

日本短角種における過剰排卵処理の反応性に関する研究

横尾 正樹*・村上 拓也・花倉 聡一

秋田県立大学 生物資源科学部 アグリビジネス学科
秋田県南秋田郡大湯村字南 2-2 〒010-0444

2016年4月23日受付, 2016年5月23日受理

要 約

本研究では、日本短角種における過剰排卵処理に対する低反応性の原因を明らかにすることを目的とした。黒毛和種経産牛3頭および日本短角種経産牛3頭に腔挿入プロジェステロン製剤を9日間留置し、挿入後7日目から卵胞刺激ホルモン (FSH) 製剤 (計 20AU) を3日間漸減投与することで卵胞発育を刺激した。卵胞発育は黒毛和種と日本短角種のいずれにおいても FSH 処理3日目から複数の卵胞が発育する様子が観察されたが、FSH 処理5日目の平均卵胞数は、黒毛和種 (8.8 ± 3.7 個) よりも日本短角種 (5.2 ± 2.0 個) の方が少ない傾向にあった ($P=0.05$)。一方、両品種間で血中 FSH 濃度の推移に有意差は認められなかった。また、食肉処理場由来の卵巣から採取した前卵胞 (二次卵胞) および卵丘-卵子複合体で発現する FSH 受容体 mRNA 発現を調査したところ、いずれも黒毛和種と比較すると日本短角種で有意に発現量が低いことが明らかとなった ($P<0.05$)。以上の結果から、日本短角種における過剰排卵処理に対する反応性は黒毛和種と比較して低いことが確認され、その原因として、卵巣内卵胞における FSH 受容体発現量の低下が関係している可能性が示された。

キーワード: FSH, FSH 受容体, 過剰排卵処理, 日本短角種, 卵胞発育,

東北畜産学会報 66(1): 33 ~39 2016

緒 言

日本短角種は東北地方北部原産の肉専用種である。現在は、岩手県を中心に、青森県、秋田県、北海道などで飼養されている。粗飼料の利用性に優れていることから、輸入飼料に依存しない畜産体系を構築するためには適した品種であると言える。さらに、肉質は脂の少ない赤身肉を特徴としており、昨今の健康志向の高まりを背景に、日本短角種は再評価されている。

日本短角種の一般的な繁殖方法は、春から秋にかけて雌牛群の中に種雄牛を同時に放牧して自然交配させる「まき牛方式」が行われており、子牛生産の約7割が3月~4月に集中している。分娩時期の集約化は、生産者に

とって管理の省力化が可能になる反面、出荷時期が限定されるという経営上のデメリットも生じさせる。消費者ニーズに対応するためにも、このような季節生産方式を見直し、周年出荷体制を構築することが必要であると考えられる。その方策のひとつとして人工繁殖技術の導入が考えられている。特に、黒毛和種においても利用されている過剰排卵-胚移植技術は、近親交配の回避や遺伝形質の保存などの面から考えて、日本短角種生産においても有効であることが報告されている (中村ら, 2010)。

過剰排卵処理は品質の高い移植可能胚を多数得ることが目的である (Armstrong, 1993)。牛の過剰排卵処理では、卵胞刺激ホルモン (FSH) を1日2回、3~4日間連続投与して卵胞発育を刺激する漸減投与方法が主流であるが、肉用牛における FSH に対する卵巣の反応性は品種によって異なることが報告されている (Bruelら, 1991)。日本短角種においても、他の品種と比較すると過剰排卵処理に対する卵巣の反応性が乏しいことが指摘さ

* 連絡者: 横尾 正樹 (よこお まさき)
(秋田県立大学 生物資源科学部 アグリビジネス学科)
〒010-0444 秋田県南秋田郡大湯村字南 2-2
TEL & FAX: 0185-45-3911
E-mail: myokoo@akita-pu.ac.jp

