

論	文
Articles	

ヒツジインヒピン α サブユニットの 能動免疫が黒毛和種牛の卵巢機能に及ぼす影響と その過排卵誘起処置および双子生産への適応性

竹之内直樹*・大島一修**・島田和宏***・高橋政義***・
百目鬼郁男****・門司恭典****

(平成 15 年 5 月 22 日受付/平成 15 年 9 月 24 日受理)

要約：インヒピン免疫はウシで排卵率を高めることが知られている。本研究では、組換え体ヒツジインヒピン α サブユニットを抗原とした黒毛和種牛への免疫が卵巢反応に及ぼす影響を検討した。また、過排卵誘起処置ならびに双子生産へのインヒピン免疫の適応性を調べた。免疫区として黒毛和種雌牛 8 頭に初回免疫時にインヒピンワクチン 2 ml を投与し、28 日後に追加免疫として同量を投与した。対照区の 5 頭にはアジュバントのみを投与した。免疫後 2-5 ケ月の間、卵巢の変化を直腸検査ならびに超音波画像により追跡した。免疫区で観察した 23 発情周期中 2 および 4 発情周期について、それぞれ過排卵誘起処置ならびに双子生産を試みた。それぞれの試験に用いた供試牛は、発情日に人工授精を行い、過排卵誘起処置ではさらに人工授精後 8 日目に胚回収を行った。免疫区 (23 発情周期) では、発情卵胞 (10 mm \leq) および黄体数は 7.0 ± 1.9 , 3.1 ± 1.2 であり、対照区 (16 発情周期) の 1.1 ± 2.2 , 1.1 ± 1.4 より多かった。免疫区では連続した発情周期で複数の卵胞発育および排卵が観察された。過排卵誘起処置では、2 頭からそれぞれ 4 および 9 個の移植可能胚が得られ、胚移植の結果、3 頭の産子が得られた。双子生産では 4 頭中 1 頭で双子が生産された。以上のことから、黒毛和種牛において組換え体ヒツジインヒピン α サブユニットの免疫は、連続した発情周期で複数の発情卵胞の発育ならびに複数排卵を誘発し、さらに過排卵誘起処置ならびに双子生産への応用が可能であることが明らかになった。なお、本研究は、性腺刺激ホルモンを併用しないインヒピン免疫のみによる過排卵誘起処置の成功例として、家畜における初の報告例である。

キーワード：インヒピン免疫、卵巢機能、双子生産、過排卵誘起処置、ウシ

緒言

インヒピンは α サブユニットと β サブユニットからなる二量体の糖タンパクであり、顆粒膜細胞およびセルトリ細胞を分泌母地とし、下垂体からの卵胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone: FSH) の合成および放出を特異的に抑制するホルモンである。ウシにおいては、1970 年代に、FSH を抑制する因子として精漿中¹⁾ および卵胞液中²⁾ でその存在が報告され、1986 年に卵胞液から単離、精製された³⁾。

インヒピンを抗原としたホルモン免疫に関しては、数多くの報告があり、ウシ⁴⁻¹⁰⁾、ウマ^{11,12)}、ブタ^{13,14)}、ヒツジ¹⁵⁻²⁴⁾ など各家畜で検討されている。その免疫抗原としては、ウシ卵胞液からの部分的な精製物^{4,15-17,20)}、合成インヒピンペプチド^{5-10,14,19,20,22-24)}、組換え体インヒピンサブユニット^{11,15,18,21)} などさまざまなものが用いられ、免疫方法も能

動免疫^{4-11,13,15-18,21,22,24)} や受動免疫^{12,14,19,23)} などの手法が用いられている。これらの報告では、免疫後の血中 FSH の増加により、卵胞数の増加が誘発されること、かつインヒピンは黄体形成ホルモン分泌には影響を及ぼさないことから、複数排卵動物では排卵数の増加、単排卵動物では複数排卵が誘発されることが共通した結論である。また、免疫後の血中 FSH の増加は、生体内で産生されるインヒピン抗体が内因性のインヒピンと結合し、インヒピンの生物学的活性が弱まる結果、生体内でのインヒピンの作用である FSH 分泌抑制が解除されることに起因する。

ウシは単排卵動物であることから、効率的生産のために過排卵誘起処置が重要な技術であり、複数排卵の誘起を特徴とするインヒピン免疫は極めて興味深く、臨床繁殖領域への適用が期待できる。しかし、これまでのインヒピン免疫に関する研究は、内分泌学的背景の解明や卵巢反応に関するものが多数を占めており、その卵巢反応を利用して家

* 農林水産省中国農業試験場 (農業・生物系特定産業技術研究機構東北農業研究センター)

** 農業・生物系特定産業技術研究機構近畿中国四国農業研究センター

*** 農林水産省中国農業試験場 (農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所)

**** 東京農業大学農学部畜産学科

畜の生産性への影響を検討した報告は少なく、双子生産⁹⁾や体外受精胚作出のための生体内卵子吸引の前処置としての適応性^{25, 26)}などについて、いくつかの検討が行われているのみである。

本研究では組換え体ヒツジインヒピン α サブユニットを抗原とした能動免疫が、黒毛和種牛の卵巢機能、特に発情卵胞の発育と排卵に及ぼす影響を明らかにするとともに、過排卵誘起処置および双子生産へのインヒピン免疫の適応性を明らかにすることを目的とした。

材料および方法

1. 供試家畜および試験方法

農林水産省中国農業試験場畜産部（現 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構近畿中国四国農業研究センター畜産草地部）で繋養されていた、正常な発情周期を営む黒毛和種牛 13 頭を用いた。供試牛のうち 8 頭（免疫区）にはワクチンを、残りの 5 頭（対照区）にはアジュバントのみを投与し、薬物投与が卵巢機能に及ぼす影響を調べた。なお、原則として初回免疫は発情日に、追加免疫は初回免疫後 28 日目に行い、免疫区ではワクチン 2 ml を、対照区ではアジュバント 2 ml を、それぞれ頸部皮下に投与した。初回免疫後 2-5 ケ月の間、全頭について卵巢の変化を直腸検査ならびに 5 MHz 探触子（UST-588U-5, aloka, Japan）を装着した超音波画像診断装置（SSD-620, aloka, Japan）により追跡した。発情観察は適宜行った。また、試験期間中、定期的に血液を採取し、卵巢所見と血漿中 progesterone (P) ならびに estradiol-17 β (E2 β) 所見とを比較検討した。免疫区で観察した発情周期中、6 発情周期については発情日に人工授精を行い、うち 2 発情周期では過排卵誘起処置を、他の 4 発情周期では双子生産を試みた。過排卵誘起処置では人工授精後 8 日目に胚回収を行い、得られた胚の品質を調べるとともに、一部の胚を移植し、胚の受胎性を調べた。双子生産では、人工授精後 30 日目を以降に超音波画像診断装置を用い妊娠診断を行い、妊娠個体については分娩の状況を調べた。

