

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18785

研究課題名(和文)非妊娠豚を用いた人為的初乳作出法の開発

研究課題名(英文)Study on hormonal induction of lactation in non-pregnant pigs

研究代表者

野口 倫子(Noguchi, Michiko)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：40506721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非妊娠豚に人為的に泌乳を誘起することが可能かどうか検討を行うため、持続性エストロゲン製剤(EDP)の単回投与により作出した偽妊娠豚を応用し、偽妊娠豚に泌乳を誘起するための薬剤投与条件の検討および得られた乳成分の解析を行った。その結果、61.5%の供試豚で泌乳が認められた。偽妊娠豚から得られた乳中IgG濃度は黄体退行処置後24時間目に最高値を示し、その値は自然分娩豚から得られた初乳中濃度に比べて有意に高値を示した。以上のことから、非妊娠豚に人為的に泌乳を誘起することが可能であることが明らかとなった。さらに、非妊娠豚から得られた乳中には高濃度のIgGが含まれることが判明した。

研究成果の概要(英文)：This study examined the possibility of induction of artificial lactation in non-pregnant sows. Pseudopregnant sows induced with intramuscularly injection of 30 mg estradiol dipropionate (EDP) were divided into 4 groups; additional treatment of 5 mg EDP on 5 (n=4) or 10 days (n=3) days before PGF2alpha treatment or additional treatment 10 mg EDP on 5 (n=3) or 10 days (n=3) days before PGF2alpha treatment. Artificial lactation was induced 61.5% animals. IgG concentrations in milk in pseudopregnant sows showed the peak at 24-h after the first PGF2alpha treatment and the peak value was significantly high compared than that in colostrum in pregnant sows. These results indicates that additional treatment of EDP in pseudopregnant pigs can induce artificial lactation. This study also show the milk obtained from pseudopregnant pigs contain high amount of IgG as well as colostrum in pregnant pigs.

研究分野：臨床繁殖学

キーワード：ブタ 初乳 泌乳誘起

1. 研究開始当初の背景

ブタは胎盤構造がヒトとは異なり、初乳を介してのみ免疫グロブリン(Ig)が母体から子ブタへ移行するため、新生子豚が初乳を十分量摂取できない場合には、生存率の低下や発育不良などのリスクが増加する。しかし、近年の養豚業界では、1回の分娩あたりに娩出される子豚数が従来の品種に比べて多い多産系品種が開発・販売されており、十分な量の初乳を飲めない子豚が養豚生産現場では増加している。ウマでは、プロゲステロン、エストラジオール17 β およびスルピリドを投与し、分娩前のホルモン動態を再現することで、非妊娠馬から質の良い乳を採取できる(Chavatte-Palmer et al., J. Vet. Intern. Med., 2002)と報告されている。そこで、ブタにおいても、非妊娠動物(偽妊娠豚)を応用し、人為的に泌乳を制御可能な動物モデルを作出することができれば、緊急時の乳母として有用ではないかという着想に至った。

ブタにおいては、妊娠末期のエストロゲン濃度の上昇、分娩時のプロゲステロン濃度の減少および分娩時のプロラクチン濃度上昇が乳腺の発達および泌乳に特に重要な役割を果たしている(DeHoff et al., Dom. Anim. Endocrinol., 1986)。先行研究では、吉草酸エストラジオール(EV)の5日間連続投与により作出した偽妊娠豚において、PGF_{2 α} を投与するとプロラクチン濃度が一過性に上昇することを示している(Boulton et al., Physiol. Behav., 1997; Burne et al., Anim. Reprod. Sci., 1999)。しかし、射乳に関する報告はなく、我々が行った研究においても、EDPにより誘起した偽妊娠豚へのPGF_{2 α} 投与後は、乳腺の腫脹および射乳は認められていない。そこで、我々は、持続性エストロゲン製剤(EDP)の単回投与により偽妊娠誘起したブタ(Noguchi et al., Reprod. Biol. Endocrinol., 2011)において、発情周期31日目(EDP投与後21日目)にEDP 10 mgを追加投与し、さらに、同日PGF_{2 α} を12時間間隔で2回筋肉内投与した結果、初回PGF_{2 α} 投与24時間目には速やかな黄体退行とともに、肉眼的に明らかな乳腺の腫脹ならびに射乳が確認された。このことは、黄体退行処置前のエストロゲン濃度が、偽妊娠豚に泌乳を誘起させる作用がある可能性を示唆している。しかし、泌乳誘起のためのエストロゲン投与条件および泌乳誘起されたブタの内分泌動態については全く知見がない。

