

# 人工下垂体前葉による性腺刺激ホルモン放出ホルモン評価系の確立 ：不受胎牛の原因究明

鳥取大学農学部・准教授 樋口 雅司

## ■ 目的

人工授精(AI)で生産される牛の受胎率は年々低下しており、さまざまな方法で繁殖成績を上げる取り組みがなされているが未だ解決には至っていない。一方、臨床症状のない長期不受胎牛の中には、AIに不可欠な性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)製剤の効きが悪い牛の存在も報告されている。GnRH 製剤は牛下垂体前葉を刺激し、内因性の 2 種類の性腺刺激ホルモン「卵胞刺激ホルモン(FSH)」および黄体形成ホルモン(LH)」を产生する細胞の割合および FSH/LH 分泌量を増加させる作用がある。つまり、GnRH は FSH/LH を通して卵胞発育と排卵を同期化して繁殖効率を上げる効果があるため、その作用不足があると受胎が成立しない。しかしながら、下垂体前葉は脳直下にある生存に不可欠な 6 種類のホルモンを分泌する臓器であるが故、これまで動物が生きたままの状態で下垂体前葉への GnRH 作用およびその阻害因子を調べる手立ては無かった。最近、我々はウシ下垂体幹細胞から“人工下垂体前葉”的作製に成功し、体外(=実験室)で下垂体機能を評価する準備を整えた。そこで本研究では、人工下垂体前葉による GnRH の評価系を確立し、その系を用いて長期不受胎牛の血液における不妊因子の存在を調べた。

## ■ 方 法

黒毛和種雌牛の下垂体前葉から初代細胞を調製してウシ下垂体幹細胞を分離した。分離した細胞は浮遊培養に供して凝集させ、人工下垂体前葉を作製した。また、以前の研究で樹立した不死化ウシ下垂体幹細胞からも人工下垂体前葉を作製した。準備した人工下垂体前葉は 30 分間 GnRH 類縁体によって刺激した後、RT-PCR により *Lhb* 遺伝子の発現、免疫蛍光分析により LH $\beta$ 陽性細胞の割合および酵素結合免疫吸着測定法により培養液中の LH 分泌量を測定した。また、人工下垂体前葉の培養系に添加する血清を長期不受胎牛のものに変更して人工下垂体前葉の変化を解析した。

## ■ 結果および考察

初代ウシ下垂体幹細胞および不死化ウシ下垂体幹細胞の浮遊培養を行ったところ、前者由来の人工下垂体前葉でのみ *Fshb* および *Lhb* を含む全てのホルモン遺伝子が発現し、LH $\beta$ 陽性細胞が検出された。初代細胞由来の人工下垂体前葉への GnRH 刺激では、人工下垂体前葉に占める LH $\beta$ 陽性細胞の割合は変化しなかったが、分泌される LH 濃度が上昇した。以上より、人工下垂体前葉の作製材料には不死化細胞よりも初代ウシ下垂体幹細胞の方が適していることがわかった。最後に、長期不受胎牛血清で人工下垂体前葉を培養したところ、空胎期間の長い雌牛の血清では LH 産生細胞数の割合が低下することが明らかになり、不妊因子は血清中に存在することが示唆された。

## ■ 結語

本研究では、人工下垂体前葉を用いた GnRH 作用評価系を確立し、血清中の不妊因子候補を見出した。この成果は全国的な問題である牛の不受胎要因を解明するための重要な知見であり、今後の展開により長期不受胎の解決に資することが期待される。