

学 位 論 文 要 旨

氏名 小野 哲嗣

題 目：黒毛和種リピートブリーダー牛における受胎性向上に関する研究

論文要旨：

畜産業における雌家畜の繁殖障害（不妊症）は、畜産物の生産性を停滞させ農家経営の不安定を招く。近年、牛における不妊症の診断は、超音波画像診断、ホルモン測定等の普及により正確なものとなり、加えて人工授精(Artificial Insemination; AI) や胚移植 (Embryo Transfer; ET) などの技術進歩により、優秀な能力を持つ個体の保存、量産といった育種改良の観点も備わり、その治療実績は上がっている。同時に、*in vitro* における牛の内分泌機構や生殖器の細胞学的または形態学的な変化や機能といった繁殖生理の研究、解明も進んでいる。しかしながら、臨床的に診断や治療が困難な繁殖障害は存在し、生殖器においてもその機能や形態的变化機構が詳細に明らかにされている訳ではない。

牛のリピーターブリーダー(Repeat Breeder; RB)は、卵巣や子宮に異常を認めず正常な発情周期を営むにも関わらず3回以上のAIを試みても妊娠せず、その原因も不明とされる。RB牛の繁殖性を向上される方法としてETの応用が知られているが、その報告はホルスタイン種などの乳用牛が主であり黒毛和種肉用牛での報告は少ない。そこで、研究1では、黒毛和種RB牛へのET受胎率における産歴と季節の影響を評価した。ETは、RB牛と診断された155頭の未経産育成牛(2歳未満)及び172頭の経産牛(8歳未満)に実施し、その内、57頭に新鮮胚、270頭に凍結胚を移植した。新鮮胚移植牛群と凍結胚移植牛群の受胎率に差は認められず、育成牛群と経産牛群の間にも受胎率、流産率、死産率、正常分娩率において差は認められなかった。経産牛群の夏季(6~8月)において、春季(3~5月)、冬季(12~2月)に比べ受胎率が有意に低下した($P<0.05$)。一方で、育成牛群では季節間での受胎率に差は認められなかった。黒毛和種RB牛におけるET受胎率に使用する胚(新鮮胚・凍結胚)や産歴は影響しない事が示されたが、暑熱ストレスは、経産RB牛の繁殖性に影響する可能性が示唆された。

一方で、牛卵巣における卵胞形成や卵子発育過程は不明な点が多く、牛生体(*in vivo*)でのアプローチには限界がある。*in vitro* において牛卵丘-卵母細胞複合体(COCs)を三次元培養すると卵胞様形態(AFLS)を形成し発育する事が知られており、その技術確立は卵胞発育のメカニズムを知る上でのモデルとなる。研究2では、牛卵丘-卵母細胞複合体(COCs)のコラーゲンゲル包埋培養からの卵胞様形態(AFLSs)形成におけるジブチルcAMP(dbcAMP)とヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)の効果を評価した。COCs培養4日から8日目間のdbcAMP添加群のAFLSsの平均直径は、対照群に比べて、その添加濃度(0.5-2.0mM)に関係なく増加が認められた。hCG添加群の培養4日目のAFLSs直径は、無添加対照群に比べて、その添加濃度(1-100IU/mL)に関係なく低下する傾向が認められた。hCGを10IU/mL添加した群

(別紙様式第3号)

において、培養4日目の培養液中の抗ミュラー管ホルモン (AMH) 濃度の増加が認められたが、プロゲステロン (P4) 濃度やエストラジオール (E2) 濃度に差は認められなかった。dbcAMP や hCG 添加の有無に関わらず、培養終了後の AFLSs から採取したほぼ全ての卵母細胞の核に成熟分裂を認めた。本試験の結果から dbcAMP は AFLS の形成を促し、hCG は阻害する事が示唆された。さらに、hCG 添加による培養4日目までの AFLS 内の顆粒層細胞の黄体化は認められないと考えられた。

これら得られた結果は、ET が、黒毛和種 RB 牛の受胎性向上に貢献し、AI に代わる手法となる事が示され、さらに、牛 COCs を用いた3次元卵胞培養への 1.0mMdbc 添加培養は AFLS の形成を促進することが示された。今後この卵胞発育モデルを用いた RB 牛の原因追求が期待される。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	小野 哲 嗣
審 査 委 員	主 査： 山口大学 教授 高木 光博
	副 査： 山口大学 教授 山本 芳実
	副 査： 山口大学 教授 田浦 保穂
	副 査： 鹿児島大学 教授 大和 修
	副 査： 山口大学 准教授 谷口 雅康
題 目	黒毛和種リピートブリーダー牛における受胎性向上に関する研究

