

総説

## ウシの子宮機能と受胎性について

木村康二<sup>1)</sup>、松山秀一<sup>2)</sup>

- 1) 岡山大学大学院環境生命科学研究科・動物機能開発学講座・動物生殖生理学研究室
- 2) 農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・飼養管理技術研究領域

連絡担当者：木村康二

岡山市北区津島中 1-1-1

Tel : 086-251-8349, Fax : 086-251-8385

kimurak@okayama-u.ac.jp

### 【要約】

近年、我が国だけでなく世界的にウシの受胎率低下が問題となっている。我々は胚移植における受胎率向上研究を実施している。研究を進めるにあたり、移植後の胚の死滅時期の特定を試みた。移植後の不受胎牛の約70%は正常周期内に発情を回帰すること明らかとなった。胚が妊娠認識時期にインターフェロントウ (IFN $\tau$ ) を分泌している場合、発情が遅延するため、これらの牛では子宮内で妊娠認識時期以前 (発情後16日以前) に胚が死滅していることが予想された。このことから胚移植の胚死滅は移植直後 (発情後7日) から発情後16日の間に多発することが明らかとなった。次にこの胚死滅多発期間をバイパスすることで受胎率の向上が達成できるかについて検討するため、伸長胚 (13-14日齢胚) の非外科的移植を行った。しかしながら、不受胎牛のうち正常発情回帰を示す牛は約30%に低下したものの、低受胎傾向牛の受胎率改善は見られなかった。以上の結果から、我々は低受胎の原因の一つは子宮機能の低下と判断し、低受胎傾向を示すウシの子宮内膜が正常受胎牛とどのように違うのかを子宮内膜で発現している遺伝子についてマイクロアレイを用いて検討した。正常妊娠牛で発現が上昇している遺伝子は97個であるのに対し、低受胎傾向牛では713個存在した。このことから低受胎傾向牛の子宮内膜では何らかの機能亢進が生じている可能性が示唆された。

**キーワード**：胚移植、胚死滅、子宮機能、伸長胚

### 【緒論】

ウシの受胎率低下が畜産現場で問題視されるようになってから久しい。家畜改良事業団の調査によると、乳牛の凍結精液を使用した際の初回受胎率は平成元年の62.4%から平成25年には44.3%と約20ポイント近く低下している。このような受胎率の低下は、様々な牛側の要因だけでなく、人間側の社会的要因も含めて、複

雑に相互関与した結果であり、それを紐解くことは容易ではない。ウシの低受胎の問題が未だに解決がなされず、依然として状況が悪化し続けている原因の一つはこの点にあると思われる。

ウシの生理的側面から低受胎を考えると、受精・胚発生が正常に行われるような環境とそれに応えることが出来る胚や精子、卵子の存在が必要とされる。したがって、受胎に関わるウシの生理的要因を大きく胚およびそれを受け入れる母体という2つに分類し研究が進めている。

受理：2016年10月26日

本稿では、牛低受胎要因解明と受胎率向上を目指して進めている我々の研究について報告する。

### 【胚移植と低受胎】

現在我が国の畜産現場での牛の繁殖には人工授精と胚移植の2つの手法が主に普及している。人工授精は発情後の適切な時間に凍結精液を融解し、子宮内に注入することで行われるが、胚移植の場合は、凍結または未凍結の胚（桑実期胚～胚盤胞期胚）を非外科的に発情後6～7日の雌牛の子宮内に移植する。これら2つの手法において受胎の成立条件は大きく異なる。人工授精において、適正な内分泌環境における正常な卵胞発育と排卵、適正な授精、授精の成功、精子の受精能、正常な初期胚発生、正常な卵管機能による胚の輸送、等様々な条件がすべて満たされた場合のみに受胎が成立する。一方胚移植においては、移植胚の生存、適切な内分泌環境など、受胎成立に必要な条件は人工授精のそれと比べて非常に少ない。さらに胚移植における受胎必要条件は人工授精のそれと重複するため、胚移植における受胎率向上条件を達成できれば、人工授精の低受胎に関わる要因のいくつかを解決出来、人工授精特有の条件に絞って研究を進めることができる。このようなコンセプト

