

牛における早期妊娠因子(Early Pregnancy Factor)の検出 とその臨床応用

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	清水, 恭子 後藤, 太一 高橋, 寿太郎
巻/号	43巻5号
掲載ページ	p. 325-329
発行年月	1990年5月

牛における早期妊娠因子 (Early Pregnancy Factor) の検出とその臨床応用

清水恭子¹⁾ 後藤太一²⁾ 高橋壽太郎¹⁾ 安田泰久¹⁾

(平成2年1月26日受理)

Detection of Early Pregnancy Factor in Cattle and Its Clinical Application
KYOKO SHIMIZU*, TAICHI GOTO, JUTARO TAKAHASHI and YASUHISA YASUDA (* Faculty of
Agriculture, Iwate Univ., 3-18-8, Ueda, Morioka-shi, Iwate 020)

SUMMARY

Early pregnancy factor (EPF) was first detected by Morton et al. in the maternal serum within 24-48 h after fertilization, and they demonstrated by the rosette inhibition test that EPF augments the immunosuppressive action of an antilymphocyte serum (ALS). Ever since, EPF has been detected in sera of various animal species. In cattle, EPF has also been detected, but detailed reports are few, and supplementary examination of clinical applications has not been published. In the current investigation, we first tested sera from six cattle 15 days after artificial insemination and from six nonpregnant cattle, and analyzed rosette inhibition titers (RIT) between pregnancy and nonpregnancy. As a result, statistically significant difference was noted between pregnancy and nonpregnancy. Secondly, for clinical application, we measured the EPF activity in pregnant sera from day 2 to 38 after artificial insemination. The EPF activity was first demonstrated at day 2 after artificial insemination, and it persisted to day 38 when the diagnosis by conventional pregnancy tests was able to be performed. Then the EPF transition of recipient cattle after embryo-transfer was investigated. In two recipient cattle, no EPF activities could be detected by day 14 after artificial insemination, and they were diagnosed as nonpregnancy. In the other two, EPF activity was continued, and pregnancy was clinically diagnosed. Another one showed EPF activity by day 15, but the activity then disappeared, which suggested an early embryonic death.

These results demonstrate that it is capable to diagnose pregnancy by EPF, and that it is useful to monitor viable embryos in cattle.—**Key Words:** early pregnancy factor, EPF, pregnancy diagnosis.

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 43, 325~329 (1990)

要 約

早期妊娠因子 (Early Pregnancy Factor; EPF) は、MORTON らによって受精後 24 ~ 48 時間の母体の血清中に検出され、ロゼット抑制試験において抗リンパ球血清 (Antilymphocyte Serum; ALS) のリンパ球抑制作用を増強することが報告された。以来、多くの動物種に検出され牛においても報告されているが、詳細な報告はみられず、また臨床的応用はほとんど行われていない。著者らは、第一に、人工授精 15 日目の牛 6 頭と対照の非妊娠牛 6 頭についてロゼット抑制力価 (Rosette Inhibition Titer; RIT) の反復測定を行い、妊娠牛と非妊娠牛間の RIT 値について分析を行った。その結果、妊娠牛と非妊娠牛で RIT 値に有意な差が認められた。次に臨床的応用として人工授精後 2 日から 38 日目までの妊娠牛の EPF 活性の動態を調べたところ、人工授精 2 日目から EPF 活性が検出され、従来の妊娠診断法の適用できる妊娠 38 日目までその活性が持続した。さらに、受精卵移植牛における EPF 活性の推移を検討した。すなわち、2 頭では移植後 14 日まで EPF の活性が認められず、臨床診断により非妊娠と判定された。ほかの 2 頭は移植後 28 日まで EPF の活性が持続し、臨床診断により妊娠が確認された。また、ほかの 1 頭は移植後 15

¹⁾ 岩手大学農学部 (盛岡市上田 3-18-8)

²⁾ 小岩井農牧(株)技術研究センター (岩手郡雫石町 26)

Key Words: 早期妊娠因子, EPF, 妊娠診断.