2. インヒピンワクチン

ワクチンの作成は BROWN ら¹³⁾の方法に準じた。免疫薬物として、大腸菌由来の組み換え体ヒツジインヒピン α サブユニット (Biotech Australia, Pty Ltd, Sydney) 250 μ g をアジュバント 1 ml と混和しワクチン化したものを用いた。アジュバントは、鉱物オイルである Marcol 52 (Esso, Sydney, Australia) 9 容と界面活性剤である Montanide 888 (SEPPIC, Paris, France) 1 容を混和したものである。

3. ホルモン測定

外頸静脈よりヘパリン加容器に血液を採取後、直ちに遠心分離を開始し、3,000 rpm, 1.5 hr, 4°C の条件下で血漿を分離した。得られた血漿はホルモン測定まで -20°C で凍結保存した。ウシ血漿中 P ならびに E2 β の測定は既報^{27, 28)}に従って抗体固相法酵素免疫測定法により行った。

4. 統計処理

供試牛については、発情卵胞数と排卵後の黄体数に関するデータを蓄積した。なお、発情日に直径 10 mm 以上に達したものを発情卵胞とした。得られたデータについて統計解析を行い、免疫が卵巢機能に及ぼす影響を調べた。統計処理は HARVEY²⁹⁾の最小自乗分散分析法により行った。

結 果

1. 能動免疫が発情卵胞の発育と排卵に及ぼす影響

図 1 に、免疫牛におけるステロイドホルモンならびに卵巢所見の推移について代表的な 1 例 (JB483) を示した。本牛では初回および追加免疫は、観察期間中の 1 回目の発情周期の発情翌日および 2 回目の発情周期の発情後 5 日目（初回免疫後 28 日目）に行った。初回免疫および追加免疫を行った発情周期（初回および 2 回目の発情周期）では、単一の発情卵胞の発育とそれに続いて単排卵が観察され、インヒピン免疫による明瞭な変化は認められなかった。3 回目の発情周期では、初回免疫後 42 日目に発情が観察され、39 個の発情卵胞の発育を認めた。発情卵胞のうち 2 個が排卵し、正常な形態を有する黄体と囊腫様黄体がそれぞれ 1 個ずつ形成された。なお、直腸検査で波動感をともなわず十分な容積と柔軟性を有し、かつ超音波画像では内腔が観察されず、エコーレベルが十分に低く、実質との境界がエコーレベルにより明瞭に区別できるものを正常な形態を有する黄体とした。4 回目の発情周期では、発情は初回免疫後 67 日目に鈍性に経過したが、発情卵胞 9 個のうち 4 個が排卵した。形成された黄体は全て正常な形態を有していた。その後、初回免疫後 97 日目に発情が発現し、この 5 回目の発情周期では 2 個の発情卵胞の発育、排卵ならびに正常な形態を有する 2 個の黄体形成が観察された。6 および 7 回目の発情周期では、免疫による卵巢反応は消失し、単排卵性に経過した。なお、6 および 7 回目の発情周期における発情は、初回発情後 119, 140 日目にそれぞれ観察され、7 回目の発情周期では、人工授精の結果、単胎妊娠が成立した。ウシ血漿中 P および E2 β は発情卵胞ならびに黄体数をそれぞれ反映して推移した。すなわち、複数の排卵が観察された 3-5 回目の発情周期における発情期の E2 β ピーク値ならびに黄体開花期の P 値はそれぞれ 16.1-33.4 pg/ml, 3.75-27.0 ng/ml であり、単排卵性に経過した他の発情周期での値 (E2 β : 8.0-11.0 pg/ml, P: 3.1-7.1 ng/ml) と比較して高く推移した。なお、本牛における複数の発情卵胞の発育および複数排卵は、追加免疫後の最初の発情周期（観察期間中 3 回目の発情周期）以降に観察され、連続した 3 発情周期の間、複数の発情卵胞の発育および複数排卵が誘発された。また、他の免疫牛においても、免疫による卵巢反応は追加免疫後の発情周期以降で認められた。免疫牛 1 例 (JB205) における排卵前後の超音波画像所見を図 2 に示した。発情日にエコーフリーの構造物として描出される卵胞が複数発育しており、排卵日にはそれらの多くが消失した。発情後 8 日目の画像では、排卵日と比較して卵巢断面積は増大しており、低エコーレベルの構造物として描出される黄体が複数形成されていた。