れている（鈴木，1989）。しかし，日本短角種における研究例は少なく，その原因については未だ不明である。

そこで本研究では，日本短角種の過剰排卵処理に対する低反応性の原因を明らかにすることを目的として，日本短角種における過剰排卵処理後の卵巢動態，血中 FSH 濃度の変化および卵胞内 FSH 受容体 mRNA 発現を黒毛和種と比較調査した。

材料および方法

1. 供試牛

試験には秋田県立大学生物資源科学部附属フィールド教育研究センター牛舎内で飼養されている黒毛和種経産牛（3頭）および日本短角種経産牛（3頭）を供試した。試験開始時の平均月齢および体重は黒毛和種 45.7 ヶ月，660.0 kg，日本短角種 63.7 ヶ月，711.3 kg であった。なお，試験は秋田県立大学動物実験規定に基づいて実施した。

2. 過剰排卵処理

本研究で実施した過剰排卵処理のスケジュールは，中村ら（2010）の方法を参考に実施した（図1）。すなわち，膣挿入プロジェステロン製剤（PRID，あすか製薬）を膣

内に9日間留置し，PRID 挿入後7日目から FSH 製剤（アントリン R10，共立製薬）を 9:00 と 16:00 に3日間漸減投与した（初日 5 AU/5 AU，2日目 3 AU/3 AU，3日目 2 AU/2 AU；計 20 AU）。PRID 抜去日の 9:00 にプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ アナログ（エストラメイト，インターベット）を 3 mL 投与した。

3. 卵巢動態の観察

卵巢動態の観察には 5 MHz のリニアプローブを装着した超音波画像診断装置（HS-101V，富士平工業）を用いた。FSH 処置開始日から1日1回の間隔で，左右卵巢における卵胞発育を5日間観察した。観察は動画として記録し，左右の卵巢の胞状卵胞数（直径 5 mm 以上）を測定した。

4. 血中 FSH 濃度の測定

採血は頸静脈からヘパリンナトリウム加真空採血管を用いて，FSH 処理日から5日間行った。FSH 処理開始日は3時間おきに5回，2日目からは朝夕各1回採血した。採取後ただちに 4℃，3,000 rpm で15分間の遠心分離を行い，血漿を分離し，FSH 濃度測定まで -80℃ で凍結保存した。

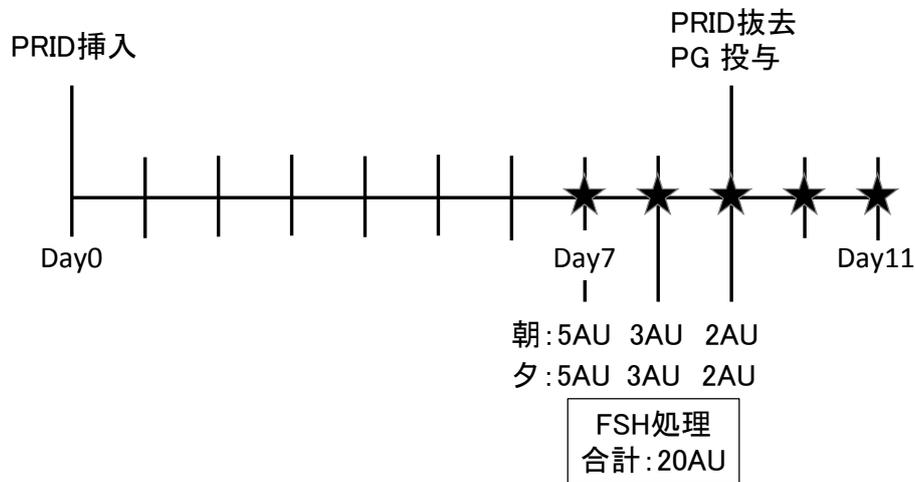


図1. 過剰排卵処理スケジュール

PRID：膣挿入プロジェステロン製剤，PG：プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ （エストラメイト），FSH：卵胞刺激ホルモン製剤（アントリン R10），★印は採血と卵巢動態の観察を行った日を示す。

