

平成23年度 成績概要書

研究課題コード： なし（職員研究奨励事業）

1. 研究成果

- 1) 研究成果名：ドナー牛の過剰排卵処理における卵巢反応性の予測技術
（予算課題名：黒毛和種牛における AMH と AMPA1 による受精卵の生産性推定（H23））
- 2) キーワード：AMH、AMPA1、過剰排卵、採卵
- 3) 成果の要約：血漿 AMH 濃度は過剰排卵処理後の回収卵数と相関し、卵巢反応性の予測に利用できる。また、血漿 AMH 濃度が高く AMPA1 遺伝子が GG 型のドナー牛は卵巢反応性が最も良く、これらを指標として受精卵の生産性の高いドナー牛を推定できる。これらの予測技術は、ドナー牛の選定による受精卵の生産効率の向上に利用できる。

2. 研究機関名

- 1) 担当機関・部・グループ・担当者名：畜試・基盤研究部・畜産工学 G・平山博樹

3. 研究期間：平成23年度（2011年度）

4. 研究概要

1) 研究の背景

ドナー牛の過剰排卵処理における卵巢反応性は個体差が大きく、一度に採取できる受精卵の数も0～50個程度と安定しない。そこで、受精卵の生産性の高いドナー牛を選定する方法の開発が望まれているが、過剰排卵処理における卵巢反応性を正確に予測する手法は確立されていない。

2) 研究の目的

卵巢内の小卵胞数の指標である血漿抗ミュラー管ホルモン（AMH）濃度および過剰排卵処理時の排卵数と関係することが知られる AMPA 型グルタミン酸受容体（AMPA1）遺伝子型を利用し、卵巢反応性を予測するための技術を開発する。

5. 研究方法

1) 血漿 AMH 濃度と過剰排卵処理における卵巢反応性の関係

- ・ねらい：血漿 AMH 濃度の測定によって過剰排卵処理における卵巢反応性を予測する。
- ・試験項目等：黒毛和種ドナー牛（3～17歳、平均8.7歳）に FSH を漸減投与し、過剰排卵を誘起した。ドナー牛は延べ49頭（実頭数34頭）であり、そのうち12頭は2～4回過剰排卵処理を行った。採血は FSH 投与開始前4日間のいずれかの日に行い、血漿 AMH 濃度を測定した。ドナー牛のうち46頭は、採血時に超音波画像解析装置を用いて卵巢の観察を行い、卵胞数を記録した。卵胞の大きさは最大直径によって、小卵胞（<5mm）、中卵胞（5～10mm）および大卵胞（>10mm）に分類した。

2) AMPA1 型と過剰排卵処理における卵巢反応性の関係

- ・ねらい：AMPA1 型の判定によって過剰排卵処理における卵巢反応性を予測する。また、血漿 AMH 濃度による予測との相乗効果を検討する。
- ・試験項目等：上記と同一のドナー牛の末梢血白血球から DNA を抽出した。AMPA1 の exon7 における 241bp の領域を PCR で増幅し、111塩基目の一塩基置換（G あるいは A）をダイレクトシーケンスによって判定した。

6. 研究の成果

- 1) -(1) 血漿 AMH 濃度は、推定黄体数、回収卵数、受精卵数および移植可能卵数と有意な正の相関を示し、過剰排卵処理における卵巢反応性の予測に利用できた（表1）。
- 1) -(2) 血漿 AMH 濃度を複数回測定した結果、毎回検出限界未満あるいは検出限界以上のドナー牛に分類でき、血漿 AMH 濃度は一度測定すればその後もその個体の過剰排卵処理における卵巢反応性の指標となる可能性が示された（図1）。
- 2) -(1) GA 型と GG 型の AMPA1 遺伝子を持つドナー牛は、過剰排卵処理における卵巢反応性に有意差がなかった（図2）。
- 2) -(2) 血漿 AMH 濃度が高く、GG 型の AMPA1 遺伝子を持つドナー牛は、回収卵数、受精卵数および移植可能卵数が多く、これら二つの指標を組み合わせた卵巢反応性の予測技術により受精卵の生産性の高いドナー牛を推定することができた（図3）。