トから我々は胚移植における受胎率向上研究を行っている。

緒論で述べたように、現在の乳牛の人工授精での受胎率は44.3%である。それに比べて胚移植における平均受胎率は50%前後を推移し、ここ20年間安定しているが、決して高い値とは言えない。しかしながら、人工授精で受胎が得られなかった牛への胚移植により受胎の改善が見られること [3]、また、暑熱環境において人工授精よりも胚移植の方が高い受胎率が得られる [1, 4] などの報告もあり、胚移植を用いた受胎率向上研究やその周辺技術の開発は有効であると考えられる。

### 【胚移植における胚死滅時期】

最初に胚移植における受胎率向上研究の取り掛かりとして、移植後の胚死滅時期について検討を行った。発情後7日目の雌ウシに凍結融解後、実体顕微鏡下で生存性を確認した胚盤胞期胚または桑実期胚を黄体側子宮角に定法に従い移植した。移植後、1日2回発情回帰を発情行動および直腸検査により調査した。のべ466頭の雌ウシに胚を移植したところ、受胎率は48.1%であり、242頭が不受胎であった。この不受胎牛の発情回帰日を詳細に検討したところ、正常範囲内の発情回帰（25日以内）した

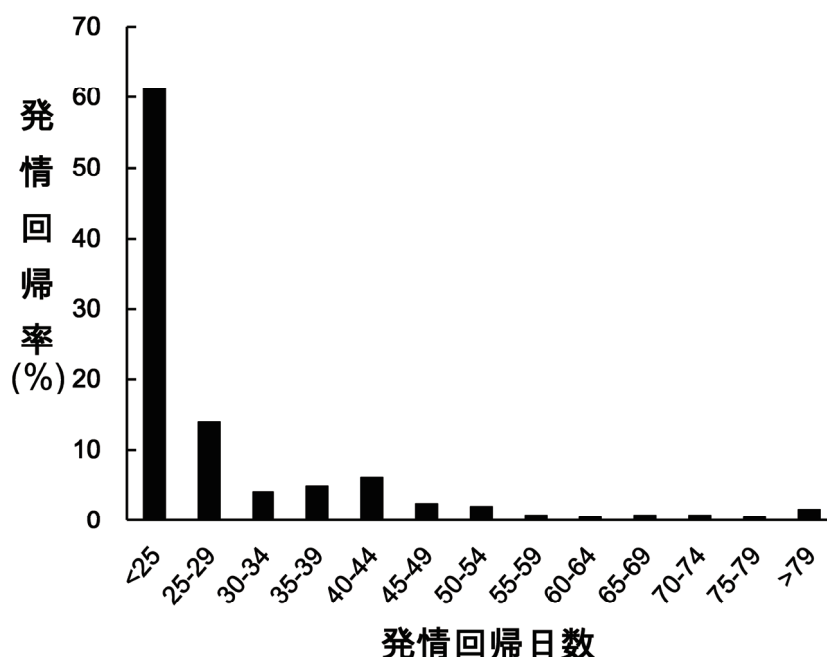


図1 7日齢胚移植後の不受胎牛の発情回帰日数とその頻度

ウシは不受胎牛全体の60%以上を占めていた(図1)。このことから胚移植の場合、不受胎牛の大部分が正常な周期で発情を回帰することが示され、この胚損耗を防ぐことが胚移植における受胎率向上に大きく寄与すると考えられる。

**【胚死滅時期を回避すれば胚移植における受胎性は高まるのか?】**

ウシ胚が子宮内膜上皮細胞と接着し着床するまでは約25-30日必要とされている。ウシの発情周期は21日前後であるため、胚が着床する、すなわち胚と母体が直接的なコミュニケーションを成立させる前に、何らかの手段を用いて胚は母体にその存在を知らせる必要がある。そのシグナル物質として胚はインターフェロントウ(IFN $\tau$ )と呼ばれるタンパク質を子宮腔内に分泌する[10]。このインターフェロンは子宮内膜上のレセプターに結合し、子宮からのPGF2 $\alpha$ 分泌を抑制することによって、黄体退行を防いでいる[5]。また、妊娠認識時期(day 16-18)の子宮内にtype I IFNを投与すると発情周期が延長されることが明らかとなっている[9]。

近年、IFN $\tau$ がごく少量、母牛の末梢血中に混入し、末梢血単核球のインターフェロン誘導性遺伝子15(interferon stimulated gene 15: ISG15)の遺伝子発現を上昇させることが明らかとなっている[8]。我々は人工授精または胚移植後、正常に発情回帰する不受胎牛の妊娠認