表1. リアルタイム PCR で使用したプライマーおよびプローブ

遺伝子	プライマー / プローブ
FSH 受容体	Forward 5'-atgactcaggctaggggtca-3'
	Reverse 5'-tcaaatcctttggcatagctg-3'
	Probe 5'-ggcagaag-3' (Universal Probe #29)
GAPDH	Forward 5'-cacagtcaaggcagagaacg-3'
	Reverse 5'-ccacttgatgttggcaggat-3'
	Probe 5'-catcacca-3' (Universal Probe #9)

過剰排卵処理に用いた FSH はブタ下垂体由来であるため、血中のブタ FSH (pFSH) 濃度はユーロピウム標識 pFSH を使用した時間分解蛍光法で測定した (Kaneko ら, 2002; Nogchi ら, 2010)。すなわち、120,000 倍希釈したウサギ抗 pFSH 抗血清 (NATIONAL HORMONE and PEPTIDE PROGRAM) の固相化プレートに、FSH スタンダード (0, 0.15, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5 ng/ml) もしくは血漿サンプルを添加し、34℃で一晩反応させた。反応後、洗浄した各ウェルに5,000倍希釈したユーロピウム標識 pFSH (NATIONAL HORMONE and PEPTIDE PROGRAM) を添加し、34℃で6時間反応させた。反応後、洗浄した各ウェルに増感試薬を添加して室温で5分間反応させ、マイクロプレートリーダー (ARVO X4, PerkinElmer) を用いて各ウェルのユーロピウム濃度を測定した。なお、スタンダードとサンプルはすべて2ウェルずつ測定し、その平均値を測定値とした。

5. ウシ FSH 受容体 mRNA 発現の解析

屠場由来ウシ卵巣 (黒毛和種 6 個体: 平均月齢 27.2 ヶ月, 日本短角種 5 個体: 平均月齢 29.0 ヶ月) を用いてウシ FSH 受容体 mRNA の発現解析を行った。卵巣から前胞状卵胞 (直径 100 μ m 前後) または、卵巣表面の胞状卵胞から卵丘-卵子複合体を採取し、顆粒層細胞もしくは卵丘細胞の付着状態が類似したものを回収した。それぞれ 20 個ずつプールして、RNeasy Micro kit (Qiagen) で全 RNA を抽出し、その後、QuantiTect Rev. Transcription kit (Qiagen) を用いて cDNA を合成した。

リアルタイム PCR には、LightCycler (Roche) を使用した。LightCycler TaqMan Master (Roche) に cDNA、プライマーおよびプローブ (Universal probe, Roche) を添加し、95℃、10 分間の熱変性後、95℃:10 秒、60℃:20 秒、72℃:1 秒の反応を 45 サイクル実施した。なお、FSH 受容体 mRNA の発現量は、GAPDH mRNA の発現量を内部標準として補正し、GAPDH mRNA に対する相対値として評価した。各遺伝子発現に使用したプライマーおよびプローブは表 1 に示した。

6. データ解析

異なる 2 群の平均値の解析には Student's t-test を用い、危険率 5% で有意と判定した。すべての解析は、GraphPad Prism (GraphPad Software, U.S.A.) を用いて行った。

結 果

1. 過剰排卵処理後の卵胞発育

黒毛和種と日本短角種のいずれにおいても FSH 処理 3 日目から複数の胞状卵胞が発育する様子が観察された (図 2)。FSH 処理 5 日目における 1 卵巣あたりの平均胞状卵胞数は、黒毛和種で 8.8 ± 3.7 個、日本短角種で 5.2 ± 2.0 個となり、有意差は認められないものの、過剰排卵処理後に発育する胞状卵胞数は日本短角種の方が少ない傾向にあった (図 3, $P=0.05$)。