2. 研究の目的

本研究では、EDPの単回投与により作出した偽妊娠豚を応用し、初乳作出のための薬剤投与条件の検討および得られた乳成分の解析を行い、簡便かつ安定的に乳の採材可能な条件を明らかにするために、以下の手順で研究を行った。さらに、初乳作出のための投与条件がPGF_{2 α} 投与前後の内分泌動態に及ぼ

す影響についても検討を行った。

(1) 黄体退行前のエストロゲン投与量およびエストロゲン投与から黄体退行までの期間が泌乳に及ぼす影響の検討

(2) 偽妊娠豚から得られた乳の構成成分および免疫グロブリン濃度変化の検討

(3) 泌乳誘起処置をされた偽妊娠豚の末梢内分泌動態の変化

3. 研究の方法

正常発情周期を営む種雌豚(ランドレース種, 3~9産, n=19)において、Day 10.3 \pm 0.2(排卵日=Day 0)にエストラジオールプロピオン酸エステル(EDP; オパホルモンデポー, あすか製薬株式会社)30 mgを単回筋肉内投与し、偽妊娠状態を誘起した。

まず、13頭の偽妊娠豚は無作為に以下の4群に分けた。EDP 5 mg投与後5日目にPGF_{2 α} 投与(n=4)、EDP 10 mg投与後5日目にPGF_{2 α} 投与(n=3)、EDP 5 mg投与後10日目にPGF_{2 α} 投与(n=3)およびEDP 10 mg投与後10日目にPGF_{2 α} 投与(n=3)。PGF_{2 α} (パナセランHi, Meiji Seikaファルマ株式会社)は、Day 36.8 \pm 0.8に12時間間隔で2回筋肉内投与した。初回PGF_{2 α} 投与後7日間は1日2回、泌乳状況の観察と泌乳が認められた個体については用手法により搾乳を行った。

すべての動物は、初回PGF_{2 α} 投与後24時間目から泌乳状況の観察を行い、泌乳が認められた個体については初回PGF_{2 α} 投与後7日目まで12時間間隔で搾乳を行った。自然条件下での搾乳時間は15分を限りとし、各搾乳量を記録した。搾乳が不可能な場合には、その時点で採材を終了した。なお、乳成分を比較するために、自然分娩豚(ランドレース種およびランドレースと大ヨークシャー種の交雑種, 4~9産, n=7)においても分娩後7日目まで乳汁採取を行った。

得られた乳汁は、解析まで-30°Cの冷凍庫内で保存した。乳汁の構成成分は、全固形分、脂肪分(ゲルベル法)、蛋白質量(ケルダール法)、乳糖(HPLC法)および無機質(直接灰化法)について解析を行った。さらに、得られた乳汁中IgGおよびIgA濃度についても測定(Pig IgG or IgA ELISA kit, Bethyl Laboratories, Inc.)を行い、経時的変化についても検討を行った。

続いて、偽妊娠誘起された6頭の偽妊娠豚において、耳介静脈にカテーテルを留置した。3頭については、上記試験区のうち最も泌乳誘起効果(泌乳誘起効率および獲得乳量)が高かった区と同様の処置を施し、追加EDP処置3日前から初回PGF_{2 α} 投与(Day 37.7 \pm 1.2)後7日目までの間、少なくとも1日2回の採血を行うとともに、泌乳状況の観察を行った。残りの3頭は対照区として、EDPの追加投与を行わず、PGF_{2 α} 投与(Day 34.0 \pm 1.0)前後は同様の採材を行った。