識時期の末梢血中単核球を採取し、ISG15の遺伝子発現を調べたところ、妊娠牛と比較して有意に低い値であるとともに、人工授精・胚移植を実施していない未処置対照群と同等の発現量であることを報告している[7]。

以上のことから、前述のように胚移植後、非妊娠牛の約60%は正常な周期で発情回帰をしますが、これらの不受胎牛では既に妊娠認識の時期に胚はIFN $\tau$ を分泌する能力を失っている、すなわち生存性が失われていることが推測できる。すなわち、胚移植における胚死滅は移植直後(発情後7日)からIFN $\tau$ 分泌が顕著となる16日の間に生じると考えられる。さらに、我々は発情後7日に胚移植し、6日後に再回収することにより、胚の生存性を確認したところ、胚移植を行った12頭のうち、生存胚を回収できたのは5頭(42%)であり、残りの7頭からは生存胚回収は出来なかった(未発表データ)。このことから胚移植の場合、移植後かなり早期に胚死滅が発生していることがうかがえる。

この胚死滅にとっての「危険区間」をバイパスすることで受胎率の向上が達成できるのではないかと我々は考えた。前述のようにウシ胚は子宮に到達後、しばらく着床せずに子宮腔内で成長する。その際に胚は球形、楕円体から紐状へと著しく伸長する[2]。我々はこの伸長期の胚(伸長期胚)を利用することで胚死滅多発時期のバイパスが可能であるのではと発想した。

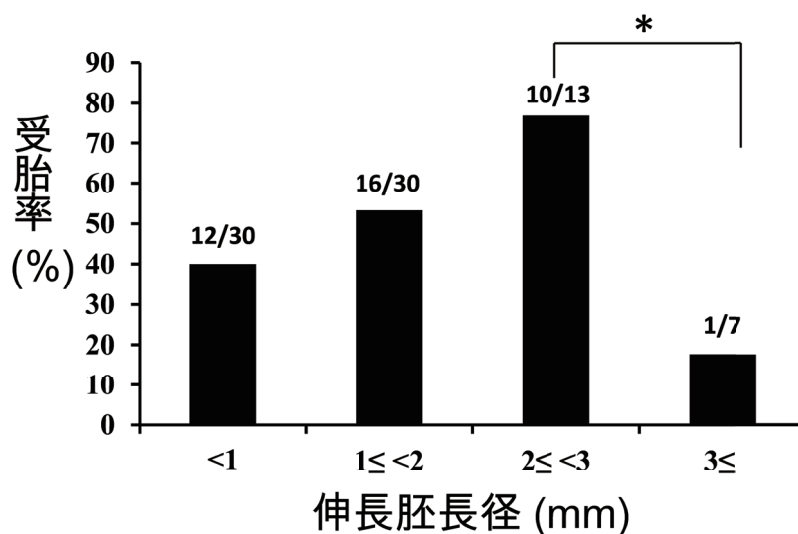


図2 伸長胚移植における胚長径と移植後の受胎率の関係  
図内の数値は妊娠頭数/移植頭数を表す。  
\*: 区間で有意差有り (p<0.05)

Day13-14の伸長期胚は目視できるほど大きい(長径数ミリ)。これは従来の胚盤胞期胚(直径約120 $\mu$ m)を想定した移植法が適応できない可能性を示している。これまでに伸長期胚移植を外科的に移植した例は見られるが[2]、非外科的移植についての報告は見られない。そこで我々はまず伸長期胚を非外科的に移植する方法の開発に取り組んだ[6]。

最初に従来のday 7胚を用いた移植手法に準じて伸長期胚移植を実施した。その結果、3mm以内では胚長径が増加するほど受胎率は上昇したが、3mm以上では受胎率は低下し(図2)、胚長径が大きくなると従来の移植器具が使用出来ないことが示された。この原因として大きな

伸長期胚は移植の際、物理的損傷を受けていると仮定し、胚が損傷を受けにくくするために、改良型シース(図3)または採卵時に用いるバルーンカテーテルを用いた移植により受胎が得られるか検討した。表1に示したように改良型シースを用いた移植法でもバルーンカテーテルを用いた移植法でも40%以上の受胎率が得られたが、従来の移植器具を使用した場合には受胎例が見られなかった。以上のように伸長期胚の非外科的移植が可能となった。

次にこの手法を用いて低受胎傾向の牛(3回の移植で受胎しなかった牛)への伸長期胚移植を試みた。先述のように、一般の胚移植においては図1に示すように、不受胎牛の約60%が正