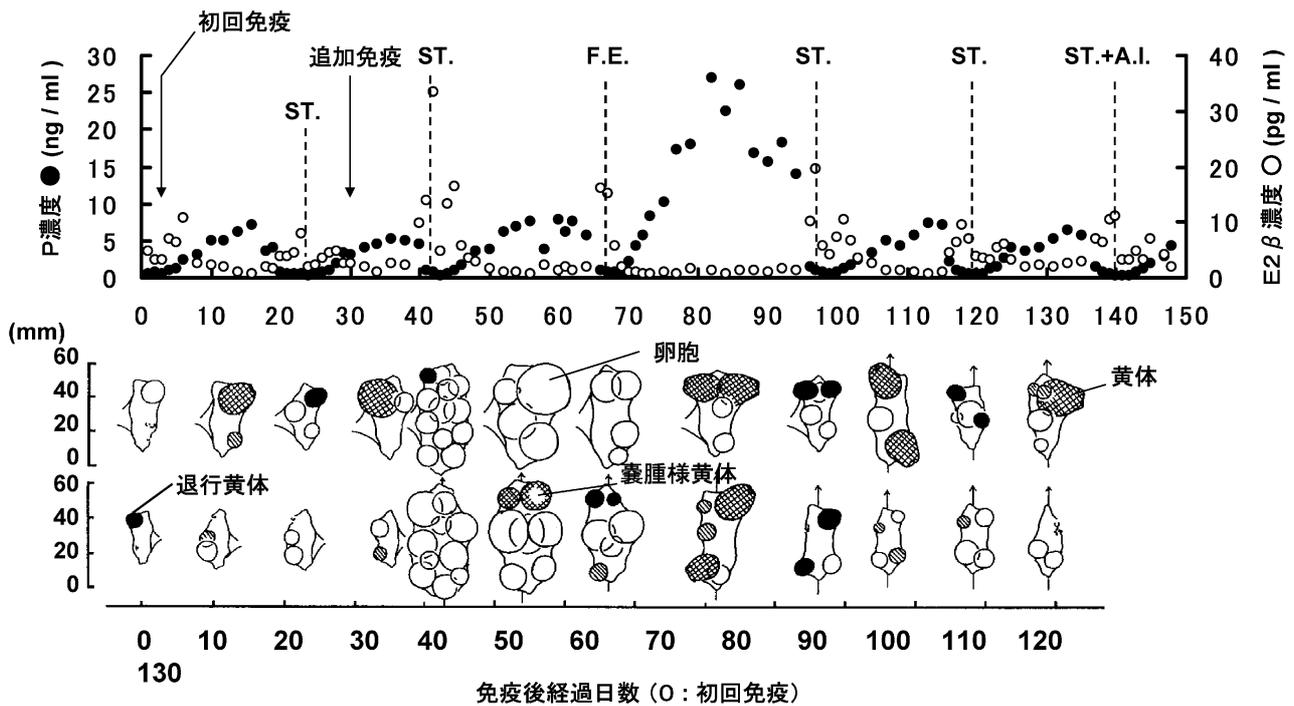


図1 免疫牛におけるステロイドホルモンならびに卵巢所見の推移 (JB483)
ST.: スタンディング発情, F.E.: 鈍性発情, A.I.: 人工授精

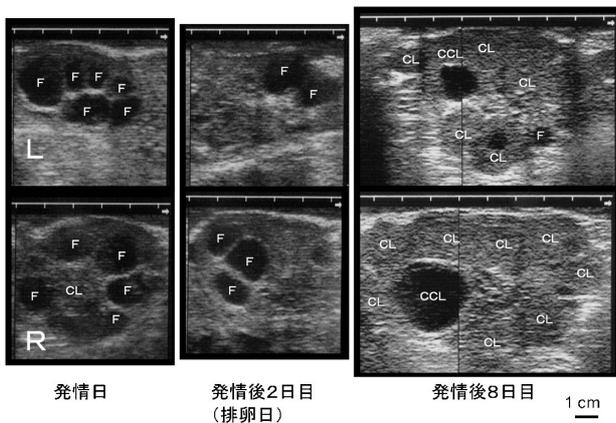


図2 免疫牛における排卵前後の超音波画像
(JB205: 追加免疫後初回発情周期)
F: 卵泡, CL: 黄体, CCL: 囊腫様黄体

供試牛における薬物処置後の卵巢所見、臨床所見を表1に示した。免疫区では、免疫処置後観察した23発情周期中11発情周期で複数の排卵が観察され、発情卵泡の複数の発育ならびにそれに続く複数排卵が誘起された。一方、対照区で複数排卵が観察された周期は、16周期中1発情周期のみであった。免疫後の発情卵泡、黄体数は免疫区 ($n=23$) で 7.0 ± 1.9 個 (最小自乗平均値 \pm 標準誤差), 3.7 ± 1.2 個であり、対照区 ($n=16$) の 1.1 ± 2.2 個, 1.1 ± 1.4 個と比較して多く、発情卵泡数は免疫区で有意に増加した (表2)。

追加免疫後の連続した発情周期における各区の発情卵泡

数および黄体数の推移を図3に示した。免疫区では、追加免疫後の初回発情周期において発情卵泡数、排卵数は 18.9 ± 3.1 個 (最小自乗平均値 \pm 標準誤差, $n=8$), 7.6 ± 2.0 個であり、それ以降の発情周期と比較して有意に多かった。免疫区では各構造物数は発情周期の反復にともない低下するものの、免疫による卵巢反応は連続した4発情周期の間持続した。複数の発情卵泡の発育ならびに複数排卵が認められなくなった最終発情日は、追加免疫後64-121日目以降であった。なお、免疫区のJB377では追加免疫後の2発情周期目から複数排卵が観察されており、JB205では追加免疫後の初回発情周期では良好な複数排卵が誘発されたが、それに続く2発情周期では単一の卵泡発育ならびに単排卵で経過し、再度4回目の発情周期に複数排卵が観察された (表1)。このように、一部の個体では、免疫処置による平均的な反応性とは異なる卵巢反応を示した。対照区では連続した4発情周期の間、ほぼ単排卵で経過した。

2. 能動免疫の過排卵誘起処置への適応性

免疫区のJB377の追加免疫後3回目の発情周期ならびにJB205の初回発情周期では、9, 14個の発情卵泡の発育と6, 14個の排卵がそれぞれ観察され、この発情周期の卵巢反応を過排卵誘起処置として適用した (表1)。なお、継続して卵巢機能を追跡するため、子宮流注終了後、黄体退行薬の投与または子宮内へのヨード剤の投与等の黄体退行処置は行わなかった。結果として、2頭からそれぞれ4, 9個の移植可能胚が回収された (表3)。また、これら一部の胚を移植した結果、受胎牛3頭で各々単胎妊娠が成立し、

表 1 試験供試牛における薬物処置後の卵巣所見、臨床所見

牛番号	追加免疫後発情周期 (卵胞数/黄体数/発情周期日数)				双子誘起結果			
	1	2	3	4	人工授精回数	妊娠診断結果*1	妊娠期間	娩出産子
免疫区								
JB254	8/ 4/76	10/ 1/26	1/ 1/ -	-/ -/ -	0	-		
JB322	6/ 2/21	3/ 1/20	3/ 1/ 23	1/ 1/21	0	-		
JB374	44/34/89	1/ 1/ -	-/ -/ -	-/ -/ -	0	-		
JB483	39/ 2/30	9/ 4/22	2/ 2/20	4/ 1/20	1	単胎妊娠	289	♂, 39.0Kg
JB260	4/ 3/ -	-/ -/ -	-/ -/ -	-/ -/ -	1	双胎妊娠	282	第1子: ♀, 26.5Kg 第2子: ♂, 31.0Kg
JB537	37/ 1/ -	-/ -/ -	-/ -/ -	-/ -/ -	1	単胎妊娠	291	♀, 34.0Kg
JB377	1/ 1/22	3/ 2/22	9/ 6/34*2	1/ 0/*3	0	-		
JB205	14/14/49*2	1/ 1/18	1/ 1/24	2/ 2/ -	2	単胎妊娠*4	284	♀, 26.5Kg
対照区								
JB451	1/ 1/21	1/ 1/*5	-/ -/ -	-/ -/ -	0	-		
JB482	1/ 1/24	1/ 1/25	1/ 1/24	1/ 1/ -	0	-		
JB362	1/ 1/23	1/ 1/23	1/ 1/23	1/ 1/ -	4	非妊娠		
JB445	2/ 2/26	1/ 1/22	1/ 1/23	1/ 1/ -	1	非妊娠		
JB488	1/ 1/23	1/ 1/ -	-/ -/ -	-/ -/ -	2	単胎妊娠	285	♂, 34.0Kg

