

牛における卵胞機能障害の病態解明と新規体外発育培養系への応用

坂口 謙一郎 (岐阜大学 応用生物科学部)

sakaguchi.kenichiro.x3@f.gifu-u.ac.jp

発育途上の卵胞や卵子を体外で発育させる技術である体外発育培養 (*In vitro growth*; IVG) は、生殖補助医療への応用や実験モデルとしての利用などの多面的な貢献が期待されている (図 1)。我々は、牛の IVG 系を用いて、牛の繁殖性に影響を及ぼす卵胞数の個体差、暑熱ストレス、代謝が、卵子が発育する場である卵胞の機能に与える影響を明らかにするとともに、得られた知見をもとに牛卵胞の体外発育培養系を改良してきた。その結果、初期胞状卵胞由来卵子の体外受精における胚盤胞率を大きく向上するとともに、体外発育二次卵胞の減数分裂再開を実現した。

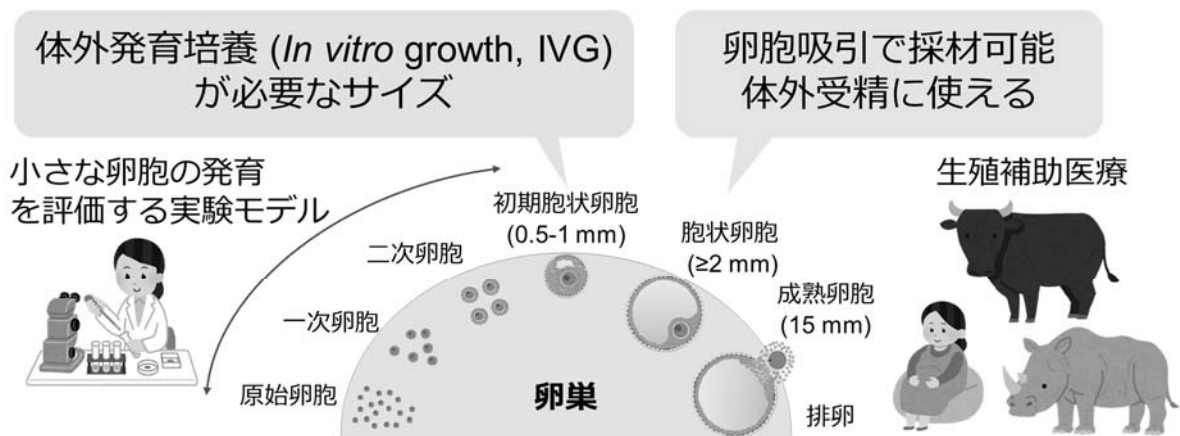


図1. 卵胞の発育段階と卵胞内卵子の利用

はじめに

わが国の乳牛は、乳量の増加に特化した遺伝的改良および飼養管理により飛躍的に乳量を増加させてきたが、それと相反するように、人工授精受胎率や分娩間隔といった繁殖成績は低下してきた。生産寿命を重視した育種改良や飼養管理の改善などにより、今日において繁殖成績は下げ止まりの状態にあるが依然として低く、何がどのようにして繁殖性を低下させるかについて、より深く研究を行う必要がある。卵胞は、卵子が胚発生能を獲得するとともに、発情の発現に必要な性ステロイドホルモンを産生する場である。これまで、繁殖成績を低下させる種々の因子が卵胞機能に及ぼす影響について、生体および体外培養系を用いて多くの研究がなされてきた。しかし、そのほとんどは超音波検査装置により観察可能で、注射針による吸引での採材が容易かつ、回収した卵子を直接体外受精系に使用可能な直径 2 mm 以上の胞状卵胞が対象であり^{1,2)}、それより小さな大きさの卵胞の機能と繁殖性の関係については不明であった。出生時の子牛の卵巣内には、約 12 万個程度の原始卵胞が存在するが、実際に排卵まで至るものは、ごく僅かである。閉鎖・退行する運命にある発育途上の卵胞や卵子を体外で発育させる技術である体外発育培養 (*In*

vitro growth; IVG) は、生殖補助医療への応用や実験モデルとしての利用などの多面的な貢献が期待されている³⁾。一方、牛では、初期胞状卵胞期より早期の段階の卵胞からは IVG を用いて受精可能な成熟卵さえも作出されていない^{4,5)}。我々は、発生能を獲得する前の 1 mm 未満の初期胞状卵胞由来卵子および二次卵胞と原始卵胞の IVG 系を用いて、卵胞数の個体差、暑熱ストレス、代謝といった牛の繁殖性に影響を及ぼす因子の卵胞機能への影響を幅広い発育段階において明らかにするとともに、得られた示唆から培養系を改善することを目的として一連の研究を行った。

