

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15647

研究課題名（和文）ウシにおける暑熱ストレス下での雌生殖器周囲の温度勾配維持機構の解明と繁殖性の改善

研究課題名（英文）Elucidation of Mechanisms of temperature gradients in female reproductive tracts under heat-stressed condition and improvement of reproductive performance in cattle

研究代表者

森田 康広（Morita, Yasuhiro）

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：90818262

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）：本研究では暑熱環境下での卵巣機能不全の原因が雌性生殖器周囲の温度勾配の破綻にあるかを明らかにすることを最終目的とした。黒毛和種牛においては暑熱条件下での排卵不全は、卵巣における卵胞形成の抑制が原因である可能性を示した。また、発情期では、体温は通常上昇するが、眼球温は排卵にかけて、温度が有意に低下することを黒毛和種牛において示した。加えて、暑熱環境下のカンボジアで飼養される乳牛において、暑熱環境下で乳脂肪率の違いは、遺伝的特徴の違いが関係していることを示した。これらの研究を通して、生殖器の温度勾配を調節することで暑熱環境下での卵巣機能不全を防止し、改善にする基礎的知見の集積を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、黒毛和種牛においては暑熱条件下での排卵不全は、卵巣における卵胞形成の抑制が原因である可能性を示した。この結果からは、視床下部や下垂体だけでなく、卵巣に焦点を当てた管理を提言でき、暑熱環境下での繁殖管理に新たな視点を提供できる。また、眼球温を観察することで発情から排卵の時期の推定ができることを示した結果は、新たな非接触での発情観察技術の開発につながる。加えて、カンボジアの在来牛が保有する暑熱耐性の遺伝的特徴を明らかにした結果は、暑熱環境下での在来牛を使用した育種へ利用できる。本研究で得られた結果は、今後の気候変動に対応し、持続可能な畜産体系の確立に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study aims to determine whether the disruption of the temperature gradient around the female reproductive tract is the cause of ovarian dysfunction under heat conditions. We indicated that ovulation failure under heat-stressed conditions in Japanese Black cattle could be due to suppressing follicle formation in the ovary. We also demonstrated that body temperature usually increases during estrus, but eye temperature significantly decreases from estrus to ovulation in Japanese Black cows. In addition, we revealed that differences in milk fat contents in dairy samples raised in Cambodia under heat-stressed conditions were related to differences in genetic character. Through these studies, we have accumulated basic knowledge to prevent ovarian dysfunction in heat conditions by modulating the temperature gradient in the reproductive tracts.