< 具体的データ >

表 1 血漿 AMH 濃度と卵胞数および過剰排卵処理における卵巢反応性の関係

	血漿 AMH 濃度		小卵胞数	
	r	P	r	P
卵胞数				
総卵胞数	0.646	<0.001		
小卵胞数	0.722	<0.001		
中卵胞数	0.143	0.344		
大卵胞数	-0.272	0.067		
卵巢反応性				
推定黄体数	0.460	<0.001	0.422	0.003
回収卵数	0.734	<0.001	0.740	<0.001
受精卵数	0.566	<0.001	0.740	<0.001
受精卵率	-0.030	0.839	0.218	0.146
移植可能卵数	0.393	0.005	0.529	<0.001
移植可能卵率	-0.023	0.877	0.114	0.449

血漿 AMH 濃度が検出限界 (0.08 ng/ml) 以下の場合 (26/49 頭) は、0 ng/ml として解析した。

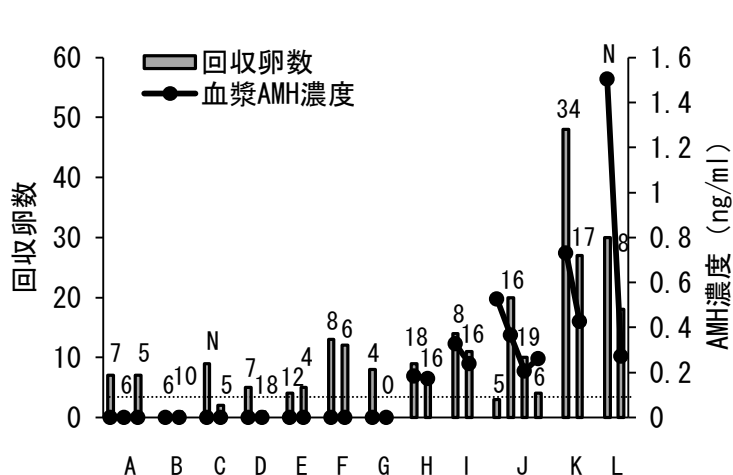


図 1 複数回収卵した個体 (A~L) における回収卵数と血漿 AMH 濃度
グラフ内の数字は小卵胞数を表す。N は卵胞数の計測なし。
点線：検出限界 (0.08 ng/ml)

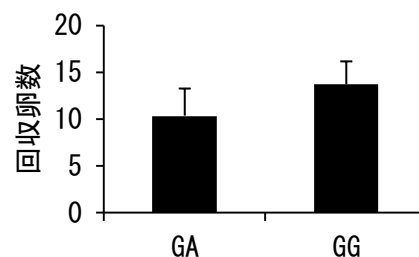


図 2 AMPA1 型と回収卵数の関係
有意差なし

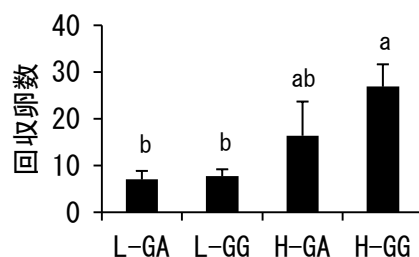


図 3 血漿 AMH 濃度および AMPA1 型
と回収卵数の関係
L: AMH 濃度が平均未満
H: AMH 濃度が平均以上
GA および GG: AMPA1 型
異文字間に有意差あり (P<0.05)

7. 成果の活用策

1) 成果の活用面と留意点

- (1) 本試験の成果は、過剰排卵処理による受精卵の生産効率を向上するための技術開発に活用できる。
- (2) AMPA1 型を用いた過剰排卵処理後の回収卵数の予測技術は特許権が取得されており (特許第 4756250 号)、当該技術を実施する際には権利者から実施許諾を受ける必要がある。

2) 残された問題とその対応

- (1) 育成期間の血漿 AMH 濃度と性成熟後の過剰排卵処理における卵巢反応性の関係の解析
- (2) 性成熟後の血漿 AMH 濃度の長期的な変動の解析
- (3) ドナー牛を選定するための血漿 AMH 濃度の基準値の設定
- (4) AA 型の AMPA1 遺伝子を有するドナー牛の過剰排卵処理における卵巢反応性の調査