得られた血液は、遠心分離操作により血漿

を分離し、各種ホルモン測定まで -30°C の冷凍庫内で保存した。解析ホルモンは、プロジェステロン、プロラクチンおよびインスリン様成長因子-1 (IGF-1) とし、プロジェステロン濃度は、ELISA を用いて、プロラクチンおよび IGF-1 濃度は、時間分解蛍光測定法を用いて測定を行った。

4. 研究成果

(1) 持続性エストロジェンの追加投与量およびエストロジェン投与から黄体退行までの期間が泌乳に及ぼす影響

供試豚 (n=13) のうち、61.5% (n=8, 各試験区 2 例) のブタにおいて試験期間中に泌乳が観察された。さらに、5 頭 (38.5%) のブタでは、試験期間を通じて継続的に泌乳を認め、泌乳誘起率は、追加 EDP 投与から PGF_{2α} 投与の間隔が長くなると上昇する傾向が認められた (追加 EDP 投与から PGF_{2α} 投与の期間、5 日 vs. 10 日 = 14.3% (1/7 頭) vs. 66.7% (4/6 頭), $p < 0.10$)。

自然分娩豚から得られた乳中の IgG および IgA 濃度あるいは偽妊娠豚 (n=8) から得られた乳中 IgG 濃度は、分娩後 0 時間目および初回 PGF_{2α} 投与後 24 時間目に比べて、その 24 時間目以降で有意に減少した。偽妊娠豚から得られた乳中 IgG 濃度は、初回 PGF_{2α} 投与後 24 時間目で最高値を示し、自然分娩豚から得られた初乳に比べて有意に高値を示した。偽妊娠豚から得られた乳中 IgA 濃度は、初回 PGF_{2α} 投与後 24 時間目で最高値を示し、その 48 および 72 時間目で有意な減少を認めしたが、その後は変化を認めなかった。試験期間を通じて継続的な泌乳を認めた 5 頭の偽妊娠豚において、PGF_{2α} 投与後 48 時間以内に得られた乳中の乳脂肪分及び乳糖は、自然分娩豚から得られた初乳 (n=5) に比べてそれぞれ有意に低値及び高値を示した。

これらの結果から、偽妊娠豚に EDP を追加投与することにより、非妊娠豚に泌乳を誘起することが可能であり、偽妊娠豚から得られた乳には自然分娩時に得られる初乳と同等の IgG および IgA が含まれるが、構成成分には差が認められることが明らかになった。

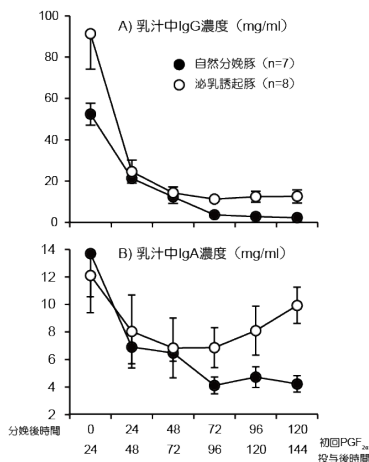


図1. 自然分娩豚 (n=7, ●) あるいは泌乳誘起豚 (n=8, ○) から得られた乳汁中の A) IgG および B) IgA 濃度の変化

(2) 泌乳誘起処置をされた偽妊娠豚の末梢血中プロジェステロン、プロラクチンおよび IGF-1 濃度の変化

泌乳誘起した偽妊娠豚 3 頭のうち 2 頭で泌乳が認められ、無処置区では泌乳は認められなかった。

偽妊娠誘起された母豚に対し、初回 PGF_{2α} 投与後の末梢血中プロジェステロン、プロラクチンおよび IGF-1 濃度は処置による影響を認めなかった。プロジェステロン濃度は、初回 PGF_{2α} 投与時に比べ、PGF_{2α} 投与後 0.25 日目に有意に減少し、その後有意な変化を認めず低値で推移した。プロラクチン濃度は、初回 PGF_{2α} 投与時に比べ、PGF_{2α} 投与後 0.25 および 0.75 日目に有意に上昇を認めしたが、その後有意な変化は認めなかった。泌乳誘起豚の末梢血中 IGF-1 濃度は、初回 PGF_{2α} 投与前に比べ、PGF_{2α} 投与後 4.25 から 5.25 日目において、有意に上昇した。

これらの結果から、偽妊娠豚への EDP の追加投与の有無は、PGF_{2α} 投与前後のプロジェステロンおよびプロラクチン分泌に影響を及ぼさないことが明らかとなった。その一方で、泌乳誘起処置を施した偽妊娠豚では、PGF_{2α} 投与後 IGF-1 濃度が上昇することが判明した。

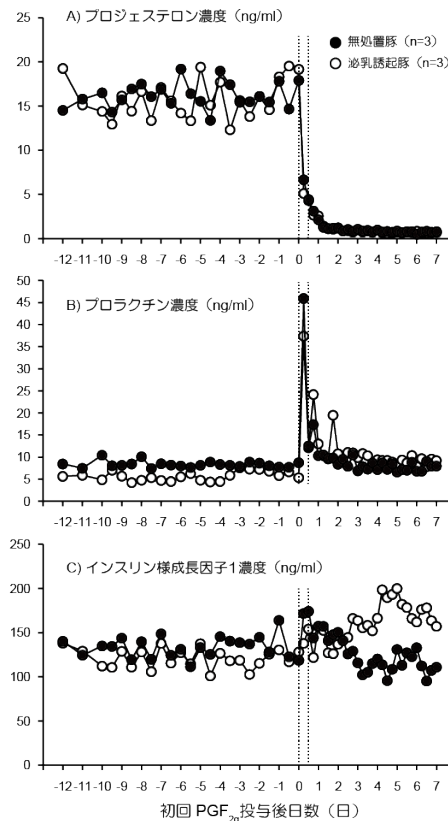


図2. 偽妊娠誘起された母豚において、無処置 (n=3, ●) あるいは泌乳誘起処置 (n=3, ○) を施したブタの末梢血中 A) プロジェステロン、B) プロラクチンおよび C) インスリン様成長因子 1 濃度の変化。破線は PGF_{2α} 投与を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

1. 野口倫子、宮内麻衣、伊藤裕希、鈴木武人、金子一幸．偽妊娠豚を応用した泌乳モデル作出の検討．GO-29．第160回日本獣医学会学術集会．鹿児島(鹿児島大学)．2017年9月．
2. 宮内麻衣、伊藤裕希、佐藤礼一郎、川口博明、野口倫子、金子一幸．偽妊娠豚を応用して作出された泌乳モデル豚による哺育が子豚の発育性に及ぼす影響．GO-30．第160回日本獣医学会学術集会．鹿児島(鹿児島大学)．2017年9月．
3. 伊藤裕希、宮内麻衣、鈴木武人、野口倫子、金子一幸．偽妊娠豚を応用して作出された泌乳モデル豚の子豚哺育中の乳中成分の変化．GO-31．第160回日本獣医学会学術集会．鹿児島(鹿児島大学)．2017年9月．

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：ブタの初乳作出法
発明者：野口倫子、伊東正吾、川口博明
権利者：学校法人麻布獣医学園、国立大学法人鹿児島大学
種類：特許
番号：特願 2016-61404
出願年月日：2016年3月25日
国内外の別：国内

〔その他〕

第160回日本獣医学会獣医繁殖学分科会 日本獣医繁殖学・優秀発表賞受賞．受賞演題名：偽妊娠豚を応用した泌乳モデル作出の検討．受賞者名：野口倫子、宮内麻衣、伊藤裕希、鈴木武人、金子一幸．2017年9月．

6. 研究組織

(1)研究代表者

野口 倫子 (NOGUCHI, Michiko)
麻布大学獣医学部 講師
研究者番号：40506721

(2)連帯研究者

鈴木 武人 (SUZUKI, Takehito)
麻布大学獣医学部 准教授
研究者番号：90532052

佐藤 礼一郎 (SATO, Reiichiro)
麻布大学獣医学部 准教授
研究者番号：00582826