研究分野：動物生産科学

キーワード：卵巣 暑熱環境 血流 繁殖管理

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

正常な雌性動物では、生殖器において直腸温、子宮温、卵巢温、卵胞温の順に温度が低く維持される温度勾配が存在する可能性が報告されている。その機序の一つとして生殖器の血流が挙げられている。しかし、性周期中において、卵胞や黄体の形成といったように卵巢状態が劇的に変化する中で、上記の温度勾配と血流が性周期を通してどのように変化するのか、または維持されるのかは不明である。また、暑熱期では卵胞発育不全や排卵不全が起こることが広く知られている。このとき、暑熱期の排卵不全個体では、生殖器の温度勾配が発情期において維持されておらず、卵巢および卵胞温が子宮温と同程度になっているとの報告がある。卵胞発育不全に関しては、生殖器周囲の温度勾配、血流との関係は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究の研究課題の核心をなす学術的問いは、生殖器の温度勾配は臓器の血流により維持されているか、暑熱環境下での排卵不全を含む卵巢機能不全の原因が雌性生殖器周囲の温度勾配の破綻にあるか、破綻が卵巢機能の原因であるならば、温度勾配を回復、維持することができれば卵巢機能は正常に戻るのかということである。この問いを明らかにするには、暑熱環境下での生殖関連ホルモンの動態と子宮卵巢温度勾配、血流の関連を明らかにする必要がある。暑熱環境下では、ホルモン処置による発情同期化の失敗、排卵不全および遅延が生じることがある。本研究では、この原因が生殖機能を制御する、視床下部-下垂体-性腺軸の末梢である生殖器の温度維持機構の破綻という仮説を立てている。一方で、中枢の視床下部、下垂体の生殖ホルモン分泌が暑熱ストレスにより影響を受ける可能性もあることから、①暑熱環境下での生殖ホルモン分泌の変化について、黒毛和牛を用いて検討した。加えて、牛の排卵前卵胞は周囲の生殖器官よりも温度が低い。そのため、生殖器官の温度を測定することは牛の発情および排卵を予測する有用な方法となる可能性がある。しかし、現在は生殖温度を測定するためには生殖器に直接温度計を設置しなければならない。そのため、生殖器の温度を指標とする研究成果を社会実装するためには、非侵襲的な方法の確立が求められているため、②子宮、卵巢の温度を非侵襲的に観察するために、子宮、卵巢の温度を反映する体表の部位を検討した。最後に、暑熱環境下で生産が維持されているウシとそうでない牛における遺伝的、生理学的特徴の違いを明らかにすることで、暑熱環境下での生産性維持に影響を与える遺伝的要因を検討した。暑熱環境下で飼育されている、カンボジアのウシにおける、特徴的な暑熱耐性の生理学的変化を捉えるために、③カンボジアで飼養されている在来乳用種の遺伝的背景を調査した。これら3つの研究を通して、生殖器の温度勾配を調節することで暑熱環境下での卵巢機能不全を防止、改善に貢献する基礎的知見の集積を行なった。

### 3. 研究の方法

#### (1) 暑熱環境下での生殖ホルモン分泌の変化

発情が正常に回帰する黒毛和種経産牛6頭を使用し、暑熱環境下である、夏前後(快適期)および夏(暑熱ストレス期)の3つの条件下でタイストールにて飼養管理を行った。各条件下で、温湿度指数値(THI)、卵巢動態、血漿中プロゲステロン(P4)濃度、黄体形成ホルモン(LH)濃度、卵胞刺激ホルモン(FSH)濃度を測定した。

#### (2) 卵巢、子宮温度と眼球温度の関連の検討

生殖器官温度の代替として赤外線サーモグラフィ(IRT)を用いて眼表面温度を測定した。実験期間中、発情同期した5頭の黒毛和種牛の眼表面の5つの部位(鼻側の結膜、鼻側の虹彩縁、中央角膜、耳側の虹彩縁、耳側の結膜)の温度を1日2回(8:00と16:00)測定し、合わせて、生殖器温を持続的に測定した。眼球表面温度と、生殖器温度の関連を検討した。

#### (3) カンボジアにおける暑熱耐性遺伝子のマッピング

暑熱環境のカンボジアで乳生産を継続的に行なっている気候的に同じと見なせる2つの酪農場において調査を行った。2農場では、カンボジア在来牛とホルスタイン種の交雑および、タイから輸入されたブラーマン種とホルスタイン種の交雑乳牛を飼養しており、農場および、2種類の交雑乳牛を比較対象とした。生産性の指標として、暑熱環境に対して反応が大きい乳脂肪率を使用し、カンボジアおよびタイの交雑種乳牛の遺伝的変異を合わせて調査した。

### 4. 研究成果

#### (1) 暑熱環境下での生殖ホルモン分泌の変化

夏期の実験期間はTHI値をもとに、肉牛における極度の暑熱ストレス条件と判断した。暑熱期および、快適期、両方の実験期間中で、すべての牛で排卵障害の有無にかかわらず、GnRH作動薬投与後にLHおよびFSHのサージ様分泌が誘導された。夏期における排卵前の血漿中LHの累

積分分泌量は、夏期前後の快適期のそれよりも有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。夏期の牛では、GnRH 投与前の時期に、夏期前後の牛に比べ、卵巣内に中一卵胞数 (卵胞径  $> 5\text{mm}$ ) が有意に多く存在していた ( $p < 0.05$ )。従って、夏季の暑熱ストレス環境は、GnRH 投与前の牛の卵巣内の卵胞数を有意に増加させることが明らかとなった。加えて、夏季の暑熱ストレス環境は、黒毛和種において、外因性ホルモン刺激に対するゴナドトロピンの分泌および卵巣動態を減弱させない可能性を示した。これらのことから、本研究では、暑熱条件下での排卵不全は、卵巣における卵胞形成の抑制が原因である可能性を示した。