- *1 人工授精30日目以降に、超音波画像診断装置により実施。
 *2 人工授精後8日目に胚採取。
 *3 卵胞嚢腫に移行。
 *4 第1周期で胎子死滅、第4周期において再度妊娠成立。
 *5 永久黄体に移行。

表 2 追加免疫後の発情周期における発情卵胞数、黄体数の最小自乗平均値と標準誤差

変動因	観察数	最小自乗平均値 ± 標準誤差	
		発情卵胞数	黄体数
全平均	39	4.04 ± 1.45	2.40 ± 0.90
試験区			
免疫区	23	7.04 ± 1.86 ^a	3.74 ± 1.16
対照区	16	1.05 ± 2.23 ^b	1.06 ± 1.39

異符号間に有意差あり(a-b: P<0.05)

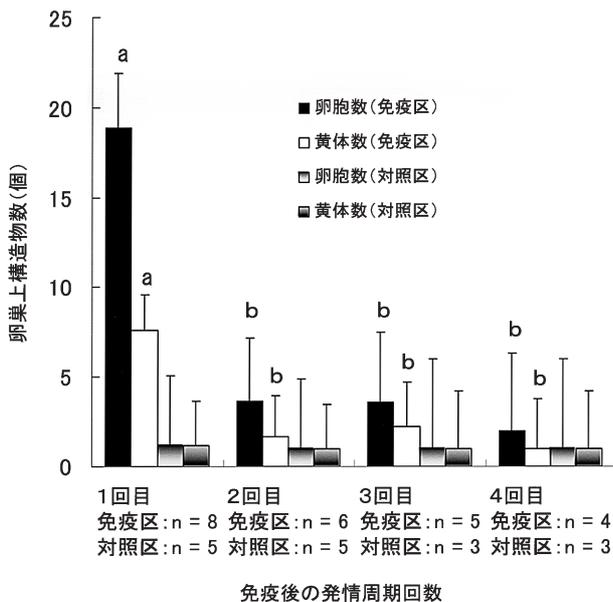


図 3 追加免疫後の連続した発情周期における各区の発情卵胞数および黄体数の推移 (最小自乗平均値+標準誤差) 同一カラムにおいて異符号間に有意差あり (a-b: P<0.05).

その後3頭の産子を得た。なお、JB205では、胚回収後に子宮内に残存していた胚の着床により単胎妊娠が成立したが、胎子死滅の発生により妊娠は継続しなかった(表1)。

過排卵誘起処置の1例(JB377)におけるステロイドホルモンならびに卵巣所見の推移を図4に示した。本牛では、追加免疫後2,3回目の発情周期で複数の排卵が誘発された。2回目の発情周期では発情は鈍性に経過したため、明瞭な発情行動が観察された3回目の発情周期で過排卵誘起処置を試みた。追加免疫後3回目の発情周期では、発情卵胞の複数の発育ならびに複数の黄体形成を反映してPおよびE2βは単排卵性に経過した発情周期と比較し高い値で推移したが、推移パターンに大きな違いは認められなかった。過排卵誘起処置を適応した3回目の発情周期の長さは34日であり、単排卵性に経過した発情周期および双排卵が誘発された追加免疫後2回目の発情周期の長さ(22-23日)と比較して長かった。

3. 能動免疫の双子生産への適応性

免疫区の4頭(JB260およびJB537:追加免疫後1回目の発情周期, JB205およびJB483:追加免疫後4回目の発情周期)に双胎妊娠の誘起を試みた。それぞれの発情日に人工授精を行い、その後の経過を観察した結果、JB260で3個、JB205で2個の発情卵胞の排卵が認められた。そのうちJB260では双胎妊娠が誘起され、人工授精後282日目に双子を分娩した(図5)。娩出された双子は異性であり、第1子の雌子牛はフリーマーチンであった。JB205は双排卵であったが、単胎妊娠となった。JB537とJB483は複数の発情卵胞が発育したが、単排卵となり、いずれも単胎妊娠であった。対照区では、3頭人工授精を行った結果、1頭で単胎妊娠が成立した。なお、全ての妊娠牛で産子は正常