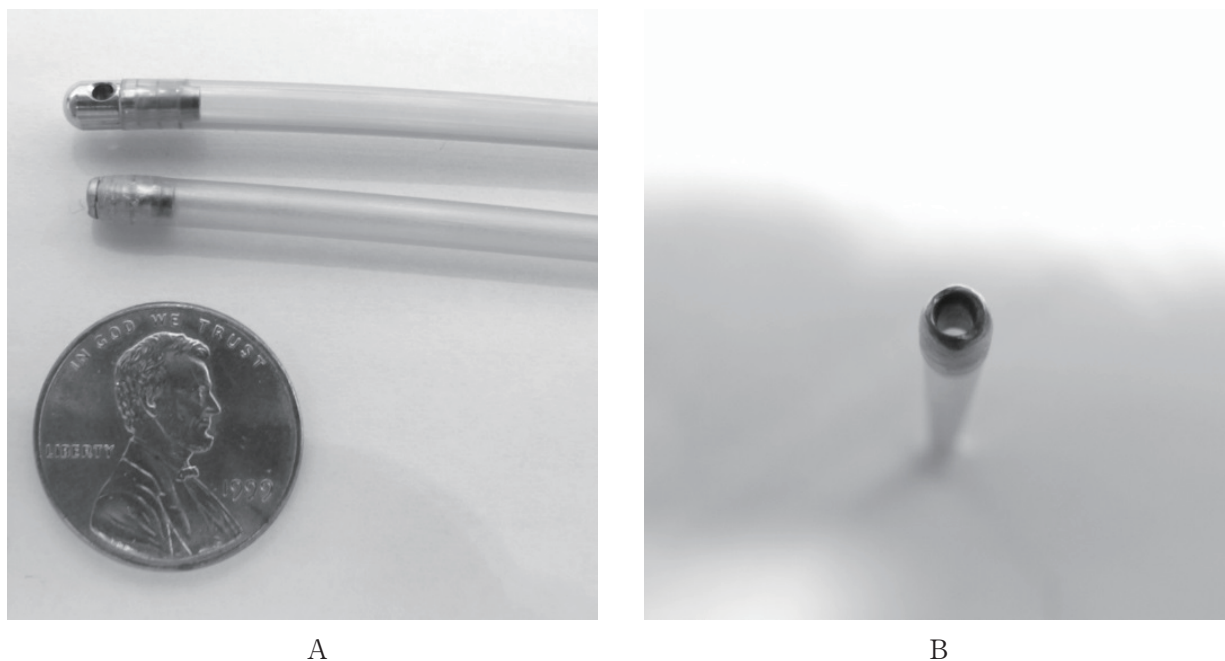


図3 伸長期胚移植用に改良した移植用シース管  
A:先端部を横から見たもの、B:先端部を上から見たもの  
従来の移植に供されるシース管を横穴部で切断して作製した。切断面は胚に損傷を与えないように研磨してある。

表1 各移植器具による伸長期胚移植後の受胎率

移植法	移植頭数	妊娠頭数 (%)	移植伸長期胚長径 (mm $\pm$ SEM)
改良型シース	29	13 (44.8)a	18.9 $\pm$ 2.5
バルーンカテーテル	25	12 (48.0)a	13.5 $\pm$ 1.8
従来の移植法	11	0 (0)b	11.3 $\pm$ 1.4

a, b: 異符号間で有意差有り (p<0.05)

常周期で発情回帰を示していたが、伸長胚移植に置いて正常周期内で発情を回帰する牛は約30%まで減少した(図4)。さらに、表2に示すように、3回以上の人工授精や胚移植で妊娠しない牛(低受胎傾向牛)に伸長胚移植を実施しても受胎率の向上は見られなかった。以上の結果から、一般的な胚移植において胚死滅が多発する時期をバイパスするためにIFN $\tau$ を分泌し、生存性の高い伸長胚を移植しても、最終的な受胎率は改善されないことが明らかとなった。また、伸長胚移植においては正常周期内で発情を回帰する不受胎牛は半減するが、高い受胎率が得られていないことから、妊娠認識時期を生き残ったとしてもその後胚は死滅することを示しており、胚側要因よりも母体側要因、すなわち子宮内の環境が受胎性に大きく関与していることがうかがえる。