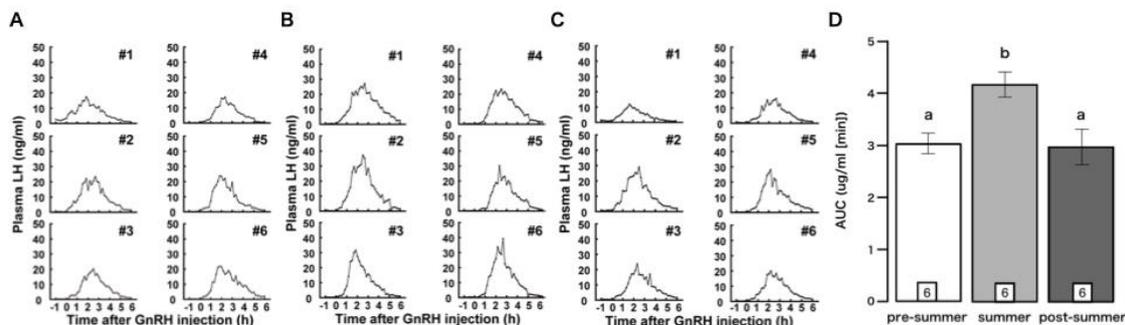


Fig.1 Plasma LH secretion in the peri-ovulatory period in each period. Plasma LH concentration in the pre-summer (A), summer (B), and post-summer (C) periods in the peri-ovulatory period after GnRH analog administration, and the AUC of LH secretion during the three experimental periods (D). Values in (D) are means  $\pm$  SEM and differences among periods are indicated by different subscripts ( $p < 0.05$ ).

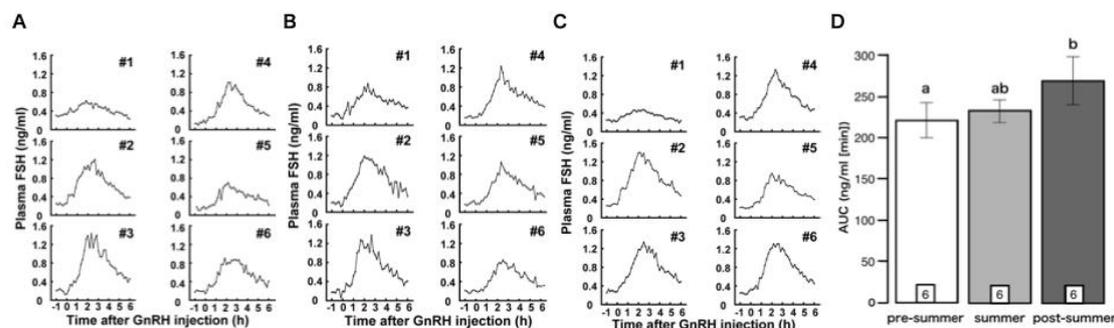


Fig.2 Plasma FSH secretion in the peri-ovulatory period in each period. Plasma FSH concentration in the pre-summer (A), summer (B), and post-summer (C) periods in the peri-ovulatory period after GnRH analog administration, and the AUC of FSH secretion during the three experimental periods (D). Values in (D) are means  $\pm$  SEM and differences among periods are indicated by different subscripts ( $p < 0.05$ ).