日まで EPF 活性を示したが、その後 EPF 活性は消失し早期の胚死亡が示唆された。

以上の成績から、EPF により妊娠診断が可能であること、ならびに EPF が生存胚のモニターとして有効であることが指摘された。

早期妊娠因子 (Early Pregnancy Factor; 以下「EPF」と略す。) はロゼット抑制試験において抗リンパ球血清 (Antilymphocyte Serum; 以下「ALS」と略す。) のもつリンパ球抑制を増強する物質で、妊娠の早期に母体の血清に出現する。1974年、MORTONら⁷⁾によって報告され、以来、ヒト^{10,16)}、マウス⁸⁾、羊^{9,12)}など多くの動物種に存在が認められている。

牛における EPF は、NANCARROWら¹¹⁾、GEORGIEVAとSTEFANOV¹⁾、高田ら¹⁷⁾、伊丹ら³⁾、肥田ら²⁾、森山ら⁶⁾、KLIMAら⁴⁾などが報告している。NANCARROWら¹¹⁾ならびにGEORGIEVAとSTEFANOV¹⁾は、それぞれロゼット抑制試験を用いて EPF の検出を報告しているが、EPF 検出法についての十分な検討がなされず、臨床的応用については全く触れていない。いっぽう、伊丹ら³⁾と肥田ら²⁾は、臨床的応用として、受精卵移植を施した供試牛の EPF 活性の推移ならびに多胎妊娠牛とロゼット抑制力価 (Rosette Inhibition Titer; 以下「RIT」と略す。) との関連性について報告している。しかし、その結果についての追試はまだ行われていない。

先に、著者らは、MORTONら¹⁰⁾の変法により牛の EPF 検出を報告した⁶⁾。そこで、この検出法を用いて人工授精後 15 日目の牛血清の EPF 活性を反復測定し、妊娠牛と非妊娠牛間、牛の個体差および妊娠と個体との交互効果について分析を行った。さらに、臨床的応用として人工授精後 2, 7, 12, 18, 27, 32 および 38 日目の血清中の EPF 活性を測定し、従来の妊娠診断法が適用される以前の妊娠日齢における EPF 活性を検討した。また、受精卵移植牛の血清中の EPF 活性の推移を調べて、受卵牛における生存胚ならびに胎子のモニターとして EPF の応用性を追求した。

1. 材料および方法

1) 材料

(1) リン酸緩衝生理食塩液 (Phosphate Buffered Saline; 以下「PBS」と略す。): あらかじめ 10 倍濃度の PBS を作製しておき、実験の都度、これを 10 倍に希釈して調整しオートクレーブにより滅菌して使用した。

(2) 牛血清、末梢血リンパ球 (以下「リンパ球」と略す。) および赤血球は、小岩井農場所有のホルスタイン種から採血し調整した。なお、被検血清の内訳は次のとおりである。

- a. 人工授精を施した雌牛 6 頭から、授精日を 0 日として人工授精後 15 日目の血液を採取し、血清を分離した。
- b. 人工授精を施した雌牛 1 頭から、人工授精後 2, 7,

12, 18, 27, 32 ならびに 38 日目の血液を採取し、血清を分離した。

c. 受精卵移植を施した受卵牛 5 頭から移植直前ならびに下記日齢の血液を各牛からそれぞれ採取し、血清を分離した。

移植後 4, 8, 14 日目; 5, 7, 13, 28 日目; 3, 15, 21 日目; 5, 10, 21, 28 日目; 5, 15, 28 日目。

d. 妊娠していないことが明らかな雌牛 6 頭から非妊娠対照の血液を採取し、血清を分離した。これらの被検牛 (a, b, c) は、人工授精後 35 日目に直腸検査で、さらにその後の臨床経過によって妊娠を確認した。

(3) 羊: ロゼット形成および補体の吸収に使用する赤血球は、岩手大学農学部飼料学教室所有の成熟コリデル種雄 2 頭から採取した。

(4) モルモット: 補体として、本教室で飼育しているハートレイ系雄モルモット 4 頭の血清を用いた。

2) 方法

(1) 血清の分離: 血液は真空採血管を使用し、頸静脈から採取した。4℃で 8~10 時間放置した後、3,000 rpm, 15 分間遠心し血清を分離した。血清は 56℃で 30 分間非働化した後、-40℃のディープフリーザーに保存した。