**【受胎性の低い牛の子宮では何が生じているのか?】**

これまで述べてきたように、牛の受胎性には子宮内の環境が大きく影響を及ぼしていることは明らかであるが、受胎する牛と受胎しない牛の子宮がどのように違うのかについては定かでない。

近年、網羅的な遺伝子発現解析により、受胎性のある牛とこれが失われたウシの子宮内膜の違いについての報告がされている[11]が、その詳細は定かでない。我々はこれまでの研究を元に、以上の研究を元に、低受胎傾向牛の子宮環境は正常に受胎する牛とどのように異なるのかについて検討した。発情後7日の子宮内膜を採取し、その遺伝子発現をマイクロアレイにより網羅的に捉える手法により子宮環境を評価し

表2 低受胎傾向牛への伸長胚移植の受胎性への影響

移植の種類	受胎率 (%)	
	正常繁殖牛	低受胎傾向牛
従来の胚移植 (day 7)	47.4 (9/19)	5.6 (1/18)
伸長胚移植 (day 14)	54.5 (18/33)	2.4 (1/42)

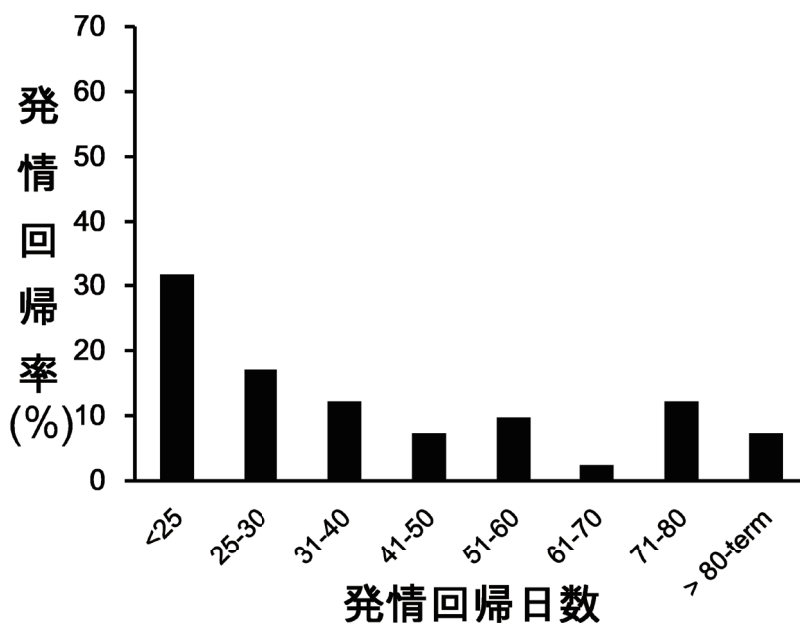


図4 伸長胚移植後の不受胎牛の発情回帰日数とその頻度

た。サンプルの精度を担保するために、正常受胎牛を、これまでの産次すべてで3回以内の人工授精や胚移植で妊娠し、バイオプシー後の次の発情周期で妊娠した牛と定義した。低受胎傾向牛は過去の妊娠のいずれもが3回以降の人工授精や胚移植で妊娠し、バイオプシー後も3周期で妊娠が成立しなかった牛と定義した。これらの子宮内膜サンプルの網羅的遺伝子発現解析を行った。低受胎傾向牛と正常妊娠牛の間で発現量が2倍以上変化する遺伝子は810確認できた。そのうち正常受胎牛で発現が上昇していた遺伝子数は97である一方、低受胎傾向牛で発現が上昇していた遺伝子は713個確認された。このことから低受胎傾向を示すウシの子宮内膜では多数の遺伝子が活性化していることから、何らかの機能の異常亢進が低受胎の要因であることが示唆された。現在、これらの遺伝子解析データを詳細に検討し、子宮機能回復手法の開発とともに受胎率向上、低受胎要因解明研究を実施中である。

