

## 酪農・豆知識 第 115 号

## 最新・牛の妊娠診断法

## 1.はじめに

酪農豆知識第 112 号の「牛のファストバック法®」でも、妊娠診断法を概説していますが、新しい知見も加えて、早期妊娠診断法について改めて述べてみたいと思います。胚の生存性を的確に把握することは、牛の繁殖性向上のためにも重要な手技ですが、意外にも研究的には多くはありません。

## 2.胚の死滅時期

受精後 5～6 日目までの胚死滅は約 10%ありますが、この原因の多くは卵子の遺伝子異常、受精時期の失敗による不受精、異常分割や単為発生などにあります。その後 24 日目までの胚死滅は約

70%と最も多く、その原因多くは、子宮内環境が胚発生の正常に進行するための準備がなされていないことにあります。42 日

目までは後期胚死滅は 15%と低くなり、この原因の多くは、胎子の形態形成や胎盤形成の不具合があげられます。その後の胎子死は 5%となり、胎子臓器の機能不全や胎盤機能異常などがあります。

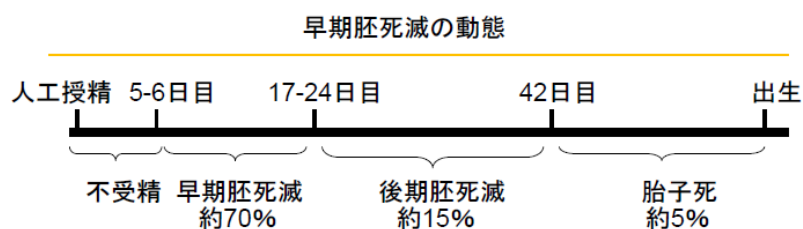
このように胚死滅を招く主な原因は、受精後の日数によって刻一刻と変化していくことが興味深い点です。

## 3.超早期妊娠診断法

いかに早く胚の生存性を判断できるかは、牛の繁殖管理や繁殖障害防除の知見を得るためにも非常に重要です。従来の妊娠診断法であるノンリターン法、胎膜触診反応や超音波診断法とは異なる、あらたな技術開発の現状について述べます。

## a)早期妊娠因子

早期妊娠因子 (early pregnancy factor: EPF) とは妊娠動物に認められる母体とは異質の胎子抗原因子とされ、受精後 1~2 日以降に血中で証明され、母体からの攻撃に対する防御、着床や発育の促進に関与するとされています。最も早い時期に血中に出現する妊娠関連因子であるため早期妊娠診断に利用することができます。早期妊娠因子の測定はリンパ



球と羊赤血球の凝集によりできるロゼットの抑制率を調べるロゼット抑制試験によって行われますが、測定系が複雑で解析の準備が大変なため、一般化されてはいません。

### b) 妊娠関連糖たんぱく質 (pregnancy associated glycoproteins: PAGs) の測定

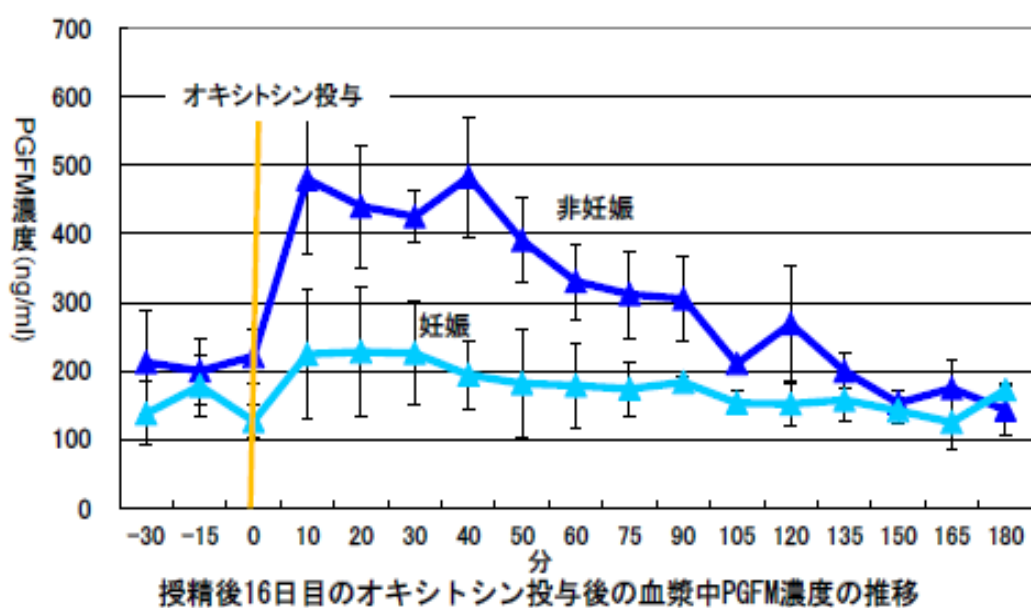
妊娠関連糖たんぱく質は妊娠胎盤から特異的に分泌されるアスパラギン酸プロテアーゼの一種で、胎盤で産生され血液中に分泌されます。遺伝子発現は妊娠 26 日目に認められ、分娩時に最高値を示します。血液や乳汁の酵素免疫測定法により、妊娠 28 日目以降に診断が可能となります。この糖たんぱく質は分娩後も約 60 日目まで残るので、余り早い時期の妊娠診断には注意が必要です。