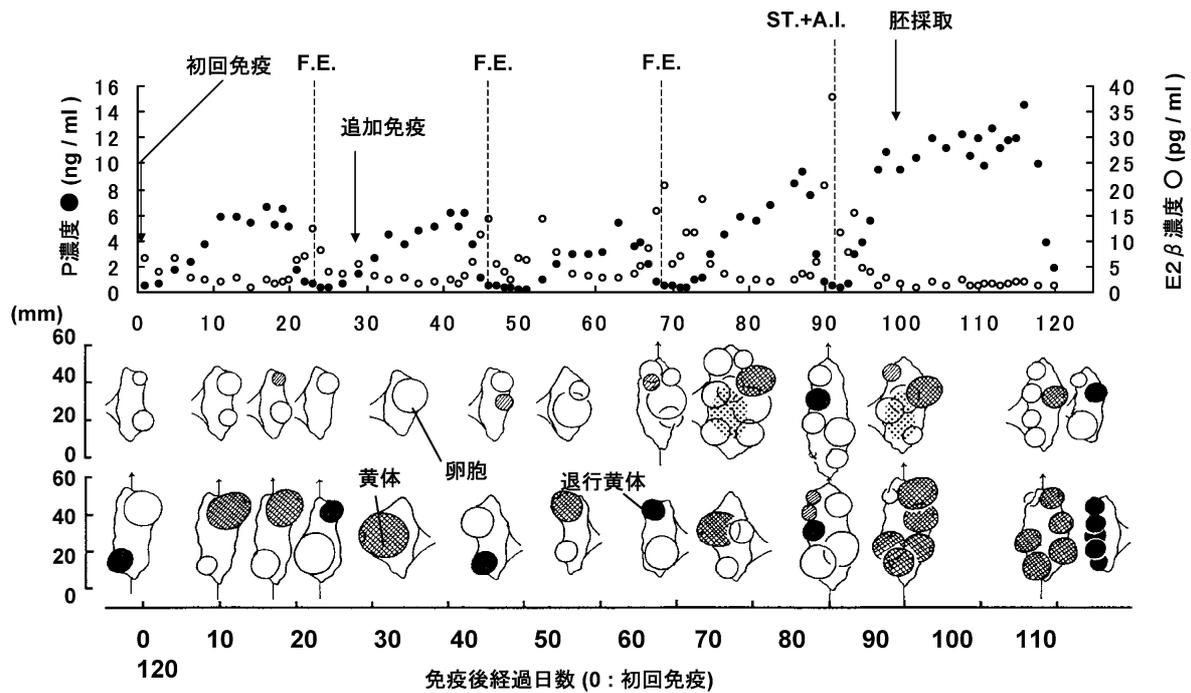


図 4 過排卵誘起例におけるステロイドホルモンならびに卵巢所見の推移 (JB377)
ST.: スタンディング発情, F.E.: 鈍性発情, A.I.: 人工授精

表 3 インヒピン免疫牛における胚回収成績

供試牛	発情卵胞数	黄体数	回収胚数	移植可能胚		
				ステージ	品質	数
JB377	9	6	4	胚盤胞期胚	A	1
				早期胚盤胞期胚	A	2
				桑実胚	B	1
JB205	14	14	11	胚盤胞期胚	A	3
				早期胚盤胞期胚	A	1
				早期胚盤胞期胚	B	2
				桑実胚	A	1
				桑実胚	B	2



図 5 インヒピン免疫により生産された双子 (JB260)
左: 第2子, 中: 第1子, 右: 母牛

に娩出された。(表1)

双胎妊娠例 (JB260) におけるステロイドホルモンならびに卵巢所見の推移を図6に示した。本牛では、双胎妊娠の誘起を試みた追加免疫後の初回発情周期において、正常な形態を有する3個の黄体が形成された。排卵後、P値は発情後22日目(初回免疫後62日目)まで上昇し、その後7.0-8.8 ng/mlで推移した。この値は黄体数を反映して単排卵で経過した前の2発情周期での値(3.0-6.5 ng/ml)より高かった。E2 β は追加免疫後の初回発情時、12.1 pg/mlのピーク値を示した。この値は発情卵胞の複数の発育を反映し、単排卵で経過した発情周期での値(8.9-9.4 pg/ml)より高く、発情後4-5日目に、一次主席卵胞の発育時期に一致すると考えられる一過性の上昇が認められ、その後は3.8 pg/ml以下の値で推移した。

考 察

本研究では、組換え体ヒツジインヒピン α サブユニットを抗原とした能動免疫により、黒毛和種牛において連続し

た発情周期で複数排卵が誘起されることを示し、その卵巢反応が過排卵誘起処置ならびに双子生産に応用できることを明らかにした。なお、本研究は、性腺刺激ホルモンを併用しないインヒピン免疫のみによる過排卵誘起処置の成功例として、家畜における初の報告例である。

黒毛和種牛にヒツジインヒピン α サブユニットを抗原とした能動免疫を行った結果、これまでに報告されているように複数の発情卵胞の発育ならびに複数排卵が誘起された。複数排卵は、免疫区で観察を行った発情周期中47.8% (11/23)で観察された。インヒピン α サブユニットを免疫抗原として用いた従来の報告^{5-7,9)}では18-65%の発生頻度が報告されている。これらの報告では、免疫抗原としてさまざまな合成ペプチド断片が用いられており、インヒピン