(2) リンパ球浮遊液: 実験当日、去勢牛の頸静脈からヘパリン加真空採血管を使って採血した。これを PBS で 2 倍に希釈し、あらかじめ試験管に分注した 3 ml のフィコール液上に 5 ml 重層し、1,500 rpm, 30 分間遠心分離した。中間層に形成されたリンパ球層を集め、PBS を 15 ml 加え、1,500 rpm, 10 分間遠心分離した。上清を除去しリンパ球を再び浮遊させた後、蒸留水 0.5 ml を加えて 5 秒間溶血した後、PBS を 25 ml 加えた。これを 1,300 rpm, 5 分間遠心分離し、上清をアスピレーターで除去した。同様の操作でさらに 2 回リンパ球を洗浄して、最終の細胞濃度を 1.5×10^7 /ml に調整した。

(3) ALS の希釈列: ALS は、先に森山らが作製した ALS-SI⁶⁾ を使用した。ALS は実験当日 PBS で 100 倍に希釈した後、2 倍階段希釈した。2⁰ から 2¹⁰ までの希釈列と、PBS のみのコントロール 2 本を使用した。

(4) 補体: 成熟雄モルモット 4 頭から心臓より 4 ml ずつ採血した。4℃, 30 分間放置した後、3,000 rpm, 10 分間遠心分離し、血清を分離した。次に、ヘパリン加真空採血管で採取した牛および羊の末梢血を 2,500 rpm, 5 分間遠心分離し、上清と白血球層を除去した。これに PBS 10 ml を加え、2,500 rpm, 5 分間遠心分離し上清と白血球層を吸引除去した。同様に、2 回洗浄

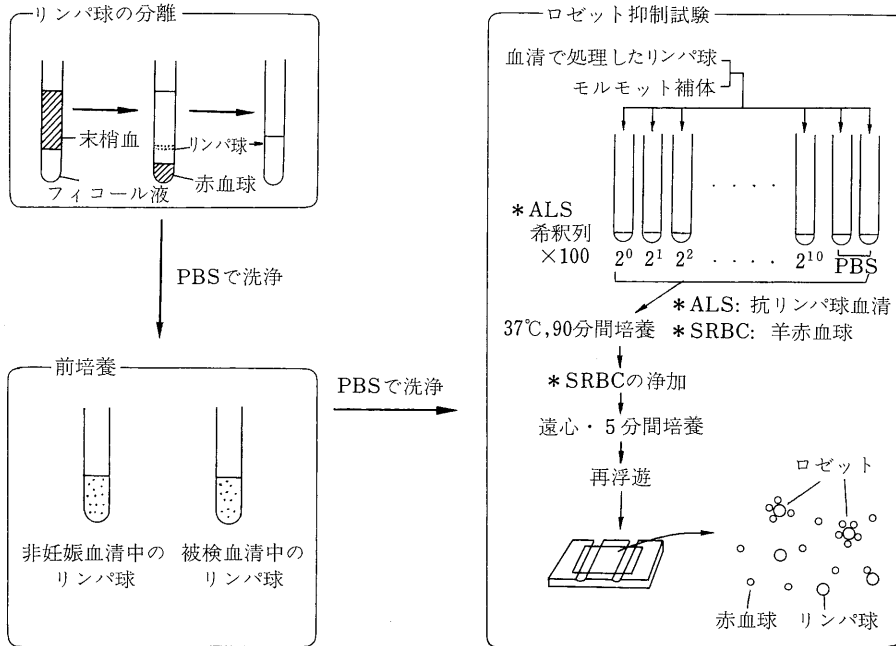


図1 ロゼット抑制試験の模式図

作して赤血球ペレットを作製し 4°C に保存した。モルモット血清 2 容に対し、牛および羊赤血球ペレットを 1 容ずつ加え、15 分ごとに転倒混和しながら 4°C、2 時間の吸収操作を実施した。これを 2,500 rpm、10 分間遠心分離して血清を採取し、-100°C のディープフリーザーに保存した。補体の使用期限は 2 カ月とした。

(5) 羊赤血球浮遊液：羊の頸静脈から採血し、直ちに等量以上のアルサー液と混和して 4°C に保存した。これを 2,500 rpm、5 分間遠心分離し、上清と白血球層を除去した。さらに PBS で 3 回洗浄し、最終細胞濃度 2.0×10^8 細胞/ml に調整した。

