
ウシ子宮の胚受容能力に及ぼす暑熱-酸化ストレスの影響評価とストレス防除

北海道大学大学院農学研究院・助教 唄 花子

■ 目的

夏季の高温は、家畜生産に悪影響を及ぼす。現在までに、母体卵巣・卵管組織、初期胚発育への影響に関する研究は進んでいるが、子宮組織への影響に関する知見はない。反芻動物では、着床前の胚が産生するインターフェロン・タウ(IFNT)が、子宮上の受容体(IFNAR)を介して黄体退行を抑制し、妊娠成立に寄与するが、本機構に及ぼす暑熱ストレスの知見も少ない。一方、暑熱ストレスに伴う酸化ストレスについて、生産性の低下や胚発育への悪影響が報告されており、子宮機能への影響も推察される。本研究では、暑熱ストレス負荷が子宮の胚受容能力に及ぼす影響を調べるため、酸化ストレス因子の動態と併せてIFNARやIFN応答性因子(ISGs)の発現を解析するとともに、酸化ストレス抑制による子宮機能へのストレス軽減を試みることを目的とした。

■ 方法

1. 子宮内膜細胞の単離・培養：屠場よりウシ子宮組織を採取し、組織片培養法により子宮内膜上皮および間質細胞を単離・培養した。細胞は5回の継代以内に使用した。
2. 暑熱負荷処理：通常条件を、38.5°C、暑熱条件を40.5°Cとし、暑熱負荷時間は、3, 6, 12時間とした。負荷を行わない区を対象区とした。
3. mRNA発現解析：暑熱ストレスの指標として熱ショック性タンパク質(HSP)、酸化ストレスの指標として酸化還元酵素(SOD)の発現をReal-Time PCRにより解析した。妊娠認識力を評価するため、IFNAR, ISGs, COX2の発現を同様に解析した。
4. 細胞増殖アッセイ：子宮細胞への抗酸化物質の添加効果を細胞増殖アッセイにより評価した。細胞は96wellプレートに 1×10^4 個/mLの濃度で播種した。 β -メルカプトエタノールおよびシステアミンを調整した培地に交換し、24時間後に450nmの吸光度を測定した。
5. 統計解析：統計解析ソフトStatViewを用いてDunnettの多重比較を行った。危険率が5%以下の場合を有意差有りとした。

■ 結果および考察

1. 暑熱-酸化ストレス遺伝子の発現変化：子宮内膜上皮細胞において、HSP70は暑熱負荷3時間で、HSP90は暑熱負荷6および12時間で発現が有意に増加した。このことから、暑熱ストレスに対してまずHSP70が反応し、その後HSP90が反応して細胞保護に働くことがうかがえる。SODの発現に有意差は認められなかったが、暑熱負荷時間の延長に伴い増加する動態を示し、子宮細胞においても暑熱負荷に伴い酸化ストレスが増加する可能性が示唆された。
2. 妊娠認識関連遺伝子の発現変化：子宮細胞の胚受容能力を評価するため、IFNAR, ISGs, COX2の発現をReal-Time PCRにより解析した。本研究を行うにあたり、暑熱-酸化ストレス増加に伴うIFNARや、ISGsの発現低下を予想したが、Mx2を除き有意な発現変化は認められなかった。Mx2については暑熱負荷により発現が有意に低下しており、今後詳細に検討する必要がある。
3. 抗酸化物質の効果の検証：抗酸化物質の添加が、子宮細胞に与える効果を検証したが、今回用いた抗酸化物質では効果が認められなかった。今後は他の抗酸化物質や処置時間の検討など更に解析を続けたい。

■ 結語

本研究結果から、ウシ子宮細胞においても暑熱ストレスの増加に伴い酸化ストレスが増加する可能性が示唆されたが、暑熱-酸化ストレスの増加と母体子宮の妊娠認識力の関連を明確に示す結果は得られなかった。今後は、暑熱負荷とIFNTへの応答性について、また効果のある抗酸化物質についても詳細に検討したい。