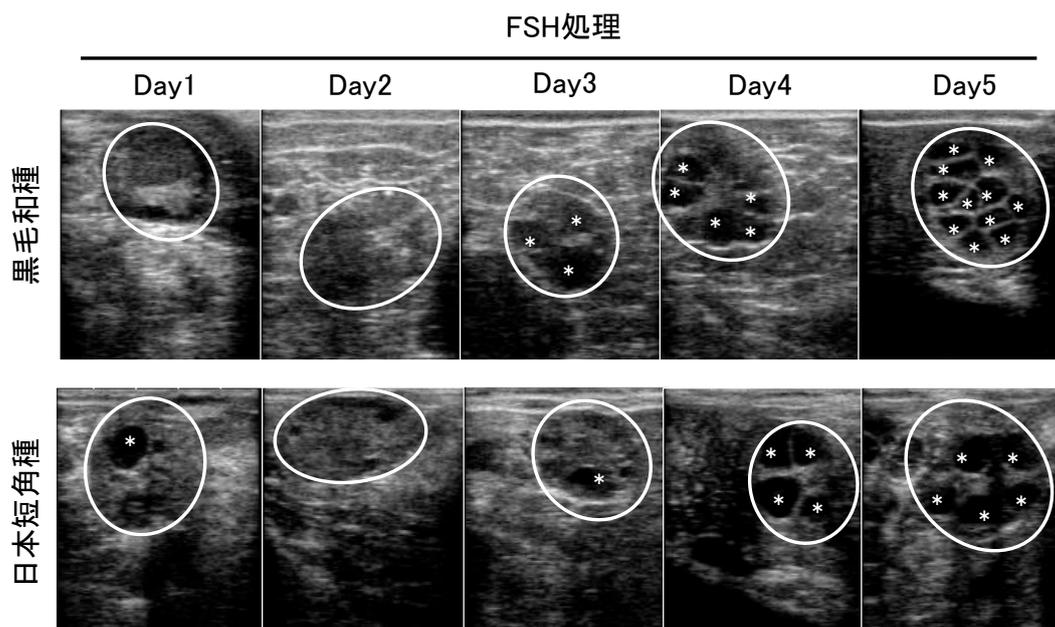


図 2. FSH 処理後の卵胞発育

丸枠は卵巣の位置、アスタリスク (*) は胞状卵胞を示す。

2. 血中 FSH 濃度の推移

過剰排卵処理後の血中 FSH 濃度の変化を図 4 に示した。FSH 初回投与後から 10 時間程度で最高値に達し、その後減衰していく様子が観察された。黒毛和種と日本短角種で血中 FSH 濃度の推移に大きな違いは認められなかった。

3. 前胞状卵胞および卵丘 - 卵子複合体における FSH 受容体 mRNA 発現

日本短角種卵巣内の前胞状卵胞で発現している FSH 受容体 mRNA は、黒毛和種における発現量を 1.00 とすると、 0.19 ± 0.03 であった。また、卵丘 - 卵子複合体で発現する FSH 受容体 mRNA は、黒毛和種における発現量を 1.00 とすると、 0.40 ± 0.09 であった。いずれも黒毛和

種と比較して、日本短角種で有意に低いことが示された (図 5, $P < 0.05$)。

考 察

現在までに過剰排卵 - 胚移植技術は様々な品種の人工繁殖に用いられているが、日本短角種の生産拡大においても過剰排卵 - 胚移植技術の有効性が示唆されている (中村ら, 2010)。しかし、日本短角種は過剰排卵処理に対する反応性が低いことが課題となっている。そこで本研究では、日本短角種における過剰排卵処理に対する低反応性の原因を明らかにすることを目的とした。

はじめに、過剰排卵処理後の日本短角種の卵胞発育を黒毛和種と比較した。中村ら (2010) は、日本短角種は黒毛和種よりも体格が大きいことから、日本短角種の過剰排卵処理では黒毛和種よりも FSH の投与量を多く設定している。しかし本研究では、黒毛和種の FSH 反応性と比較調査するため、黒毛和種の過剰排卵処理で行われているプロトコル (計 20AU の漸減投与方法) を日本短角種にも採用した。その結果、日本短角種では発育する卵胞数が黒毛和種と比較して少ない傾向が観察され、これまでに報告されているように、日本短角種では過剰排卵処理に対する反応性が低いことが確認された。