(6) ロゼット抑制試験 (図 1)

a. 前培養：前述の 1.5×10^7 細胞/ml に調整した牛リンパ球浮遊液を 1,300 rpm、5 分間遠心分離し上清を除去した。ここに、あらかじめ PBS で 2 倍に希釈した被検血清をリンパ球 1.5×10^7 細胞当たり 1.0 ml の割合で加え、ウォーターバス中で 37°C、30 分間前培養した。

b. ALS による培養：上述の前培養を行ったリンパ球浮遊液を室温に戻し、PBS を使用して 1,300 rpm、5 分間の遠心で 3 回洗浄し、最終細胞濃度 1.0×10^7 細胞/ml に調整した。いっぽう、別に配列した試験管に ALS 希釈列をそれぞれ 0.25 ml ずつ分注しておき、これに調整したリンパ球浮遊液を 0.10 ml ずつと、3 倍に希釈した補体 0.05 ml を加え 37°C、90 分間培養した。陰性対照には ALS の代わりに PBS を使用した。

c. ロゼット形成：培養終了後室温に戻し、 2×10^8 細胞/ml に調整した羊赤血球浮遊液を 0.10 ml ずつ加え、

表 1 妊娠牛 (人工授精後 15 日目: 牛 No. 1~6) と非妊娠牛 (牛 No. 7~12) の血清における RIT (ロゼット抑制力値) 値

区分	牛 No.	RIT 値	直腸検査結果	備考
妊牛	1	75	+	妊娠中
	2	98	+	妊娠中
	3	65	+	流産
	4	47	+	分娩
	5	96	+	分娩
	6	66	+	分娩
非妊牛	7	12	-	-
	8	11	-	-
	9	13	-	-
	10	32	-	-
	11	22	-	-
	12	33	-	-

注：RIT 値の数字は、各被検牛について、同一の血清を反復測定 (2 回) した値を示す

1,000 rpm、5 分間遠心した後、室温で 5 分間培養した。
d. ロゼット形成率の測定：培養終了後、沈渣を静かに再浮遊させた。これに 10% グルタルアルデヒド 0.03 ml を加えて固定し、氷浴中に保存した。測定時に 1% ゲンチアナバイオレット 0.03 ml を加えた。この細胞浮遊液 1 滴を改良型ノイバウエル式血球計算盤にとり、顕微鏡下で観察した。リンパ球 1 個の周囲に 3 個以上の羊赤血球が附着したものをロゼットと判定し、試験管 1 本

につき 1,000 個のリンパ球についてロゼット数を測定した。

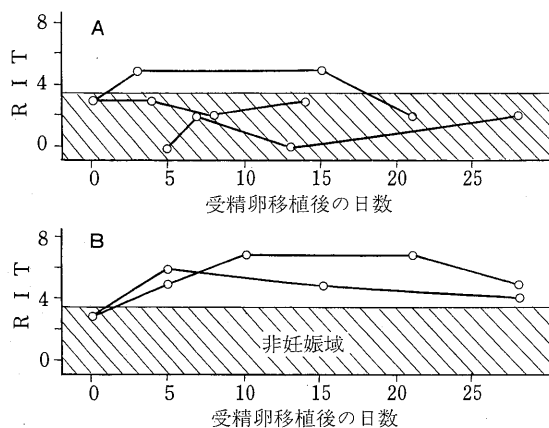
e. RIT の算出：対照のロゼット形成率に対し 75% 以下にロゼット形成が抑制されている試験管について、ALS の最大希釈倍数の対数 (\log_2) をとり、これを RIT とした。

2. 成績

(1) 人工授精 15 日目の牛血清における EPF の検出：各被検牛について、同一の検体を使用して 2 回の反復測定を行ったところ、表 1 に示す結果が得られた。すなわち妊娠牛の RIT 値はすべて 4 以上を示しており、非妊娠牛では 3 以下であった。この実験に用いた妊娠牛はすべて、人工授精 35 日目の直腸検査で妊娠と診断された。このうち 1 頭は妊娠 2 カ月までは直腸検査により妊娠が確認されていたが、その後流産をおこした。ほかの妊娠牛のうち 2 頭はすでに分娩し、残りの 3 頭も現在妊娠が継続中である。

これらの結果について二元配置法による推計学的分析を行ったところ、妊娠牛と非妊娠牛間では 1% の危険率で有意差が認められたが、個体差ならびに妊否と個体との交互効果については 5% の危険率で有意差は認められなかった。すなわち、ロゼット抑制試験による EPF 活性によって、人工授精 15 日目の牛血清で妊娠の診断が可能であり、この試験系で牛の個体差による影響はあらわれなかった。