胞状卵胞数の個体差が卵胞発育に及ぼす影響

牛や人において、卵巣内の胞状卵胞数は原始卵胞数（卵巣予備能）と相関し、生殖能力の指標となることが知られている。胞状卵胞数が少ない牛の受胎性は低くなるが、その機序は不明であった。我々は、胞状卵胞数と個別の卵胞の機能の関係を調べ、胞状卵胞数が少ない牛の卵胞では、卵子の発育・成熟に必須な性ステロイドホルモンであるエストラジオール-17 β (E₂) の産生量および卵子の核成熟能が低いことを明らかにした⁶⁾。次いで、生体の牛を用いて、胞状卵胞数が少ない牛における E₂ 産生能低下の要因は、E₂ 産生を促進する働きを持つ卵胞刺激ホルモンへの応答性の低下であることを明らかにした⁷⁾。また、卵巣内の大型卵胞と黄体の存在により、E₂ 産生量と卵子成熟能が影響を受けることも明らかにした⁸⁾。これらの結果から、卵巣内における胞状卵胞数および大型卵胞と黄体の存在が初期胞状卵胞由来卵子の IVG における発育能の指標となることが示された。

暑熱ストレスが初期胞状卵胞内卵子の発育に及ぼす影響

乳牛は生乳生産およびそれを維持するためのエネルギー生産のための代謝熱が高いことから暑さに弱く、夏季の暑熱ストレスは受胎性や胚生産成績を低下させることが知られている。一方、その影響は秋においても継続することが知られていることから、体外受精に用いる直径 2 mm 以上の卵胞よりも小さな卵胞も障害を受けていると考えられていたが、その発生能低下のメカニズムは不明であった。我々は、1 mm 未満の初期胞状卵胞由来卵子の IVG 系を用いて、暑熱ストレスが初期胞状卵胞において卵子の抗酸化能を低下させることで、発生能が低下することを明らかにした⁹⁾。さらに、暑熱ストレスは培養下の初期胞状卵胞においてアミノ酸代謝¹⁰⁾ および抗酸化酵素の遺伝子発現¹¹⁾ を変化させることを明らかにした。また、この研究により得られた示唆により、IVG の温度設定を通常よりも低い 37.5°C とすることで、従来 (4-39%) よりも胚盤胞率が大きく向上した (61.9%)¹²⁾。

体外における原始卵胞および二次卵胞の代謝に関する研究

乳牛の繁殖性低下の主たる要因の一つは、乳量の増加により乳生産に必要なエネルギーが飼料から得られるエネルギーを上回ってしまう負のエネルギーバランスによる代謝異常であると考えられてきた。しかし、体内における原始卵胞・二次卵胞の代謝を解析することは現在の技術で

は不可能であり、これまでほとんど研究がなされてこなかった。応募者は、原始卵胞および二次卵胞の IVG 系を用いて、原始卵胞の活性化能および二次卵胞の発育能の指標となるアミノ酸とその代謝物を見出した¹³⁾。さらに、二次卵胞の培養液に生体内卵胞液に含まれるヒポキサンチンを添加することで、卵胞のエネルギー代謝が改善するとともに、卵子発育能が向上し、体外発育二次卵胞から第一成熟分裂中期の卵子を得た。

おわりに

これまでの研究により、卵胞数の個体差・暑熱・代謝の観点から、乳牛の繁殖性を低下させる卵胞機能障害の病態メカニズムの一端が明らかとなった。さらに、牛で産子生産が実現されている最小の発育段階である初期胞状卵胞に由来する卵子の IVG において、従来で最も高い胚盤胞率を達成するとともに、まだ産子が獲得されていない段階である二次卵胞由来卵子の IVG において、成熟分裂を再開させることに成功した。今後、さらなる培養系の改良を進めることで、子牛卵巣内の原始卵胞から IVG により生産した受精卵を移植し産子を得るまでの一連の技術を完成させ、生産効率の極めて高い新たな酪農畜産の未来を築くための技術基盤を確立する所存である (図2)。