日本短角種の過剰排卵処理において発育卵胞数が少なかった要因として、本研究で供試した日本短角種が黒毛和種と比較して体重差が大きかったため、投与した FSH 量の不足が原因で発育卵胞数に差が生じた可能性が考えられる。そこで、日本短角種における FSH 投与後の血中 FSH 濃度の推移を調査したところ、FSH 初回投与後約 10 時間で最高値に達し、その後徐々に減少することが観察

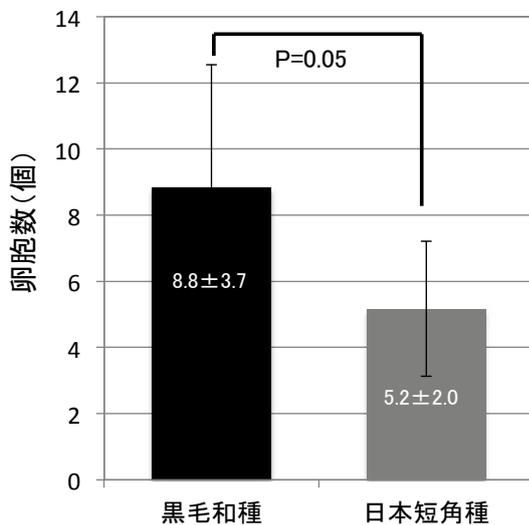


図 3. 卵巣 1 個あたりの胞状卵胞数 (FSH 処理 5 日目)

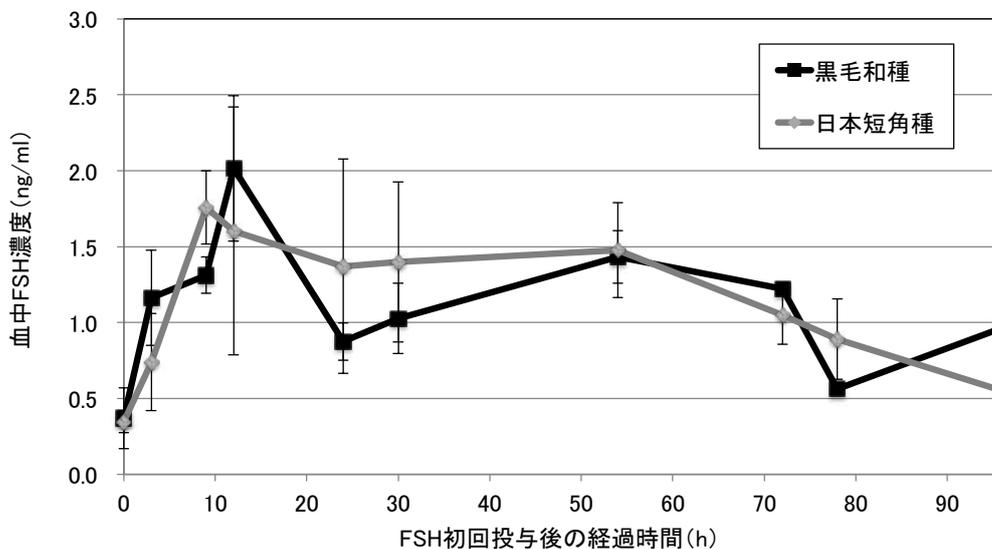


図 4. 血中 FSH 濃度の推移 エラーバーは標準偏差を示す。

された。この血中 FSH 濃度の推移は、黒毛和種における血中 FSH 濃度の推移と有意差はなく、これまでに報告されている黒毛和種の FSH 漸減投与後の血中 FSH 濃度や推移ともほぼ一致していた (Hiraizumi ら, 2015)。これらの結果から、日本短角種では、過剰排卵処理によって血中 FSH 濃度は黒毛和種と同程度まで上昇するにもかかわらず、卵胞発育の増加に至らなかったことが示された。