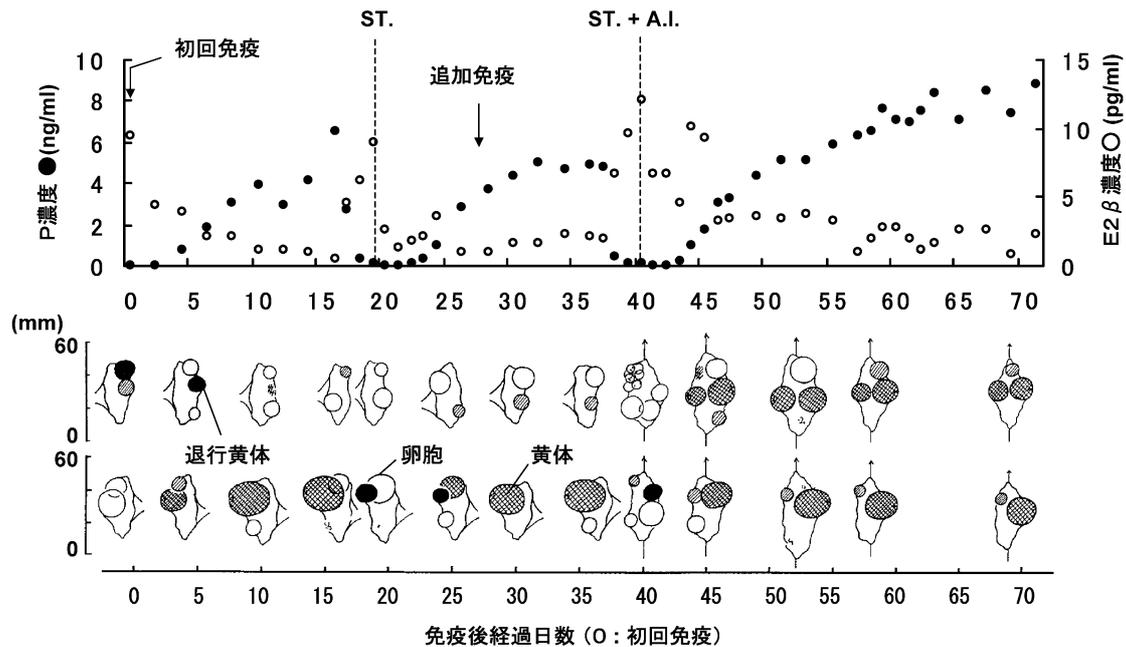


図 6 双子生産例におけるステロイドホルモンならびに卵巣所見の推移 (JB260)
ST.: スタンディング発情, A.I.: 人工授精

α サブユニットの免疫による卵巣反応は、抗原として用いる合成ペプチド断片の種類^{9,30)} や担体と抗原との結合比率¹⁰⁾ によって、卵巣反応は大きく異なるとされている。それらのことから今回の成績と従来の報告とを単純に比較することは困難である。しかし、追加免疫後の初回発情周期での発情卵胞数、排卵数はそれぞれ 18.9 個、7.6 個であり、ウシが単排卵動物であることを考えれば、これらは極めて大きな反応であるといえる。免疫牛での排卵数は 1-34 個と大きな変動が認められた。BLEACH ら⁹⁾ や BROWN ら¹³⁾ はインヒビンの抗体価と卵巣反応との間に密接な関係があるとしており、さらに BLEACH ら⁹⁾ は抗体価の上昇には個体差があることを報告している。しかし、今回、免疫後の血中インヒビン抗体価については検討していないため、個体差の理由については解明には至らなかった。なお、対照区の 1 発情周期 (JB445, 1 回目の発情周期) では、卵巣機能に影響を及ぼさないと考えられる薬物が投与されているにもかかわらず、双排卵が観察された。同試験場で 9 年間にわたって行った黒毛和種雌牛延べ 800 頭以上に関する直腸検査結果では、性腺刺激ホルモン等の非投与下で複数の排卵が観察された牛は、本牛以外では 1 頭のみである。このことを考慮すれば、対照区での双排卵は極めてまれな現象であると考えられる。

インヒビン α サブユニットを抗原とした未経産牛への免疫では、5-6 発情周期の間、反復して複数排卵が誘起され^{8,9)}、部分精製したウシ卵胞液を抗原としたヒツジへの免疫でも 4 発情周期の間、ほぼ連続して複数排卵が誘起されることが報告されている¹⁵⁾。今回、免疫牛の卵巣反応を追跡した結果でもこれらの報告とほぼ同様に、追加免疫後連続した 4 発情周期の間、複数の発情卵胞の発育および複数排卵が誘起された。免疫後のインヒビン抗体価の推移を調

べた報告^{4,9)} では、未経産牛で免疫後 12 週以上もしくは 2-4 ケ月間、血中抗体が検出されたとある。また、BLEACH ら⁹⁾ は卵巣反応量と抗体価とは直接的な関連性があることを明らかにしており、合成インヒビンを未経産牛に免疫した GLENCROSS ら⁷⁾ は、FSH の推移パターンは対照区と変わらないが、発情周期を通じて FSH 濃度は高く維持されていたことを報告している。これらのことから、インヒビン免疫による卵巣反応の反復性は、本処置が免疫手法であることに起因し、生体内での持続的なインヒビン抗体の産生あるいは存在により、数ヶ月の間 FSH の分泌抑制が解除され、その結果、持続的に FSH 分泌が誘発されることによるものと考えられる。また、本試験で、卵巣反応が認められなくなった最終発情日は、追加免疫後 2-4 ケ月以降であったことから、今回試験で用いた免疫牛においても、従来の報告^{4,9)} と同様に数ヶ月間、血中抗体は維持されていたものと推測される。

過排卵誘起処置への適応性については、ヒツジでの報告^{22,24)} があるが、それらは胚回収成績の向上のために、過排卵誘起処置の前処置としてインヒビン免疫を利用したものである。今回の成績は性腺刺激ホルモンを併用しないインヒビン免疫のみによる過排卵誘起処置としては家畜で初めての報告である。ウシは単排卵動物であることから、優良子畜の増産および改良のためには過排卵誘起処置および胚移植が不可欠となっている。過排卵誘起処置の方法としては、性腺刺激ホルモンを用いた過排卵誘起処置が一般的であるが、処置後の down-regulation に関連して連続した処置では卵巣反応が低下することが知られている^{31,32)}。また、妊馬血清性腺刺激ホルモンによる過排卵誘起処置では、抗ホルモンの産生による卵巣反応の低下も問題として残されており^{33,34)}、従来の過排卵誘起処置は短期間内

の反復性に欠けることが大きな短所の一つである。一方、インヒビン免疫による過排卵誘起処置は、免疫手法を用いていることから、複数排卵に関して反復性に優れ、従来の過排卵誘起処置と比較して簡便な薬物処置のみで、短期間内で反復して胚採取を可能にする技術として期待できる。

免疫反応を利用し双子生産を行った結果では、4頭中1頭について双胎妊娠が誘起され、正常に双子を生産することができた。本試験での双胎誘起率は、ヘレフォードの交雑種を供試した MORRIS ら⁶⁾の報告(0-60%)と比較すればやや劣るものの、黒毛和種牛においてもインヒビン免疫による誘起多胎が可能であることを示した。ただし、誘起多胎では、妊娠期に発生する胎子死滅の点で多くの問題が残されている。このことについて、IZAIKE ら³⁵⁾は妊娠28-67日の間に胎子の死滅が頻発し、その発生頻度は双胎と比較して品胎で多いことを報告している。その主な原因としては、複数の胚または胎子の発育にともなう子宮内での競合などが考えられている³⁶⁾。そのことから、インヒビン免疫を利用した双子生産では、排卵数の調節が重要となる。ウシインヒビン α サブユニットの合成ペプチドのうち、MORRIS ら⁶⁾の方法では、やや卵巣反応の弱いとされるペプチド断片(63-72 ペプチド断片, 107-122 ペプチド断片)を免疫抗原とすることで、排卵数が2-3個に制御されている。ペプチド断片の種類と卵巣の反応性が検討された報告では、1-29 ペプチド断片と63-72 ペプチド断片を比較した場合、いずれも複数排卵を誘起し、有意差はないものの後者で排卵数が少ないとされている⁹⁾。一方、今回の双子生産では、人工授精後6日目に黄体数を確認し、黄体数が3個以下の場合を誘起多胎に適用した。また、多胎誘起に関連したその他の問題としては、SHIMADA ら³⁷⁾の報告にあるように、産子の発育性について単子と比較した場合、双子では発育が劣ることや、今回の双子のようにフリーマーチンの発生が避けられないことなどがあげられ、これらの問題への対応も考慮する必要がある。なお、双子生産ならびに過排卵誘起処置の成績から、インヒビン免疫により誘起された発情卵胞由来の卵子は正常な受精能および発生能を持つものと考えられた。

謝辞：本研究を遂行するにあたり、ワクチンを御提供いただいた Biotech Australia, Pty Ltd の C.G. TSONIS 博士に深く感謝の意を表す。また、供試牛の適切な管理をしていただいた農林水産省中国農業試験場畜産部(現 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構近畿中国四国農業研究センター畜産草地部)業務科職員の方々に感謝する。

引用文献

- FRACHIMONT, P., CHARI, S., HAGELSTEIN, M.T. and DURAISWAMI, S. 1975. Existence of a follicle-stimulating hormone inhibiting factor 'inhibin' in bull seminal plasma. *Nature*. 2 ; 257, 402-404.
- DE JONG, F.H. and SHARPE, R.M. 1976. Evidence for inhibin-like activity in bovine follicular fluid. *Nature*. 2 ; 263, 71-72.