#### 【参考文献】

1. Al-Katanani, Y. M., Drost, M., Monson, R. L., Rutledge, J. J., Krininger, C. E. 3rd., Block, J., Thatcher, W. W. and Hansen, P. J. 2002. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology*. 58 : 171-182.
2. Betteridge, K. J., Eaglesome, M. D., Randall, G. C. and Mitchell, D. 1980. Collection, description and transfer of embryos from cattle 10-16 days after oestrus. *J. Reprod. Fertil.* 59 : 205-216.
3. Dochi, O., Takahashi, K., Hirai, T., Hayakawa, H., Tanisawa, M., Yamamoto, Y. and Koyama, H. 2008. The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle. *Theriogenology*. 69 : 124-128.
4. Drost, M., Ambrose, J. D., Thatcher, M. J., Cantrell, C. K., Wolfsdorf, K. E., Hasler, J. F. and Thatcher, W. W. 1999. Conception rates after insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology*. 52 : 1161-1167.
5. Han, C. S., Mathialagan, N., Klemann, S. W. and Roberts, R. M. 1997. Molecular cloning of ovine and bovine type I interferon receptor subunits from uteri, and endometrial expression of messenger ribonucleic acid for ovine receptors during the estrous cycle and pregnancy. *Endocrinology*. 138 : 4757-4767.
6. Kimura, K. and Matsuyama, S. 2014. Successful nonsurgical transfer of bovine elongating conceptuses and its application to sexing. *J. Reprod. Dev.* 60 : 210-215.
7. Matsuyama, S., Kojima, T., Kato, S. and Kimura K. 2012. Relationship between quantity of IFNT estimated by IFN-stimulated gene expression in peripheral blood mononuclear cells and bovine embryonic mortality after AI or ET. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10 : 21.
8. Oliveira, J. F., Henkes, L. E., Ashley, R. L., Purcell, S. H., Smirnova, N. P., Veeramachaneni, D. N., Anthony, R. V. and Hansen, T. R. 2008. Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN-tau release from the uterine vein. *Endocrinology*. 149 : 1252-1259.
9. Plante, C., Hansen, P. J., Martinod, S., Siegenthaler, B., Thatcher, W. W., Pollard, J. W. and Leslie, M. V. 1989. Effect of intrauterine and intramuscular administration of recombinant bovine interferon alpha 1 on luteal lifespan in cattle. *J. Dairy Sci.* 72 : 1859-1865.
10. Roberts, R. M., Leaman, D. W. and Cross, J. C. 1992. Role of interferons in maternal recognition of pregnancy in ruminants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200 : 7-18.
11. Walker, C. G., Littlejohn, M. D., Mitchell, M. D., Roche, J. R. and Meier, S. 2012. Endometrial gene expression during early pregnancy differs between fertile and subfertile dairy cow strains. *Physiol. Genomics*. 18 : 47-58.

## Relationship between uterine function and establishment of pregnancy in cattle

Koji Kimura<sup>1)</sup>, Shuichi Matsuyama<sup>2)</sup>

1) Laboratory of Animal Reproductive Physiology, Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University

2) Institute of Livestock and Grassland Science, National Agriculture and Food Research Organization 768 Senbonmatsu, Nasushiobara, Tochigi 329-2793, Japan

Correspondence : Koji KIMURA (kimurak@okayama-u.ac.jp)

### [Abstract]

The low pregnancy rate of cattle became a big issue to be solved in livestock industry. We have been focusing on improvement of pregnancy rate after embryo transfer (ET) in cattle. Firstly, we investigated when the non-pregnant cows returned to estrus after ET. More than 70% of non-pregnant cows after ET showed estrus in normal estrus cycle length (>25 days). When the transferred embryos are alive in the period of maternal recognition of pregnancy (days 16-18), they can produce interferon-tau (IFN $\tau$ ), inhibit the secretion of PGF2 $\alpha$ , and delay the return to estrus. Taking together with these findings, we speculated that the conceptuses in the cows which returned to the estrus >25 days might die before day 16 and the critical period for embryo survival might be between day 7 to day 16. To bypass this critical period for embryo survival, we developed a non-surgical day 13-14 elongating conceptus transfer method and investigated whether this conceptus transfer could improve pregnancy rate of sub-fertile cows. Although the rate of non-pregnant cows which showed estrus within > 25 days decreased significantly (approximately 30%), the pregnancy rate was not improved. From these results, we considered that it was difficult to increase pregnancy rate by improving embryo viability and we shifted our target of research from the embryo to the uterine environment. Then we investigated the gene expression analysis of uterine endometria of sub-fertile and fertile cows using microarray. It was demonstrated that 713 genes were expressed higher in sub-fertile cows than fertile cows, whereas 97 genes expression were higher in fertile cows than sub-fertile cows. In endometria of sub-fertile cows, some functions might be activated.

**Key words:** Embryo transfer (ET), Elongating conceptus, Pregnancy loss, Uterine functions