卵巣内の卵胞は、二次卵胞になると顆粒層細胞に FSH 受容体を発現させ、FSH 依存型の卵胞発育を示すようになる。過剰排卵処理では、FSH 受容体が発現した卵胞に外因性の FSH が作用することで卵胞発育が促進される。一方、顆粒層細胞における FSH 受容体発現が低い場合には、エストロジオール合成が不十分になり、卵胞発育が継続しないことも報告されている (Fauser and Van Heusden, 1997)。そこで、日本短角種における過剰排卵処理において発育卵胞数が少なかった要因として、顆粒層細胞における FSH 受容体発現量に関係があると考え、食肉処理場由来卵巣から採取した前胞状卵胞 (二次卵胞) および卵丘-卵子複合体を用いて FSH 受容体 mRNA の発現量を調査した。その結果、FSH 受容体 mRNA の発現量は、前胞状卵胞と卵丘-卵子複合体のいずれにおいても、日本短角種は黒毛和種よりも有意に低いことが明らかとなった。本研究では、解析に使用した前胞状卵胞における顆粒層細胞数、卵丘-卵子複合体における卵丘細胞数を統一することはできなかったが、顆粒層細胞ま

たは卵丘細胞の付着状態が形態的に類似したものを解析に使用したことから、細胞数の差異は試験結果に影響が少なかったと考えられる。また、解析に使用した前胞状卵胞および卵丘-卵子複合体に含まれる細胞の種類や特性が均一ではなかったという可能性もあるが、少なくとも卵胞もしくは卵丘-卵子複合体単位での解析においては、日本短角種の FSH 受容体 mRNA の発現量は黒毛和種よりも低いことが示された。以上のことから、日本短角種における過剰排卵処理に対する反応性が低い原因は、卵胞における FSH 受容体発現が低いことと関連していることが示唆された。

本研究では、日本短角種における過剰排卵処理に対する低反応性の原因について調査し、卵胞で発現する FSH 受容体の低発現と関係することが示唆された。通常、日本短角種における過剰排卵処理では、黒毛和種よりも FSH 投与量を二倍程度増加して行われているが、本研究の結果を受けて、今後は FSH に依存しない過剰排卵処理について検討する必要も考えられる。最近、卵胞における FSH 受容体発現が低下し、FSH 反応性が低下したマウスに対して、C-type natriuretic peptide を FSH の代わりに利用することで、卵胞発育を促進できることが報告された (Sato ら, 2012)。この新しい方法が牛の過剰排卵処理として有効であるかは、今後の研究成果を待つ必要があるが、FSH 反応性の低い日本短角種における新しい卵胞発育促進法としても期待される。