- FUKUDA, M., MIYAMOTO, K., HASEGAWA, Y., NOMURA, M., IGARASHI, M., KANGAWA, K. and MATSUO, H. 1986. Isolation of bovine follicular fluid inhibin of about 32 kDa. *Mol. Cell. Endocrinol.* 44, 55-60.
- PRICE, C.A., MORRIS, B.A., O'SHEA, T. and WEBB, R. 1987. Active immunization of cattle against partly purified follicular fluid from sheep. *J. Reprod. Fertil.* 81, 161-168.
- GLENCROSS, R.G., BLEACH, E.C., McLEOD, B.J., BEARD, A.J. and KNIGHT, P.G. 1992. Effect of active immunization of heifers against inhibin on plasma FSH concentrations, ovarian follicular development and ovulation rate. *J. Endocrinol.* 134, 11-18.
- MORRIS, D.G., McDERMOTT, M.G., DISKEN, M.G., MORRISON, C.A., SWIFT, P.J. and SREENAN, J.M. 1993. Effect of immunization against synthetic peptide sequences of bovine inhibin alpha-subunit on ovulation rate and twinning rate in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 97, 255-261.
- GLENCROSS, R.G., BLEACH, E.C., WOOD, S.C. and KNIGHT, P.G. 1994. Active immunization of heifers against inhibin : effects on plasma concentrations of gonadotrophins, steroids and ovulation follicular dynamics during progestand-in-synchronized cycles. *J. Reprod. Fertil.* 100, 599-605.
- MORRIS, D.G., McDERMOTT, M.G., GREALLY, M., DISKEN, M.G., MORRISON, C.A., SWIFT, P.J. and SREENAN, J.M. 1995. Effect of immunization against synthetic peptide sequences of the alpha N-subunit of bovine inhibin on ovulation rate, gonadotrophin concentrations and fertility in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 103, 285-291.
- BLEACH, E.C.L., MUTTUKRISHNA, S., CUNNINGHAM, F.J., KNIGHT, P.G. and GLENCROSS, R.G. 1996. Effect of inhibin immunization using different synthetic peptide fragments of the bovine α -subunit on plasma anti-inhibin titres, plasma FSH concentrations and the incidence of multiple ovulation in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 41, 1-12.
- MORRIS, D.G., BROWNE, D., DISKEN, M.G. and SREENAN, J.M. 1997. Effect of peptide to carrier ratio on the immune and ovarian response to inhibin immunization in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 48, 1-8.
- McKINNON, A.O., BROWN, R.W., PASHEN, R.L., GREENWOOD, P.E. and VASEY, J.R. 1992. Increased ovulation rates in mares after immunisation against recombinant bovine inhibin alpha-subunit. *Equine. Vet. J.* 24, 144-146.
- NAMBO, Y., KANEKO, H., NAGATA, S., OIKAWA, M., YOSHIHARA, T., NAGAMINE, N., WATANABE, G. and TAYA, K. 1998. Effect of passive immunization against inhibin on FSH secretion, folliculogenesis and ovulation rate during the follicular phase of estrous cycle in mares. *Theriogenology.* 50, 545-557.
- BROWN, R.W., HUNGERFORD, J.W., GREENWOOD, P.E., BLOOR, R.J., EVANS, D.F., TSONIS, C.G. and FORAGE, R.G. 1990. Immunization against recombinant bovine inhibin alpha subunit causes increased ovulation rates in gilts. *J. Reprod. Fertil.* 90, 199-205.
- WHEATON, J.E., MEYER, R.L. JONES, R.H. and KRAMER, A.J. 1998. Effects of passive immunization using antibody against an alpha-inhibin peptide on follicle-stimulating hormone concentrations and litter size in sows. *Theriogenology.* 49, 813-822.
- HENDERSON, K.M., FRACHIMONT, P., LECOMTE-YERNA, M.J., HUDSON, N. and BALL, K. 1984. Increase in ovulation rate after active immunization of sheep with inhibin partially purified from bovine follicular fluid. *J. Endocrinol.*