(2) 人工授精後の EPF 活性の動態：人工授精後 2 日目で EPF 活性が検出され (RIT = 6), 38 日目時点まで活性が持続した (RIT = 5, 5, 5, 7, 5, 7)。



A: 受胎しなかったもの

B: 直腸検査により妊娠が確認されたもの。

注: RIT はロゼット抑制力価、数字は抗リンパ球血清の最大希釈倍数の対数 (\log_2)

図 2 受卵牛の RIT 値の推移

この牛は、人工授精後 35 日目の直腸検査によっても妊娠が確認されており、現在、妊娠が継続中である。

(3) 受卵牛の血清中 EPF 活性の推移：牛 2 例は受精卵移植後も RIT 値の上昇はみられず、EPF の活性は認められなかった (図 2-A)。これらの牛は移植後 14 日目に発情の回帰がみられた。ほかの牛 2 例は移植後 EPF の活性が観察され、この活性は移植後 28 日目まで持続した (図 2-B)。この 2 例の牛は直腸検査でいずれも妊娠が確認されており、現在、妊娠が継続中である。残りの 1 例は移植後 15 日目まで EPF の活性が認められたが、その後 EPF の活性は消失し、移植後 21 日目に発情の回帰が認められた (図 2-A)。

3. 考察

牛の妊娠診断は従来、発情の停止 (nonreturn 法)、人工授精 1 カ月以降に実施する直腸検査、プロジェステロン値の測定ならびにその後の臨床的経過によって行われている。このうち、次回の発情の欠損が最も早期の妊娠徴候とされているが、妊娠牛でも発情を示すことがあったり、鈍性発情や発情の見逃し等があるため、発情周期のみに頼った診断は危険とされている。さらに、これ以前の妊娠時期の診断法はまだ確立されていない。そのため、従来の諸診断では受精の有無や胚の死亡を早期に検出することは不可能とされていた。

1979 年、MORTON らは、羊で、交配 24 時間後に EPF の活性が認められることを報告した⁹⁾。このなかで、彼らは受精、早期の胚死滅、妊娠維持の診断におけるロゼット抑制試験による EPF 活性の有用性を示唆している。また、NANCARROW ら¹¹⁾は、羊で外科的処置およびホルモン処置により胚を除去したときの EPF 活性の推移を報告し、外科的処置の胚除去後 2~4 時間以内に EPF 活性の低下がみられ、48 時間以内には非妊娠域まで低下したと報告している。

現在、EPF は受精卵の存在に直接関係するものと考えられている。この考えに基づいて、ロゼット抑制試験による EPF 活性を利用して胚の死亡の検出ならびに受精率の調査が行われており^{14,15)}、妊娠早期の胚の高い死亡率が推定されている¹³⁾。

本研究では、第一に EPF による早期妊娠診断を行った。その結果、非妊娠血清と妊娠 15 日目の血清との間で RIT 値に差がみられ、この差は推計学的に有意であることが指摘された。このことから、ロゼット抑制試験による EPF 活性から妊娠を診断できることが判明した。次に、人工授精後の EPF の動態で、人工授精後 2 日目から EPF の活性が検出された。この EPF 活性は、直腸検査により妊娠診断が可能な時期まで持続した。このことから、EPF は、従来の妊娠診断法が適用される時期よりも早期の段階で妊娠診断に有効であることが示

唆された。

さらに、EPF によって生存胚の確認が可能と考えられるので、受精卵移植を行ったときの生存胚のモニターとしての利用性を検討した。その結果、受胎の成否と EPF 活性の有無はよく一致した。また、受胎しなかった 1 例では、一時的に EPF 活性が検出され、発情の遅延も観察された。この例は、早期の胚の死亡が疑われた。

以上のことから、EPF が受卵牛の生存胚のモニターとして有効であることが示唆された。

Kochら⁵⁾は、豚で子宮内よりの卵子の回収前後と、胚移植後の RIT 値の推移について報告している。それによれば、卵子の回収の直前までは RIT 値が妊娠域にあったが、回収 24 時間以内に非妊娠域まで低下した。