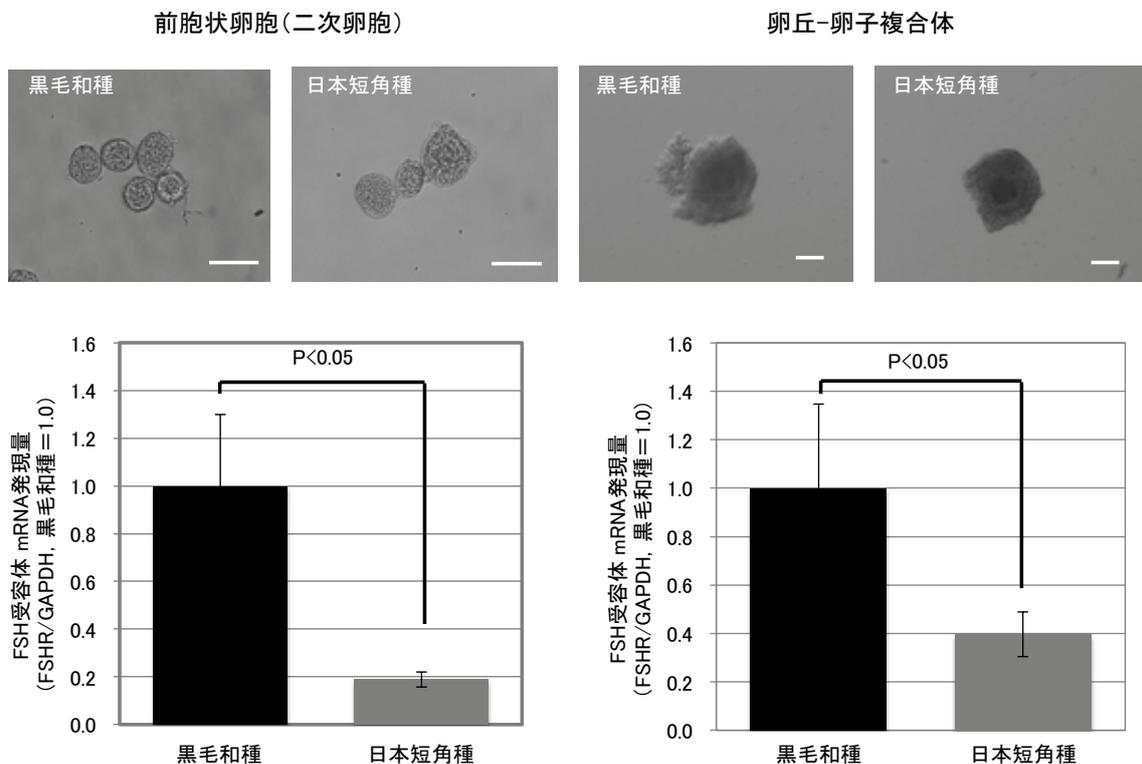


図5. ウシ FSH 受容体 mRNA 発現の比較

スケールバー = 100 μ m

また、日本短角種に限らず、高齢牛は若齢牛と比較して過剰排卵処理におけるFSH反応性が低いことが報告されている(小西と鈴木, 1994; Malhiら, 2006)。黒毛和種の供卵牛では、遺伝的に優れた能力を有する個体を選抜して使用するため、産次の進んだ高齢牛が使用されることが多い。したがって、日本短角種は黒毛和種のFSH反応性の低い個体の研究モデルとしても利用できる可能性がある。今後、日本短角種における過剰排卵処理の反応性を改善するための研究は、日本短角種の生産拡大に貢献するだけでなく、将来的には、高齢などの理由で過剰排卵処理ができない黒毛和種供卵牛における過剰排卵-胚移植技術の向上にも繋がると考えられる。

本研究ではまだ供試頭数が少ないため、今後例数を増やしさらに検討を重ねる必要があるが、日本短角種の繁殖生理特性の一端を明らかにすることができた。日本短角種は、粗飼料主体の飼養管理が可能であり、輸入飼料に依存しない畜産体系を構築するには最も適した和牛である。近年、日本短角種の飼養頭数は減少傾向にあるが、東北地方の貴重な遺伝資源であり、その生産拡大のためには人工繁殖技術の導入も必要であると考えられる。元来、自然交配によって増殖されてきた日本短角種の繁殖生理については不明な点も多い。今後、人工繁殖による日本短角種の生産拡大を図るためにも、日本短角種の繁殖生理特性をさらに明らかにしていくことが重要であると考えられる。

謝 辞

本研究の遂行に際し、牛の過剰排卵処理について、秋田県畜産試験場 西宮 弘氏(現;秋田県北部家保)、高橋利清氏(現;秋田県畜産振興課)に技術指導など多大なるご協力をいただいた。本研究で使用したブタFSHおよび抗血清は、NATIONAL HORMONE and PEPTIDE PROGRAMのA.F. Parlow博士より提供いただいた。また、牛卵巣採取については、秋田県食肉流通公社ならびに秋田市食肉衛生検査所の関係各位に多大なるご協力をいただいた。また、供試動物の飼養管理に多大なるご協力をいただいた秋田県立大学生物資源科学部フィールド教育研究センターの関係各位に深謝する。

引用文献

Armstrong DT. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*, 39 : 7-24. 1993.
Bruel KF, Baker RD, Butcher RL, Townsend EC, Inskeep EK, Dailey RA, Lerner SP. Effect of breed, age

of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows. *Theriogenology*. 36: 241-255.1991.

Fausser BCJM, Van Heusden AM. Manipulation of Human Ovarian Function: Physiological Concepts and Clinical Consequences. *Endocrine Reviews*. 18: 71-106.1997.

Hirazumi S, Nishinomiya H, Oikawa T, Sakagami N, Sano F, Nishino O, Kurahara T, Nishimoto N, Ishiyama O, Hasegawa Y, Hashiyada. Superovulatory response in Japanese Black cows receiving a single subcutaneous porcine follicle-stimulating hormone treatment or six intramuscular treatments over three days. *Theriogenology*. 83: 466-473. 2015.

Kaneko H, Noguchi J, Kikuchi K, Todoroki J, Hasegawa Y. Alterations in peripheral concentrations of inhibin A in cattle studied using a time-resolved immunofluorometric assay: relationship with estradiol and follicle-stimulating hormone in various reproductive conditions. *Biology of Reproduction*, 67: 38-45. 2002.

Malhi PS, Adams GP, Pierson RA, Singh J. Bovine model of reproductive aging: Response to ovarian synchronization and superstimulation. *Theriogenology*. 66:1257-1266. 2006.

Noguchi M, Yoshioka K, Itoh S, Suzuki C, Arai S, Wada Y, Hasagawa Y, Kaneko H. Peripheral concentrations of inhibin A, ovarian steroids, and gonadotropins associated with follicular development throughout the estrous cycle of the sow. *Reproduction*. 139:153-61.2010.

Sato Y, Cheng Y, Kawamura K, Takae S, Hsueh AJW. C-type natriuretic peptide stimulates ovarian follicle development. *Molecular Endocrinology*, 26 : 1158-1166. 2012.

小西一之, 鈴木一男. 黒毛和種の卵胞刺激ホルモンを用いた過剰排卵処理に対する供胚牛の産次の影響. *Journal of Reproduction and Development*, 40 : j13-j17. 1994.

鈴木 修. 肉牛生産における受精卵移植の利用. *東北農業研究 別号*, 2 : 67-78. 1989.

中村雄気, 出田篤司, 大野喜雄, 浦川真実, 青柳敬人, 渡邊康一, 山口高弘. 日本短角牛の繁殖における過剰排卵-胚移植(MOET)の有効性. *日本胚移植学雑誌*, 32 : 121-125. 2010.

Abstract

A study on the superovulatory response to FSH in Japanese Shorthorn cows

Masaki Yokoo, Takuya Murakami and Soichi Hanakura

Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, Minamiakita-gun, Akita 010-0444, Japan.

Corresponding: Masaki Yokoo,
(Tel & Fax: +81-185-45-3911, E-mail: myokoo@akita-pu.ac.jp)

The present study aimed to clarify the cause of the low superovulatory response to Follicle stimulating hormone (FSH) in Japanese Shorthorn (JS) cows. The follicular development of JS cows ($n = 3$) and Japanese Black (JB) cows ($n = 3$) was induced with decreasing doses of porcine FSH (pFSH). Six injections of pFSH (total 20 AU) were given twice a day for three days starting on the seventh day after insertion of a progesterone-releasing intravaginal device. The number of follicles (≥ 5 mm diameter) in the ovary after five days of pFSH stimulation was investigated using an ultrasonic scanner. The average number of follicles in JS cows tended to be lower than in JB cows (5.2 ± 2.0 versus 8.8 ± 3.7 ; $P = 0.05$). However, there was no difference between JS and JB cows in the change of peripheral concentrations of pFSH. We next examined the expression of the FSH receptor mRNA in preantral follicles and cumulus-oocyte complexes from slaughterhouse ovaries using a quantitative real-time PCR. The levels of the FSH receptor mRNA in both preantral follicles and cumulus-oocyte complexes from the JS ovaries were significantly lower than those of JB cows ($P < 0.05$). These results indicated that the superovulatory response to FSH in JS cows was lower than JB cows and suggested that their low superovulatory response in was related to the low expression of FSH receptor genes in the follicles.

Keywords : FSH, FSH receptor, Japanese Shorthorn cows, superovulation, superovulatory response