## (2) 卵巣、子宮温度と眼球温度の関連の検討

通常、発情期では、体温は上昇するが、眼球温は発情から排卵にかけて、温度が有意に低下することを初めて黒毛和牛を使用し、示した。また、この反応はタイストールで飼養され、行動が制限されているウシで観察されたことから、行動の増加に起因する体温上昇とは違った機序で眼球温は変化していると考察した。

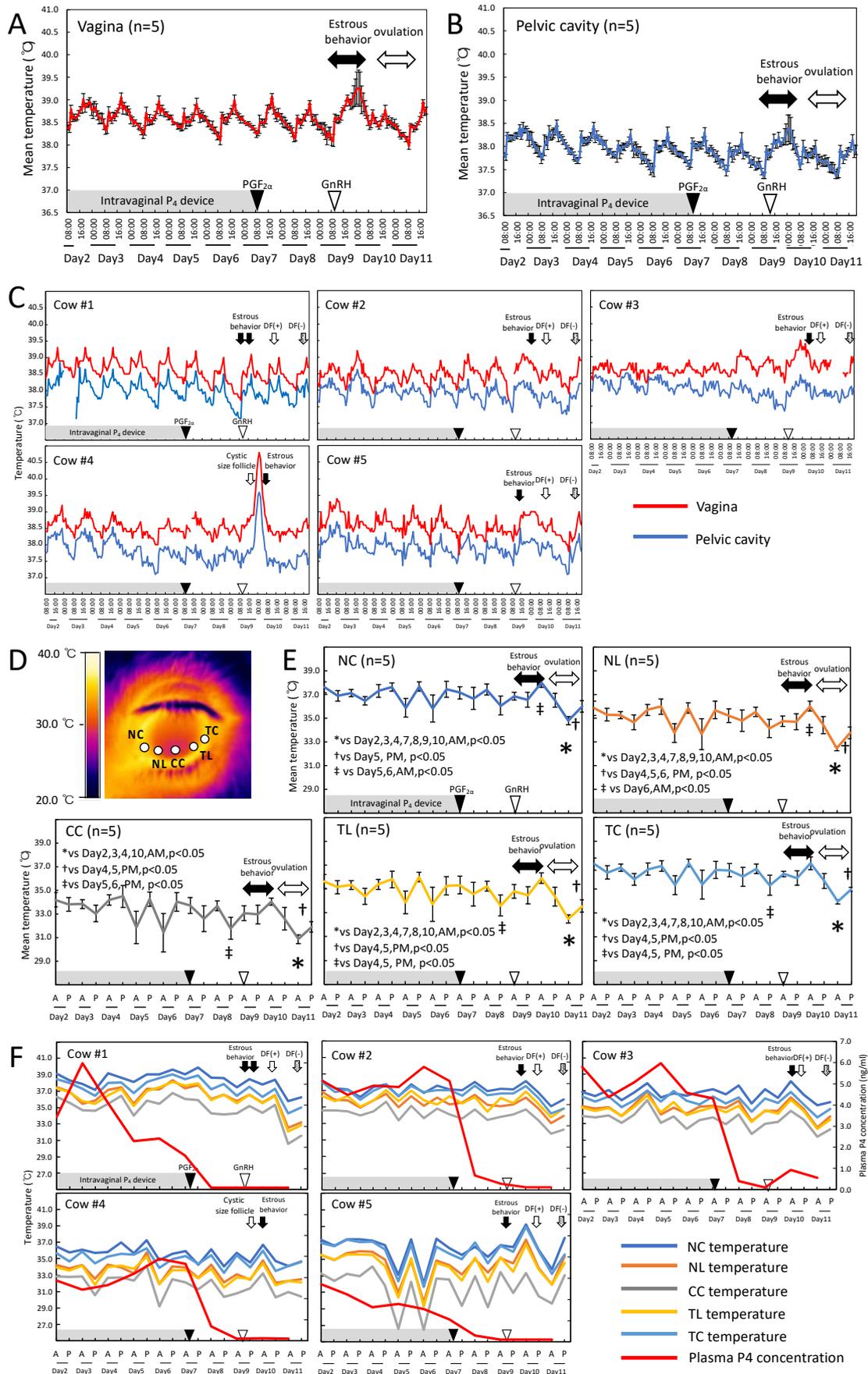


Fig.3 Profiles of the mean temperatures (n=5) of the vagina (A) and pelvic cavity (B) in each of the five cows (C) at 1-h intervals during the experimental period (red and blue lines indicate the temperatures of the vagina and pelvic cavity, respectively). A representative infrared thermography (IRT) image of the left eye was captured at a distance of 30–50 cm by the handheld camera; ocular temperatures were determined at five points as follows: NC, nasal conjunctiva; NL, nasal limbus; CC, center cornea; TL, temporal limbus; and TC, temporal conjunctiva (D). Profiles of multipoint ocular mean temperatures (mean ± SEM, n=5, E),