- 102, 305-309.
- 16) WALLACE, J.M. and MCNEILLY, A.S. 1985. Increase in ovulation rate after treatment of ewes with bovine follicular fluid in the luteal phase of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* **73**, 505-515.
- 17) CUMMINS, L.J., O'SHEA, T., AL-OBAIDI, S.A.R., BINDON, B.M. and FINDLAY, J.K. 1986. Increase in ovulation rate after immunization of Merino ewes with a fraction of bovine follicular fluid containing inhibin activity. *J. Reprod. Fertil.* **77**, 365-372.
- 18) MIZUMACHI, M., VOGLMAYR, J.K., WASHINGTON, D.W., CHEN, C.L. and BARDIN, C.W. 1990. Superovulation of ewes immunized against the human recombinant inhibin alpha-subunit associated with increased pre- and post-ovulatory follicle-stimulating hormone levels. *Endocrinology*. **126**, 1058-1063.
- 19) WRATHALL, J.H.M., MCLEOD, B.J., GLENCROSS, R.G., BEARD, A.J. and KNIGHT, P.G. 1990. Inhibin immunoneutralization by antibodies raised against synthetic peptide sequences of inhibin α subunit: effects on gonadotrophin concentrations and ovulation rate in sheep. *J. Endocrinol.* **124**, 167-176.
- 20) O'SHEA, T., ANDREWS, C.M., BINDON, B.M., HILLARD, M.A., MIYAMOTO, K. and SINOSICH, M.J. 1991. Immunization of merino ewes with a synthetic inhibin peptide or with preparations obtained from bovine and porcine follicular fluids by immunoaffinity chromatography result in different effects on ovulation rate and on plasma gonadotrophin concentrations. *Reprod. Fertil. Dev.* **3**, 659-670.
- 21) O'SHEA, T., BINDON, B.M., FORAGE, R.G., FINDLAY, J.K. and TSONIS, C.G. 1993. Active immunization of Merino ewe lambs with recombinant bovine alpha inhibin advances puberty and increases ovulation rate. *Reprod. Fertil. Dev.* **5**, 173-180.
- 22) FINDLAY, J.K., RUSSELL, D.L., DOUGHTON, B., TSONIS, C.G., BORCHERS, C. and FORAGE, R.G. 1994. Effect of active immunization against the amino-terminal peptide (alpha N) of the alpha 43 kDa subunit of inhibin (alpha 43) on fertility of ewes. *Reprod. Fertil. Dev.* **6**, 265-267.
- 23) KUSINA, N.T., MEYER, R.L., CARLSON, K.M. and WHEATON, J.E. 1995. Effects of passive immunization of ewes against an inhibin-peptide on gonadotrophin levels, ovulation rate, and prolificacy. *Biol. Reprod.* **52**, 878-884.
- 24) D'ALESSANDRO, A., MARTEMUCCI, G. and IAFFALDANO, N. 1999. Active immunization with a synthetic fragment of pig inhibin alpha-subunit increases ovulation rate and embryo production in superovulated ewes but season affects its efficiency. *J. Reprod. Fertil.* **115**, 185-191.
- 25) KONISHI, M., AOYAGI, Y., TALEDOMI, T., ITAKURA, H., ITOH, T., YAZAWA, S., KISHI, H., TAYA, K., WATANABE, G. and KANAGAWA, H. 1996. Effect of active immunization of cattle against inhibin on ovarian follicular development and ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration. *Theriogenology*. **46**, 33-43.
- 26) KONISHI, M., AOYAGI, Y., TALEDOMI, T., ITAKURA, H., ITOH, T. and YAZAWA, S. 1996. Production and transfer of IVF embryos from individual inhibin-immunized cows by ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration. *J. Vet. Med. Sci.* **58**, 893-896.
- 27) 竹之内直樹・居在家義昭・大島一修・島田和宏・高橋政義, 1993. 牛血中プロジェステロンの酵素免疫測定法, 中国農試研報, **12**, 125-132.
- 28) 竹之内直樹・大島一修・島田和宏・高橋政義, 1996. マイクロプレートを用いた牛血漿中エストラジオール-17 β の酵素免疫測定法, 日本繁殖生物学雑誌, **43**, 9-14.
- 29) HARVEY, W.R., 1977. User's guide for LSMLMW. Ohio State Univ., Columbus, 1-59.
- 30) ANDERSON, S.T., BINDON, B.M., HILLARD, M.A. and O'SHEA, T. 1998. Increased ovulation rate in Merino ewes immunized against small synthetic peptide fragments of the inhibin alpha subunit. *Reprod. Fertil. Dev.* **10** (5), 421-431.
- 31) DORN, C.G., BAKER, J.F., LUNT, D.K. and KRAEMER, D.C. 1991. Repeated, short interval superovulation in virgin heifers. *Theriogenology*. **35**, 302.
- 32) HASTLER, J.F. 1992. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **75**, 2857-2879.
- 33) JAINUDEEN, M.R., HAFEZ, E.S.E., GOLLNICK, P.D. and MOUSTAFA, L.A. 1966. Antigonaotrophines in the serum of cows following repeated therapeutic pregnant mare serum injections. *Amer. J. Vet. Res.* **27**, 669-675.
- 34) ONUMA, H., HAHN, J. MAURER, R.R. FOOTE, R.H. 1969. Repeated superovulation in calves. *J. Anim. Sci.* **28**, 634-637.
- 35) IZAIKE, Y., SUZUKI, O., SHIMADA, K., TAKENOUCHE, N. and TAKAHASHI, M. 1991. Observation by ultrasonography of embryonic loss following the transfer of two or three embryos in beef cows. *Theriogenology*. **36**, 939-947.
- 36) BULMAN, D.C. and LAMMING, G.E. 1979. The use of milk progesterone analysis in the study of oestrus detection herd fertility and embryonic mortality in dairy cows. *Br. Vet. J.* **135**, 559-567.
- 37) SHIMADA, K., IZAIKE, Y., SUZUKI, O., KOSUGIYAMA, M., TAKENOUCHE, N. OHSHIMA, K. and TAKAHASHI, M. 1992. Effect of milk yield on growth of multiple calves in Japanese Black Cattle (Wagyu). *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **5**, 717-722.

Effect of active immunization against ovine inhibin α subunit on ovarian activity, and application of inhibin immunization to superovulation and twinning in Japanese Black cows

By

Naoki TAKENOUCHI*, Kazunaga OSHIMA**, Kazuhiro SHIMADA***,
Masayoshi TAKAHASHI***, Ikuo DOMEKI**** and Yasunori MONJI****

(Received May 22, 2003/Accepted September 24, 2003)

Summary : Inhibin immunization increases the ovulation rate in cows. In this study we investigated the effect of active immunization of Japanese Black cows against the recombinant ovine inhibin α subunit on ovarian activity. In addition we examined whether inhibin immunization could be applied to superovulation and twinning in Japanese Black cows. Cows (n=8) were injected with 2 ml of inhibin vaccine as primary injection at estrous day, followed by a booster injection (2 ml) 4 weeks later. The control cows (n=5) received adjuvant only. Ovaries were examined by rectal palpation and using ultrasonography during 2 to 5 months after primary. Superovulation and twinning were attempted on 2 and 4 of 23 estrous cycles in immunized cows, respectively. The cows were run with artificial insemination at the day of estrus for both trials, and embryos were recovered for superovulation at 8 days after artificial insemination. The number of estrous follicles ($10\text{ mm} \leq$) and corpora lutea (7.0 ± 1.9 , 3.1 ± 1.2 , 23 cycles) of the immunized cows were higher than those of control cows (1.1 ± 2.2 , 1.1 ± 1.4 , 16 cycles). Multiple follicular development and ovulation were observed during successive estrous cycles in the immunized cows. In the superovulation trial, nine and 4 transferable embryos were recovered from each cow. The transferred embryos resulted in the birth of three calves. One of 4 cows of the twinning trial gave birth to twin calves. In conclusion, active immunization against the recombinant ovine inhibin α subunit induces successive multiple development of estrous follicles and multiple ovulation in Japanese Black cows. These experiments also show that inhibin immunization can be applied for superovulation in Japanese Black cows. In addition one twinning was induced in immunized cows. The present study is the first reported application of inhibin immunization resulting in successful superovulation in domestic animals.

Key Words : inhibin immunization, ovarian response, twinning, superovulation, cow

* National Agricultural Research Center for Tohoku Region, National Agricultural Research Organization

** National Agricultural Research Center for Western Region, National Agricultural Research Organization

*** National Institute of Livestock and Grassland Science, National Agricultural Research Organization

**** Department of Zootechnical Science, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture