

令和元年6月18日現在

機関番号：80122

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18787

研究課題名（和文）母体テストステロンを介した産子の卵巣予備能低下機構に関する研究

研究課題名（英文）Study on the mechanism for diminishing fetal ovarian reserve mediated by maternal testosterone

研究代表者

古山 敬祐（Koyama, Keisuke）

地方独立行政法人北海道立総合研究機構・農業研究本部酪農試験場・研究主任

研究者番号：50611026

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：乳牛では高い繁殖性が求められる。卵巣予備能の低い個体は繁殖性が低く、対応が必要である。そこで、国内における通常の乳牛飼養管理下における母体由来テストステロンを介した産子の卵巣予備能低下リスクを解明することを目的とし、研究を実施した。本研究により、通常の飼養管理下における産子の卵巣予備能低下リスクとして、「母牛が未経産牛であること」および「妊娠4および5ヶ月目での母体血中テストステロン濃度が高いこと」が存在することが明らかとなった。また、飼養管理の変更により母体血中テストステロン濃度が変わることも明らかとなったが、産子の卵巣予備能にまで影響が及ぶような手法を示すまでには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、国内における通常の乳牛飼養管理には、産子の卵巣予備能低下リスク、すなわち産子の繁殖性低下リスクが存在することが明らかとなった。これらのリスクに対応した方策を実施することで、繁殖性が低い乳牛が産まれるリスクを下げることが可能になると考えられる。また、テストステロン投与により、卵巣内卵胞動態に変化が及ぶことを示しており、同ホルモンの活用による新たな卵胞動員の技術開発への発展も期待できる。

研究成果の概要（英文）：It is desirable that dairy cows have high fertility. However, the cows with low ovarian reserve have low fertility. In the present study, we aimed to clarify the risk of declining fetal ovarian reserve via maternal testosterone under a general feeding system in domestic dairy cows.

In the present study, we demonstrated that the risk of declining fetal ovarian reserve under a general feeding system in domestic dairy cows is that the dam is a heifer and the maternal blood testosterone concentration is high at 4 and 5 months of gestation. Moreover, we also clarified that maternal testosterone concentration changes due to some changes in feeding management. However, the changes in feeding management did not affect the fetal ovarian reserve.

研究分野：獣医繁殖学

キーワード：血液生化学性状 飼養管理 乳牛 妊娠 繁殖性 AFC AMH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ウシの発情周期は21日であり、21日に1度、通常1個の卵胞が排卵に至る。その排卵卵胞の大元は、胎子期に形成された原始卵胞である。多くの哺乳類(ウシ、ヒツジ、ヒト等)では、胎子期に原始卵胞の形成が完了し、出生後に、その数が増えることはない。胎子期に数の上限が決まる卵巣内の原始卵胞数を、医学領域では卵巣予備能と呼び、卵巣機能を評価する指標として臨床現場で活用されている。ウシにおいても、受胎性が卵巣予備能の影響を強く受けることが明らかとなっており(Mossa *et al.* J Dairy Sci 2012;95:2355-61)、ウシの先天的な受胎性の指標として、卵巣予備能は有用であると考えられる。

上述のように、ウシでは、原始卵胞形成は胎子期に完了する。そのため、胎子期の母体環境により、卵巣予備能は影響を受けると考えられる。ヒツジでは、母体へのテストステロン(T)投与により胎子の卵巣予備能が減少することが報告されている(Steckler *et al.* Endocrinology 2005;146:3185-93)。また、ウシ胎子卵巣の体外培養液にTを添加すると、原始卵胞の動員が誘導され、二次卵胞数が増加することも報告されている(Yang & Fortune Biol Reprod 2006;75:924-32)。これらの背景から、母体由来Tを介した産子の卵巣予備能低下リスクが存在すると考えられる。

一方、ウシにおいて胎齢110日まで母体に極端な栄養制限を行うと、母体血中T濃度が上昇し、産子の卵巣予備能が低下することが報告されている(Mossa *et al.* Biol Reprod 2013;88:92)。また、ウシにおいて栄養制限により卵巣のステロイド産生能が影響を受けることが示されており(Richards *et al.* 1995)、栄養状態と血中T濃度が関連を有する可能性は高い。しかし、乳牛における通常の飼養管理において生じた母体の栄養不良が血中T濃度上昇を誘起するという報告はない。

### 2. 研究の目的

原始卵胞の動員を誘導する働きが報告されているTに着目し、通常の飼養管理下における母体由来Tを介した産子の卵巣予備能低下リスクを解明することを目的とした。実施した研究は、以下の3つである。

- (1) 通常の妊娠牛飼養管理に存在する産子の卵巣予備能低下リスクの解明
- (2) 妊娠牛の飼養管理変更が産子の卵巣予備能に及ぼす影響の検証
- (3) テストステロンプライミングによる *in vivo* における牛原始卵胞発育誘導機構の解明

### 3. 研究の方法

- (1) 通常の妊娠牛飼養管理に存在する産子の卵巣予備能低下リスクの解明

初めに、卵巣予備能の評価指標の1つである卵巣内での直径3 mm以上の卵胞数(Antral Follicle Count: AFC)の初産次以降の再現性を検証した。同一個体のAFCを1・2(31頭)、2・3(37頭)および3・4産次(26頭)において計測し、それらの値の再現性を評価した。また、計測されたAFCと繁殖成績との関連性を解析した。

続いて、母牛と産子のAFCとの関連性を母牛の産次別(未経産牛40頭、経産牛99頭)に検証し、妊娠期における母牛(未経産牛17頭、経産牛35頭)の血中T濃度の推移を比較した。ここまでのデータから、産子の卵巣予備能が低くなることが明らかとなった未経産牛を対象にし、以下の研究を実施した。

妊娠母牛の血中T濃度(妊娠2~9ヶ月目)とその産子(4カ月齢)の血中抗ミュラー管ホルモン(AMH)濃度(卵巣予備能の評価指標の1つ)との関連性を解析した。その結果から、産子血中AMH濃度との有意な相関のみられた妊娠4ヶ月目の血中T濃度に基づき妊娠母牛を分類し(high群:上位25%、low群:下位25%、intermediate群:その他)、妊娠期での血液生化学性状を比較した。

- (2) 妊娠牛の飼養管理変更が産子の卵巣予備能に及ぼす影響の検証

初妊牛15頭を用いて、群移動時期(妊娠日数70 vs 90 vs 110日)が母体の体重や血中T濃度および産子の血中AMH濃度に及ぼす影響を調べた。

続いて、初産妊娠牛20頭を用いて、妊娠期(分娩60日前まで)での飼料中栄養水準が、母体の血中T濃度および産子の血中AMH濃度に及ぼす影響を調べた。高栄養群および対照群には、乾物中可消化養分総量75および69%の飼料を与えた。

- (3) テストステロンプライミングによる *in vivo* における牛原始卵胞発育誘導機構の解明

非泌乳牛延べ10頭(投与群5頭・非投与群5頭)に対して、T投与試験を実施し、T投与(200 mg/頭)が血中AMH、プロジェステロン(P<sub>4</sub>)およびエストロジェン(E<sub>2</sub>)濃度やAFCに及ぼす影響を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 通常の妊娠牛飼養管理に存在する産子の卵巢予備能低下リスクの解明

AFC における 1・2、2・3 および 3・4 産次間の級内相関係数 (ICC) は、それぞれ 0.93、0.87 および 0.76 であり、3・4 産次間に比べて、1・2 産次間の ICC は高かった ( $P < 0.05$ )。1・2 および 2・3 産次間の ICC は高く、統計的な差も見られなかったことから、1 から 3 産次までの AFC は個体内での再現性の高い指標であると考えられた。また、AFC の 3 分位点に基づいて high 群、intermediate 群および low 群に供試牛を分類し、繁殖成績の比較を行った。初回授精受胎率に群間での差は見られなかったが、分娩後 100 日までの妊娠率は high 群が最も高く、分娩後 200 日までの非妊娠牛割合の推移も high 群は他群と異なっており、分娩後速やかに妊娠牛が増えていた (図 1、 $P < 0.05$ )。

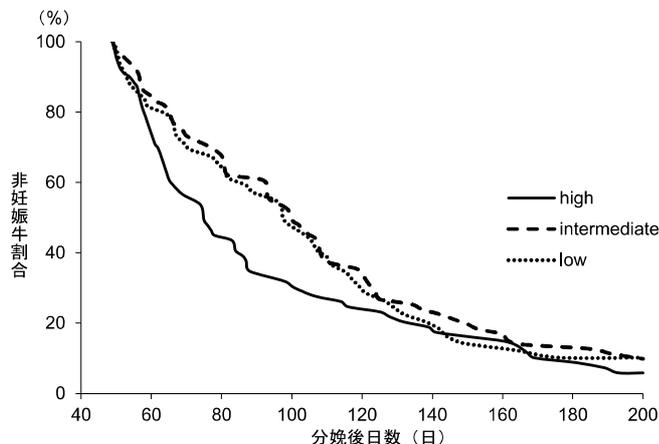


図 1 AFC と分娩後非妊娠牛割合との関連性

以上の結果から、1 から 3 産次ま

での AFC は受胎能力と関連する卵巢予備能の指標として活用可能であることが明らかとなった。

母牛が未経産牛であった産子の AFC (平均値±標準偏差、 $11.6 \pm 5.2$ ) は、母牛が経産牛であった産子の AFC ( $14.8 \pm 6.2$ ) よりも少なかった ( $P < 0.05$ )。また、母牛と産子の AFC の相関を調べたところ、母牛が経産牛の場合は正の相関が見られたが ( $P < 0.01$ )、母牛が未経産牛の場合では、有意な相関は見られなかった (図 2)。一方、妊娠 120 日以降の血中 T 濃度は、未経産牛の方が経産牛に比べて高かった (図 3、 $P < 0.01$ )。

以上の結果から、母牛が未経産牛であった場合には、産子の卵巢予備能が低くなるリスクが存在することが明らかとなった。また、母牛の産次の違いによって、母子間での AFC の関係性が異なることも明らかとなった。乳牛での卵巢予備能の遺伝率は比較的高いことが報告されているが (Walsh *et al.* J Dairy Sci 2014;97:4503–11)、母牛が未経産牛である場合は、遺伝要因以外の影響が強かったために、母子での相関が見られなかったと考えられる。そのメカニズムは不明であるが、未経産牛の妊娠期における血中 T 濃度の高さが関与している可能性がある。

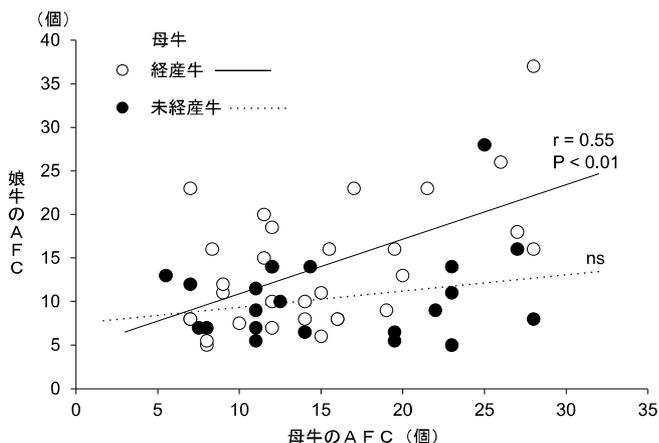


図 2 母牛と娘牛の Antral Follicle Count (AFC)

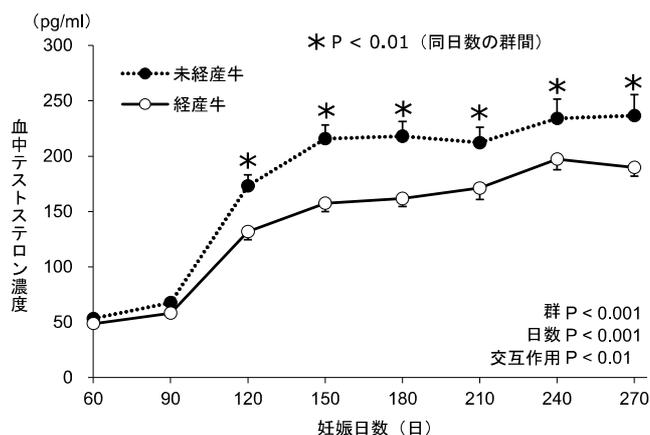


図 3 未経産牛と経産牛の妊娠期における血中テストステロン濃度の推移

妊娠 2~9 ヶ月目の妊娠母牛の血中 T 濃度と産子の血中 AMH 濃度を比較したところ、妊娠 4 および 5 ヶ月目の妊娠母牛の血中 T 濃度と産子の血中 AMH 濃度の間には負の相関が見られた ( $P < 0.05$ )。血中グルコース濃度では、low 群は、intermediate 群に比べて妊娠 60 および 70 日目が低く、high 群に比べて妊娠 110 日目が低かった (図 4、 $P < 0.05$ )。また、妊娠 60~120 日目の血中 BHB 濃度は low 群において高かった (図 5、 $P < 0.05$ )。

以上の結果から、妊娠中の母体血中 T 濃度と産子の卵巣予備能との間に関連性があり、それらの関連が見られる時期が妊娠 4 および 5 ヶ月目であることが明らかとなった。ウシ胎子での原始卵胞の形成完了時期は、胎齢 4 ヶ月齢頃であり、上記の関連が見られた時期と重なる。この因果関係を明らかにするためには、さらなる検証が必要である。また、妊娠 4 ヶ月目の母体血中 T 濃度と母体の栄養状態との間の関連性が示されたが、比較的低栄養にあったと思われる個体での血中 T 濃度が低くなっていた。既報 (Mossa *et al.* Biol Reprod 2013;88:92) と異なる結果であるが、栄養状態が血中 T 濃度に影響を及ぼす直接的な要因ではなく、間接的な要因であったために、このような違いが生じた可能性がある。

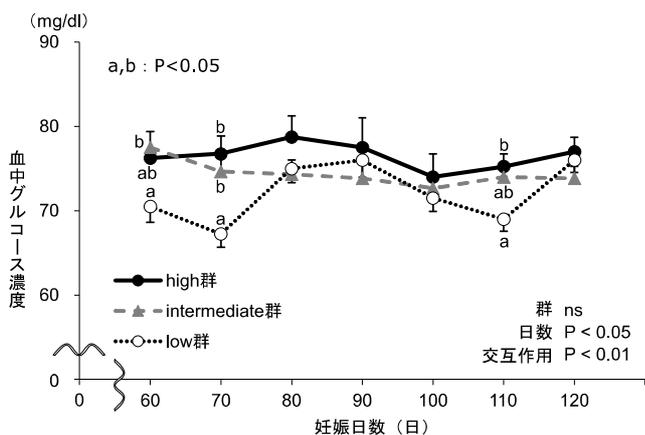


図 4 血中テストステロン濃度の違いと血中グルコース濃度の推移との関連性

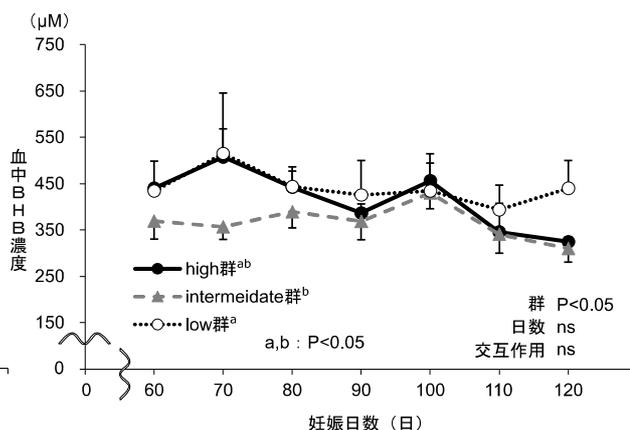


図 5 血中テストステロン濃度の違いと血中 BHB 濃度の推移との関連性

## (2) 妊娠牛の飼養管理変更が産子の卵巣予備能に及ぼす影響の検証

群移動時期の変更により、初妊牛での体重減少が起きる時期に変化が見られた (表 1)。群移動時期の違いにより、母体の血中 T 濃度の推移に違いが見られたが ( $P < 0.05$ )、産子の血中 AMH 濃度への影響は見られなかった (図 5)。また、飼料中栄養水準の違いは、初産妊娠牛での妊娠 210 日までの母体の血中 T 濃度および産子の血中 AMH 濃度には影響していなかった (図 6)。

以上の結果から、今回実施した飼養管理の変更では、産子の卵巣予備能に変化をもたらすことはできなかった。しかし、初妊牛において、群移動時期の変更、すなわち体重減少時期の変更、により血中 T 濃度の推移に変化をもたらすことができた。この変化により、産子の卵巣予備能に変化をもたらすことができなかった理由は不明である。より早期である妊娠 4 ヶ月目からの母体血中 T 濃度に変化をもたらすような処理を行うことができれば、産子の卵巣予備能に影響が及ぶ可能性がある。

表 1 初妊牛における群移動時期と日増体

| 群移動時期 | 日増体量 (kg/day) |                         |           |                         |           |                         |           |
|-------|---------------|-------------------------|-----------|-------------------------|-----------|-------------------------|-----------|
|       | 60~70         | 70~80                   | 80~90     | 90~100                  | 100~110   | 110~120                 | 120~150   |
| 70日目  | 1.0 ± 0.8     | -1.7 ± 0.7 <sup>a</sup> | 0.8 ± 0.7 | 1.4 ± 0.8 <sup>b</sup>  | 0.8 ± 0.9 | 0.7 ± 1.0 <sup>b</sup>  | 1.0 ± 0.3 |
| 90日目  | 1.0 ± 0.3     | 1.4 ± 0.7 <sup>b</sup>  | 0.8 ± 0.4 | -2.0 ± 1.3 <sup>a</sup> | 1.0 ± 0.8 | 0.6 ± 0.4 <sup>ab</sup> | 1.0 ± 0.4 |
| 110日目 | 1.0 ± 1.0     | 1.0 ± 0.8 <sup>b</sup>  | 0.7 ± 0.9 | 1.4 ± 0.3 <sup>b</sup>  | 0.8 ± 0.7 | -0.4 ± 1.3 <sup>a</sup> | 1.0 ± 0.6 |

平均値 ± 標準偏差、a,b:同列異文字間には有意差あり ( $P < 0.05$ )

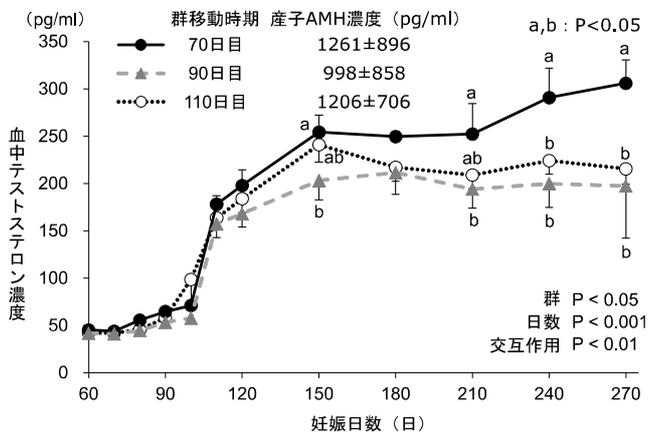


図5 群移動時期が初妊牛の母体血中テストステロン濃度に及ぼす影響

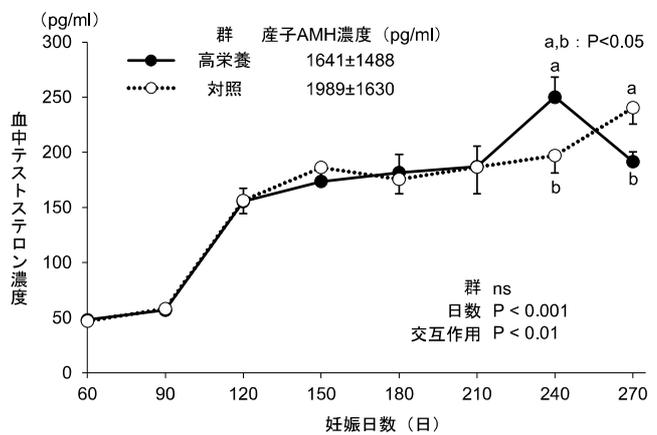


図6 飼料中栄養水準が初産牛の母体血中テストステロン濃度に及ぼす影響

(3) テストステロンプライミングによる *in vivo* における牛原始卵胞発育誘導機構の解明

T投与により、血中TおよびAMH濃度は上昇した(図7および8、P < 0.001)一方、血中P<sub>4</sub>およびE<sub>2</sub>濃度やAFCに変化は見られなかった。

以上の結果から、血中T濃度の上昇と卵巣内卵胞動態との関連性を見出すことができた。しかし、T投与によりAFCの変化が見られなかったために、血中AMH濃度の上昇が分泌組織である前卵状卵胞や初期卵状卵胞数の増加による現象なのか、それらの組織でのAMH分泌能亢進による現象なのかは不明なままである。

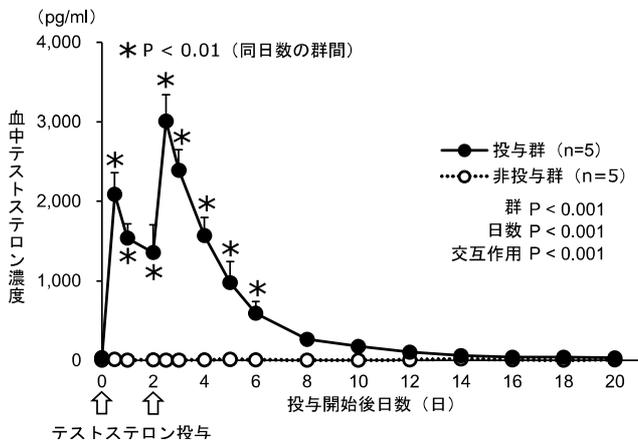


図7 テストステロン投与が血中テストステロン濃度に及ぼす影響

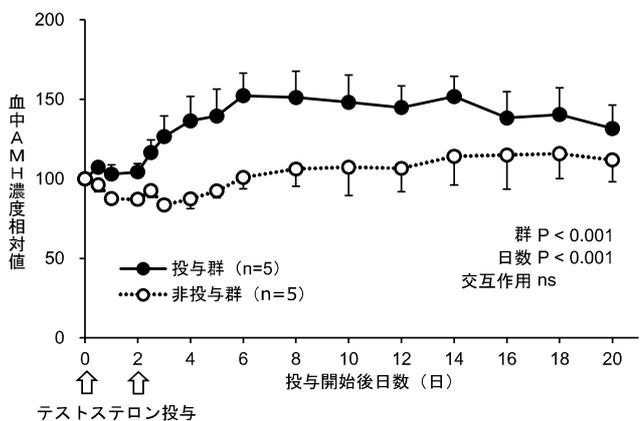


図8 テストステロン投与が血中AMH濃度に及ぼす影響 (血中AMH濃度相対値: 投与開始後日数0時点での血中AMH濃度を100とした場合の数値)

本研究により、通常の飼養管理下における母体由来Tを介した産子の卵巣予備能低下リスクとして、「母牛が未経産牛であること」および「妊娠4および5ヶ月目での母体血中T濃度が高いこと」が存在することを明らかとした。今後は、母体の血中T濃度に直接的な影響を及ぼす要因の探索および飼養管理もしくは薬剤投与による産子卵巣予備能のコントロール法の開発に向けた研究を続けていく必要がある。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

**Koyama K**, Koyama T, Sugimoto M. Repeatability of antral follicle count according parity in dairy cows. J Reprod Dev 2018;64:535-9. doi:10.1262/jrd.2018-062. 【査読あり】

〔学会発表〕(計3件)

**古山敬祐**, 柳川洋二郎, 小山毅, 窪友瑛, 杉本昌仁. ホルスタイン種未経産牛の妊娠中血中テストステロン濃度と産子の卵巣予備能および母体の健康状態との関連性. 第161回日本獣医学会学術集会. 2018年9月11~13日(茨城県)

**Koyama K**, Yanagawa Y, Koyama K, Matsui Y, Kusakari N, Sugimoto M. Difference in antral follicle count of daughters and testosterone concentration during pregnancy between heifers and lactating cows. Fourth World Congress of Reproductive Biology. 2017年9月27~29日(沖縄県)

**古山敬祐**, 小山毅, 松井義貴, 草刈直仁, 杉本昌仁. ホルスタイン種泌乳牛における初産次以降のAntral follicle countの再現性. 平成28年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会(石川). 2017年2月24~26日(石川県)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 柳川洋二郎

ローマ字氏名: Yojiro Yanagawa

研究協力者氏名: 平山博樹

ローマ字氏名: Hiroki Hirayama

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。