and multipoint ocular temperatures and plasma P4 concentration in each cow (F) were collected during the experimental period. Colored lines indicate daily temperatures of the five ocular regions and plasma P4 concentration as follows: NC, deep blue; NL, deep orange; CC, gray; TL, light orange; TC, light blue; plasma P4, red. White and black arrowheads indicate the timing of PGF2 $\alpha$  and GnRH administration, respectively. Black arrows and double-headed arrows indicate the observation of estrous behavior and their ranges, respectively, and white and gray arrows and white double-headed arrows indicate the detection of dominant follicle [DF(+)], the disappearance of dominant follicle [DF(-)], and their ranges, respectively. The gray color bar at the bottom of the graphs indicates the period with the intravaginal P4 device. \*, †, and ‡ indicate a significant difference ( $P < 0.05$ , two-way repeated measures ANOVA).

(3) カンボジアにおける暑熱耐性遺伝子のマッピング

GRAS-Di 法で得られた 133,705 の一塩基多型 (SNP) に基づいて、2 つの農場の 75 頭と日本の純血ホルスタイン-フリージアン牛 1 頭の遺伝的特徴付けを行った。農場 R の乾季のバルクミルクの乳脂肪分と 1 頭あたりの平均乳量は、それぞれ  $3.77 \pm 0.98\%$  と  $7.81 \pm 2.66$  L/日であり、農場 M ( $3.35 \pm 0.54\%$ ,  $6.5 \sim 7.5$  L/日) よりも高かった。農場 R のカンボジア原産の牛は、農場 M のタイ原産の牛とは異なる独自の遺伝的特徴を有していた。本研究では、2 つの農場間の暑熱環境下における乳脂肪分の違いは、それぞれの牧場で飼養されている交雑種牛の遺伝的特徴の違いによって説明できる可能性を示めた。