審査結果の要旨：

畜産業における雌家畜の繁殖障害（不妊症）は、畜産物の生産性を停滞させ農家経営の不安定を招く。近年、牛における不妊症の診断は、超音波画像診断、ホルモン測定等の普及により正確なものとなり、加えて人工授精(Artificial Insemination; AI) や胚移植 (Embryo Transfer; ET) などの技術進歩により、優秀な能力を持つ個体の保存、量産といった育種改良の観点も備わり、その治療実績は上がっている。同時に、*in vitro*における牛の内分泌機構や生殖器の細胞学的または形態学的な変化や機能といった繁殖生理の研究、解明も進んでいる。しかしながら、臨床的に診断や治療が困難な繁殖障害は存在し、生殖器においてもその機能や形態的変化機構が詳細に明らかにされている訳ではない。

牛のリピートブリーダー(Repeat Breeder; RB)は、卵巣や子宮に異常を認めず正常な発情周期を営むにも関わらず 3 回以上の AI を試みても妊娠せず、その原因も不明とされる。RB 牛の繁殖性を向上させる方法として ET の応用が知られているが、その報告はホルスタイン種などの乳用牛が主であり黒毛和種肉用牛での報告は少ない。そこで、研究 1 では、黒毛和種 RB 牛への ET 受胎率における産歴と季節の影響を評価した。ET は、RB 牛と診断された 155 頭の未経産育成牛（2 歳未満）及び 172 頭の経産牛（8 歳未満）に実施し、その内、57 頭に新鮮胚、270 頭に凍結胚を移植した。新鮮胚移植牛群と凍結胚移植牛群の受胎率に差は認められず、育成牛群と経産牛群の間にも受胎率、流産率、死産率、正常分娩率において差は認められなかった。経産牛群の夏季（6～8 月）において、春季（3～5 月）、冬季（12～2 月）に比べ受胎率が有意に低下した（ $P<0.05$ ）。一方で、育成牛群では季節間での受胎率に差は認められなかった。黒毛和種 RB 牛における ET 受胎率に使用する胚（新鮮胚・凍結胚）や産歴は影響しない

事が示されたが、暑熱ストレスは、経産 RB 牛の繁殖性に影響する可能性が示唆された。

一方で、牛卵巣における卵胞形成や卵子発育過程は不明な点が多く、牛生体 (*in vivo*) でのアプローチには限界がある。*in vitro*において牛卵丘-卵母細胞複合体 (COCs) を三次元培養すると卵胞様形態 (AFLSs) を形成し発育する事が知られており、その技術確立は卵胞発育のメカニズムを知る上でのモデルとなる。研究 2 では、COCs のコラーゲンゲル包埋培養からの AFLS 形成におけるジブチル cAMP (dbcAMP) とヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)の添加効果を評価した。COCs 培養 4 日から 8 日目間の dbcAMP 添加群の AFLSs の平均直径は、対照群に比べて、その添加濃度 (0.5-2.0mM) に関係なく増加が認められた。hCG 添加群の培養 4 日目の AFLSs 直径は、無添加対照群に比べて、その添加濃度 (1・100IU/mL) に関係なく低下する傾向が認められた。hCG を 10IU/mL 添加した群において、培養 4 日目の培養液中の抗ミュラー管ホルモン濃度の増加が認められたが、プロゲステロン濃度やエストラジオール濃度に差は認められなかった。dbcAMP や hCG 添加の有無に関わらず、培養終了後の AFLSs から採取したほぼ全ての卵母細胞の核に成熟分裂を認めた。本試験の結果から dbcAMP は AFLS の形成を促し、hCG は阻害する事が示唆された。さらに、hCG 添加による培養 4 日目までの AFLS 内の顆粒層細胞の黄体化は認められないと考えられた。

これら得られた結果は、ET が、黒毛和種 RB 牛の受胎性向上に貢献し、AI に代わる手法となる事が示され、さらに、牛 COCs を用いた 3 次元卵胞培養への 1.0mMdbc 添加培養は AFLSs の形成を促進することが示された。今後この卵胞発育モデルを用いた RB 牛の原因追求が大いに期待される。以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。