いっぽう、受卵豚では胚移植後 2 から 4 時間以内に妊娠域まで RIT 値は上昇したが、24 から 28 時間に非妊娠域に低下し、その胚は着床しなかった。さらに、受精卵子の数と RIT 値、栄養胚の数と RIT 値の間にそれぞれ相関が認められたと報告している。この点について、牛において、胎子の数によって RIT 値に差がみられるという報告²⁾があるが、今後の検討が必要であろう。

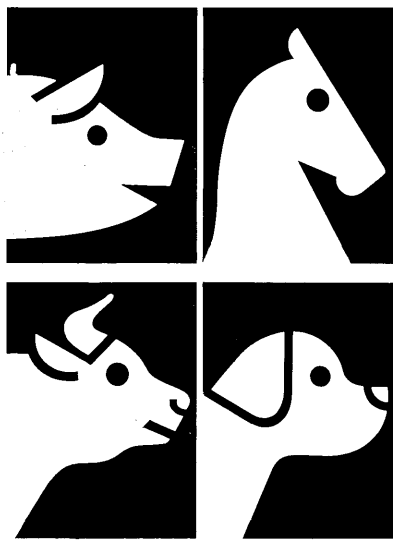
引用文献

- 1) GEORGIEVA, R. and STEFANOV, D.: *10th Int. Cong. Anim. Reprod. and A.I.*, 83~85 (1984).
- 2) 肥田良明, 森岡宏至, 森 純一ほか: 第 74 回家畜繁殖学会講演要旨, 92 (1988).

- 3) 伊丹哲哉, 森岡宏至, 森 純一ほか: 第 2 回日本基礎生殖免疫学会講演要旨, 43 (1987).
- 4) KLIMA, Z., TIEMANN, U., KATZWINKEL, S., et al.: *4th International Congress of Reoroductive Immunology, Kiel* (1989).
- 5) KOCH, E., NIEMANN, H. and ELLENDORFF, F.: *Anim. Reprod. Science.*, 11, 195~205 (1986).
- 6) 森山泰穂, 清水恭子, 高橋壽太郎ほか: 第 3 回日本基礎生殖免疫学会抄録集, 39 (1988).
- 7) MORTON, H., HEGH, V. and CLUNIE, G. J. A.: *Nature (Lond.)*, 249, 459~460 (1974).
- 8) MORTON, H., HEGH, V. and CLUNIE, G. J. A.: *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 193, 413~419 (1976).
- 9) MORTON, H., NANCARROW, C. D., SCARAMUZZI, R. J., et al.: *J. Reprod. Fert.*, 56, 75~80 (1979).
- 10) MORTON, H., TINNEBERG, H. R., ROLFE, B., et al.: *J. Reprod. Immunol.*, 4, 251~261 (1982).
- 11) NANCARROW, C. D., EVISON, B. M., SCARAMUZZI, R. J., et al.: *J. Reprod. Fert.*, 57, 385~389 (1979).
- 12) NANCARROW, C. D., WALLACE, A. L. C. and GREWAL, A. S.: *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 30, 191~199 (1981).
- 13) ROBERTS, T. K. and SMART, Y. C.: *Reproductive immunology.*, 157~169 (1983).
- 14) ROLFE, B. E.: *Fert. Steril.*, 37, 655~660 (1982).
- 15) SMART, Y. C., FRASER, I. S., ROBERTS, T., et al.: *Clin. Reprod. Fertility.*, 1, 177~184 (1982).
- 16) SMART, Y. C., RBERTS, T. K., FRATER, I. S., et al.: *Fert. Steril.*, 37, 779~785 (1982).
- 17) 高田直和, 森 純一, 沢田 勉ほか: 第 78 回日本畜産学会講演要旨, 38 (1986).

新発売

豚・馬・牛・犬の消化管内線虫 肺虫駆除に!!



広範囲駆虫剤〈フルベンダゾール製剤〉

フルエキサル® 散 5%

フルエキサル® 散 50%

フルエキサル® 錠

特長

- 広範囲で優れた駆虫効果。● 作用は殺虫的。
- 安全性が高く、嗜好性が良い。



藤沢薬品工業株式会社
特薬事業部

東京都中央区日本橋本町3-4-6 ニューカワイビル 〒103
TEL (03)279-0649 (ダイヤルイン)
大阪市中央区道修町3-4-7 〒541
TEL (06)201-4613 (ダイヤルイン)