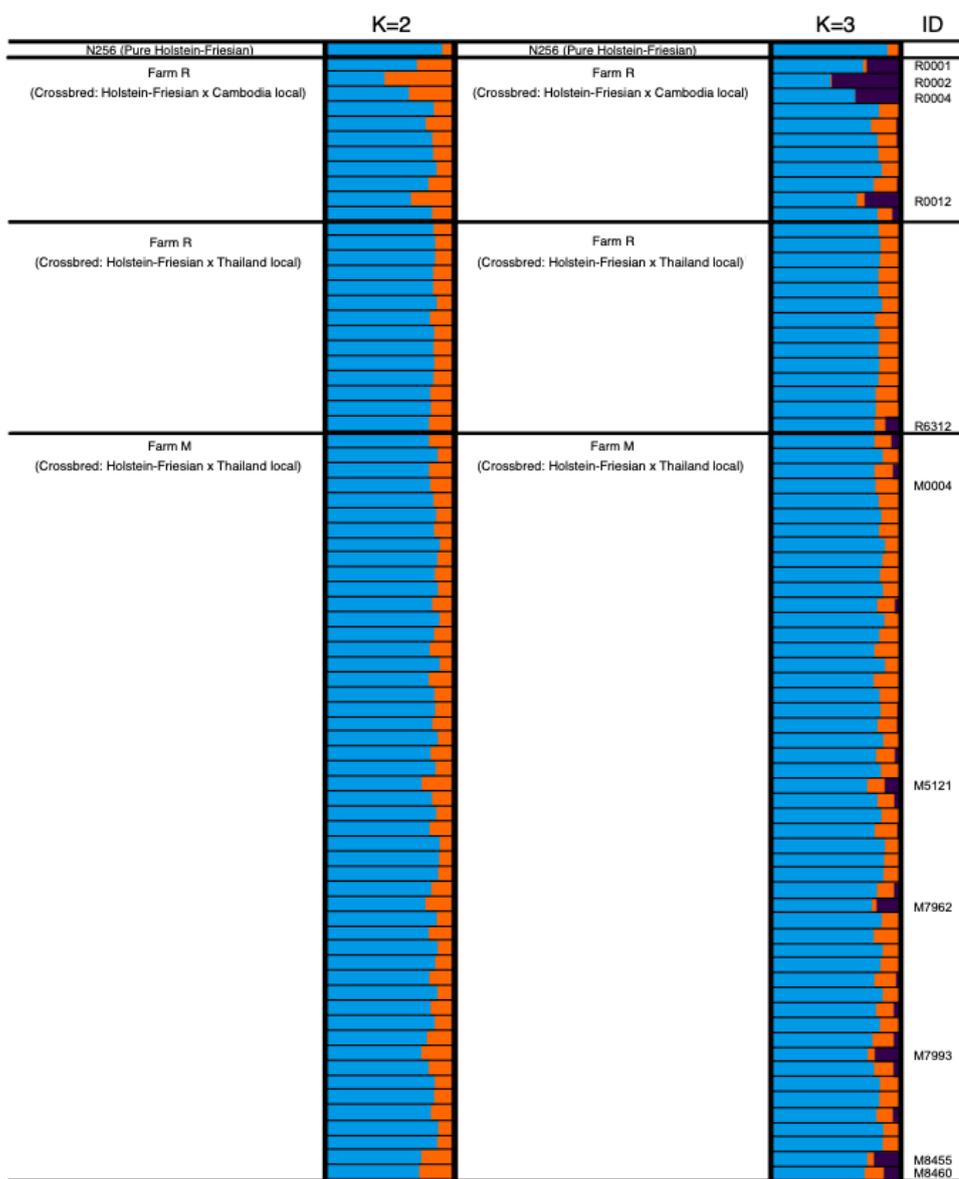


Fig.3 STRUCTURE plots for the probability of assignment to two ( $K = 2$ ) and three ( $K = 3$ ) genetic clusters, for the pure Japanese Holstein-Friesian breed, and 75 Cambodian dairy cattle, from two different farms. Each horizontal bar indicates an individual, and each color indicates the probability of assignment to one of the genetic clusters

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mam Somony, Tep Bengthay, Rin Soriya, Uenoyama Yoshihisa, Matsuyama Shuichi, Ohkura Satoshi, Murase Tetsuma, Nunome Mitsuo, Morita Yasuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 A Survey of Genome-Wide Genetic Characterizations of Crossbred Dairy Cattle in Local Farms in Cambodia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 2072 ~ 2072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ani12162072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 OZAKI Riho, INOUE Seiji, YOROZUI Yuki, ICHIKAWA Rei, YAMADA Naoki, HIGASHI Seiya, MATSUYAMA Shuichi, TSUKAMURA Hiroko, OHKURA Satoshi, UENOYAMA Yoshihisa, MORITA Yasuhiro	4. 巻 70
2. 論文標題 Capturing temperature changes on the ocular surface along with estrus and ovulation using infrared thermography in Japanese Black cows	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 49 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2022-116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上清詞, 中村翔, 松山秀一, 大蔵聡, 森田康広
2. 発表標題 呼吸音解析を用いた呼吸器関連疾患 診断補助システムのための基礎的研究
3. 学会等名 令和4年度東海畜産学会研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 萬井裕己, 向山晃永, 井上清詞, 北川悠梨, 松山秀一, 大蔵聡, 森田康広
2. 発表標題 ルーメンバイパスナイアシン給与が分娩後のウシにおける子宮への血流変化及び子宮修復に与える影響
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 24. 向山晃永、館林亮輝、北川悠梨、阿部良哉、鈴木玲香、松山秀一、大蔵聡、森田康広
2. 発表標題 暑熱ストレス下におけるウシの排卵不全メカニズムの解明
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田康広
2. 発表標題 熱帯地域におけるウシの繁殖性向上を目指して：カンボジアを例に
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
カンボジア	農林水産省		