日)のRITは2であったが、授精1日後から急激なEPF活性の上昇が認められ、その後授精21日後までRITは4の高い値を維持した。妊娠不成立例5頭では、全例において人工授精日から授精21日後までEPF活性の上昇を示さず、RITは2で推移した。図1にRITの平均値を示す。授精1日後以降の各日齢における妊娠成立例と不成立例のRITの間に有意差が認められた。

胚移植例12頭のうち妊娠成立例6頭と妊娠不成立例6頭のRITの平均値を図2に示す。胚移植後の妊娠成立では、胚移植日のRITは6例とも2であったが、胚移植1日後のRITは1例で6、4例で5に急上昇した。胚移植2日後におけるRITは3例で5、3例で4を示し、また移植3日後では全例で4とやや下降を示したもののその後は移植15日後まで全例とも4を維持した。胚移植後の妊娠不成立例では胚移植日において、2を示したRITが移植1日後には2例で4、4例で3とやや上昇した。胚移植2~10日後では、全例ともRITは3を維持したが、移植15日後には全例ともRITは2に下降し、胚移植日の値に戻った。胚移植後の妊娠成立例と不成立例のRITの間には移植1日後以降有意差が認められた。

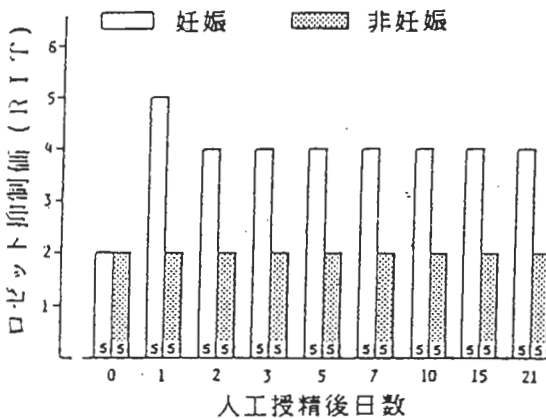


図1. ホルスタイン牛における人工授精後の妊娠および非妊娠母体血清中の平均RIT値。

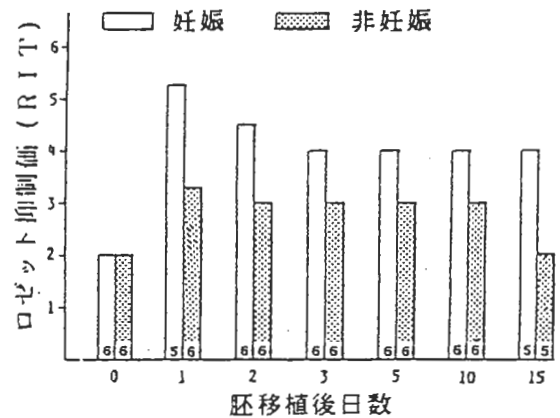


図2. 黒毛和種牛における胚移植後の妊娠および非妊娠母体血清中の平均RIT値。

過剰排卵処置後、人工授精した牛の授精後および胚回収前後のEPF活性の変化を調べた結果を図3に示す。人工授精当日のRITは6例とも2であった。授精1日後のRITは5例で2、1例で1であった。授精当日と授精1日後のRITには有意差は認められなかったが、授精2日後には有意に上昇し、1例で

7、1例で6、4例で5となった。授精3日後には全例5、7日後（胚回収日）には4例で5、2例で4を示し、いずれも授精当日および授精1日後のRITよりも有意に高い値を示した。胚回収1日後にはRITは3例で3、3例で2と有意に減少し、胚回収2日後以降は全例とも2で推移した。授精当日、授精1日後、および胚回収1日後以降のRITの間には差は認められなかった。また、回収胚数とRITの間には有意な関係は認められなかった。

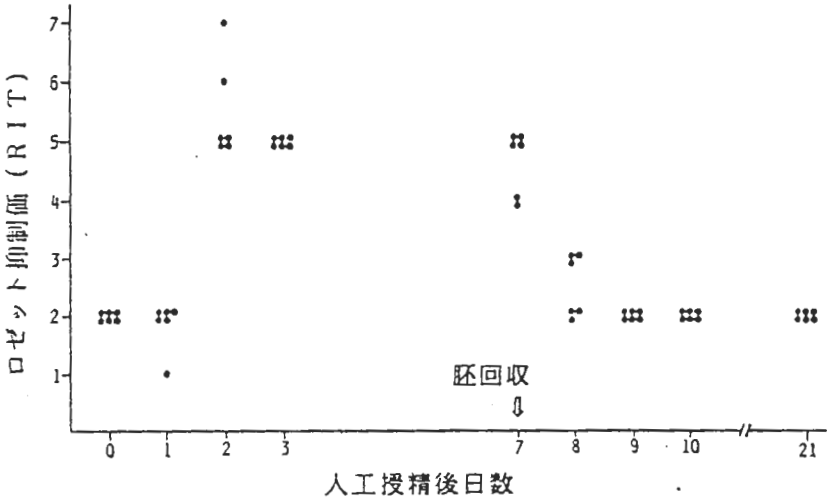


図3. 黒毛和種牛における過排卵処置人工授精後の母体血清中RIT値. 7日に胚回収.

[考察] 本研究では、我々が確立した牛のEPF活性の検出法により、牛における人工授精後、胚移植後および胚回収前後における母体血清中のEPF活性を調べた。その結果、牛においても他種動物と同様の時期にEPFが出現し、人工授精および胚移植後の妊娠成立例においてのみ高いEPF活性を示すが、胚回収後の母体血清中からEPF活性は消失することが明かとなった。

以上の結果から、EPF活性の検出は牛における早期妊娠診断や胚移植後の受胎の成否判定に応用できるものと考えられる。またEPFは胚早期死滅の機構解明や胚の機能検索の有力なモニターとして役立つことも考えられる。さらに、EPFは受精から着床に至る時期における免疫抑制の主役を演じている可能性があると考えられることから、妊娠成立・維持機構の解明に有力な指標となるものと思われる。

EPF活性は現在のところロゼット抑制試験によって検出されている。ロゼット抑制試験は特殊な器具や装置を必要としないと言う優れた点がある反面、測定には1日を要し、1人で1~2検体しか測定できないこと、また新鮮な牛脾臓（リンパ球）が容易に入手し得る条件が整っていることなどの難点がある。今後、野外への応用に当たってはさらに簡便で精度の高いEPF測定法の開発が期待される。我々はその後双胎牛および多胎牛などのEPF活性についても調べている。