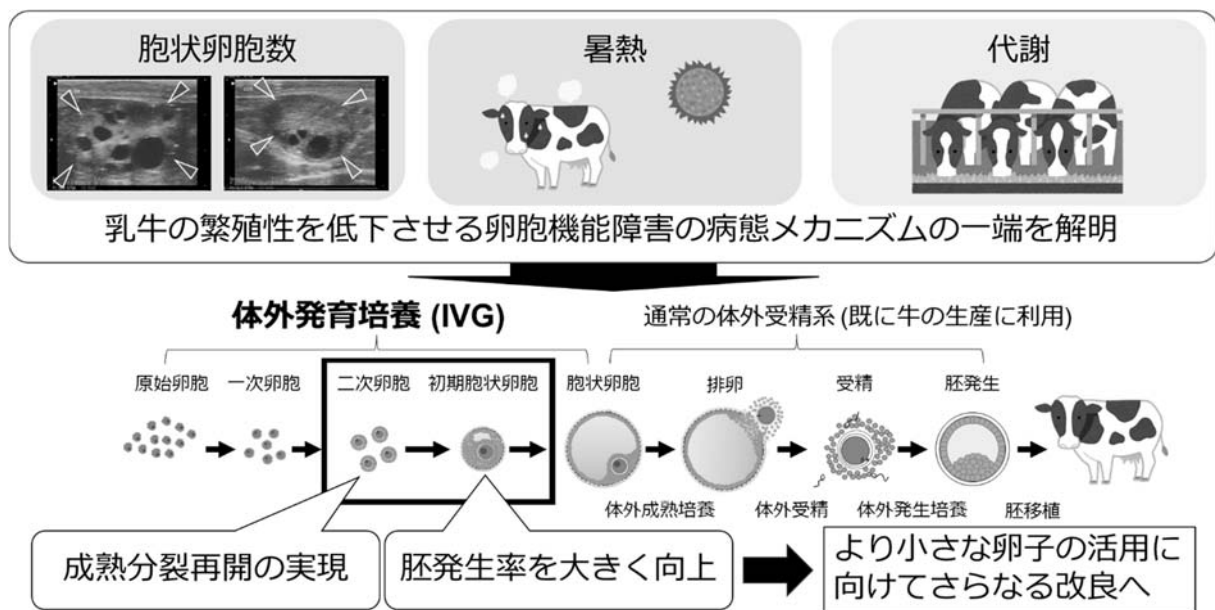


図2. 本研究の成果の概略

謝辞

本受賞にあたり、ご推薦を賜りました岐阜大学応用生物科学部長の西津貴久先生に厚く御礼申し上げます。本研究は、北海道大学大学院獣医学研究院、英国エジンバラ大学生物学部細胞生物学研究所および岐阜大学応用生物科学部にて行われました。本研究の遂行にあたり、多大なるご指導を賜りました永野昌志先生 (現・北里大学獣医学部)、片桐成二先生、柳川洋二郎先生および Evelyn E Telfer 先生に心より御礼申し上げます。また、共に暑熱ストレスに関する研究を進めてきた河野光平先生 (現・岡山大学学術研究院環境生命自然科学学域) をはじめ、研究室員・共同研究者・技術職員の皆様に深く感謝いたします。最後になりましたが、私の奔放な歩みを絶えず支えてくれる家族に、心より感謝いたします。

引用文献 (*: Corresponding author)

- 1) Sakaguchi K., Ideta A., Yanagawa Y., Nagano M., Katagiri S. and Konishi M.*: Journal of Reproduction and Development 64:451-5 (2018).
- 2) Sakaguchi K.* and Nagano M.: Theriogenology 150:122-9 (2020).
- 3) Sakaguchi K., Huang W., Yang Y., Yanagawa Y. and Nagano M.*: Theriogenology 97:113-23 (2017).
- 4) Sakaguchi K.*: Animals 14:1355 (2024).
- 5) Sakaguchi K.*: Journal of Reproduction and Development 71:1-9 (2025).
- 6) Sakaguchi K., Tanida T., Abdel-Ghani M.A., Kanno C., Yanagawa Y., Katagiri S. and Nagano M.*: Journal of Reproduction and Development 64:503-10 (2018).
- 7) Sakaguchi K., Yanagawa Y., Yoshioka K., Suda T., Katagiri S. and Nagano M.*: Reproductive Biology and Endocrinology 17:88 (2019).
- 8) Sakaguchi K., Kawano K., Yanagawa Y., Katagiri S. and Nagano M.*: Japanese Journal of Veterinary Research 70:45-56 (2022).
- 9) Kawano K., Sakaguchi K.*, Chelenga M., Ninpetch N., Kobayashi S., Furukawa E., Yanagawa Y. and Katagiri S.*: Scientific Reports 12:8857 (2022).
- 10) Kawano K., Sakaguchi K.*, Ninpetch N., Yanagawa Y. and Katagiri S.: Journal of Reproduction and Development 70:184-191 (2024).
- 11) Kawano K., Sakaguchi K.*, Furukawa E., Ninpetch N., Yanagawa Y. and Katagiri S.: Journal of Veterinary Medical Science 87:680-684 (2025).
- 12) Kawano K., Sakaguchi K.*, Yanagawa Y. and Katagiri S.: Theriogenology 238:117371 (2025).
- 13) Sakaguchi K.*, Kawano K., Otani Y., Yanagawa Y., Katagiri S. and Telfer E.E.*: Animals 13:1141 (2023).