### c) ISG15 (interferon stimulated gene 15) の遺伝子発現測定

胚の絨毛膜からは妊娠 16 日目に妊娠認識物質であるインターフェロン $\gamma$ を分泌して、妊娠の継続を母体に働きかけます。このインターフェロン $\gamma$ が分泌されないと、母体は妊娠していないものとして、黄体から黄体自身が退行するための初期因子であるオキシトシンを分泌します。子宮内膜はオキシトシンのシグナルを受け取り、プロスタグランジン F<sub>2 $\alpha$</sub> を合成し、その作用で、黄体が退行して次の発情をむかえる準備に入ります。この絨毛膜から発現するインターフェロン $\gamma$ は子宮内膜や末梢白血球などに働きかけて、ISG15 遺伝子の発現を誘導します。この末梢白血球の遺伝子応答をリアルタイム PCR などで測定することにより、胚の生存性である妊娠診断が可能となります。16 日目のインターフェロン $\gamma$ の刺激による遺伝子応答が安定するには、タイムラグが生じて、約 21 日目になると確実な判断が可能となります。

### d) オキシトシン負荷による血中プロスタグランジン代謝産物 (PGFM) の測定

牛の妊娠維持には、胚、子宮と卵巣における黄体の三位一体の相互関係が必須です。黄体と妊娠維持の関係は動物種によって大きく異なります。ヒトでは妊娠期間の前期 20%を



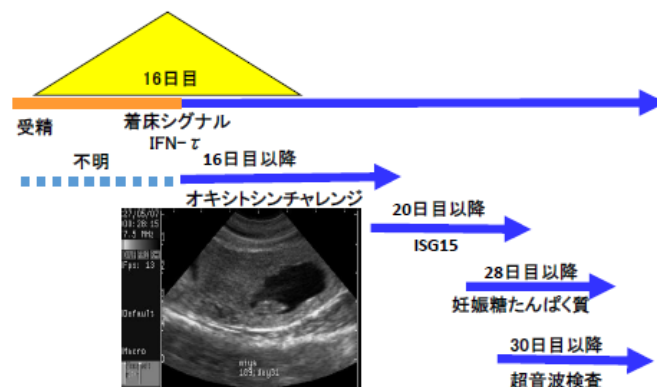
過ぎると黄体の代わりに胎盤がその機能を保持します。一方、ヤギやブタでは全妊娠期間に黄体の存在が必要とされます。ウシでは妊娠期間の前期 3/4 は黄体が必須ですが、後期 1/4 は必須ではありません。

このようなことから、牛では胚が黄体の維持に積極的に関与しているのではないかと考えられました。そこで、黄体を退行させる最初のシグナルであるホルモンのオキシトシンを投与して、プロスタグランジン F<sub>2α</sub>が誘導されたら胚の関与はない。逆に誘導されなかったら胚が関与しているとの仮説を持ち、黄体を退行させるほどの量ではないオキシトシンを血中に投与して、PGFM の産生量を妊娠経過日数ごとに、継時的に測定しました。プロスタグランジン F<sub>2α</sub>は代謝回転速度がきわめて速いので、その代謝産物である PGFM を測定しました。その結果、妊娠 16 日目には図に示しますように、妊娠していれば PGFM の産生が抑制されることが示されました。14 日目では胚の発達速度の違いにより、その反応はまちまちでした。10 日目では妊娠と非妊娠ともに PGFM 産生量が増加し、その反応性に違いはありませんでした。このことから、胚、子宮と黄体維持の相互関係は妊娠 16 日目で成立すること、その引き金はインターフェロン $\gamma$ であり、胚の生存性の判断が可能であるとの結論に達しました。

#### 4.まとめ

胚の生存性を直接的に判断できる手法の開発は、妊娠維持や不受胎となった要因の解析に極めて有効です。現状では妊娠 16 日目からは、図に示しますように胚生存性の動向がいくつかの手法を組み合わせることで解析できます。ただし、残念ながら 16 日目以前は、胚を回収しての判断にゆだねるしかありません。

また、胚の対外培養系も格段に進歩して、受精してから着床する 20 日目頃まで培養することが可能となりつつあります。今後はいくつかの手法を組み合わせた解析により、受胎しない原因説明が着実に進展していくものと期待されます。



牛胚の生存性確認のステップ

日産合成工業株式会社 学術・開発部

