

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580363

研究課題名(和文) 将来の泌乳と繁殖に関わる子牛のIGF-1産生能の決定因子の解明と人為的制御の検証

研究課題名(英文) Verification of the determinants of production ability and the artificial control of the IGF-1 related to the future lactation and reproduction in female calf

研究代表者

国友 千帆(川島千帆)(KUNITOMO, Chiho)

帯広畜産大学・畜産学部・講師

研究者番号：20374770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、乳牛における乳生産や卵巣機能に重要な肝臓でのインスリン様成長因子-(IGF-1)産生能の決定要因を遺伝形質と飼養管理の観点から検討することである。遺伝形質は成長ホルモン受容体の一塩基多型、飼養管理は哺乳期管理の変更により検討した。その結果、今回ターゲットとした遺伝形質の違いにより、IGF-1産生能が異なり、初回分娩後の乳量やエネルギー状態に違いをもたらすことが示された。一方、哺乳期管理の変更により血中IGF-1濃度は高められるが、IGF-1産生能には影響しないことが示された。以上より、乳牛の生産性に関与するIGF-1産生能は、遺伝的要因に影響を受けることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to investigate the effect of genotype and/or feeding management on the ability of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) production related to milk production and reproductive function in dairy cows. For genotype, we confirmed the relationship between one of the single nucleotide polymorphisms (SNP) of growth hormone receptor (GHR) and the increasing rate of blood IGF-1 level after hormonal injection. In addition, GHR-SNP type was related to milk yield and energy status after first calving. On the other hand, for feeding management, the supply of the intensive milk replacer for calves induced higher blood IGF-1 level; however, the increasing rate of blood IGF-1 level after hormonal injection did not differ between intensive and conventional milk replacer. Overall, our study showed that the ability of IGF-1 production was influenced by GHR-SNP in dairy cows.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学・草地学

キーワード：乳用牛 一塩基多型 IGF-1 GH受容体 繁殖 代謝

1. 研究開始当初の背景

乳牛の遺伝的改良に伴い、過去 20 年間で総乳量 (305 日間) は約 1,500kg も増加したが、一方で繁殖性は低下し、空胎日数は約 30 日間も延長している。さらに疾病で淘汰される乳牛の約半数は不受胎などの繁殖障害が占めている。この問題は日本だけでなく酪農先進国であるアメリカやヨーロッパ諸国でも同様に起きており、繁殖性改善に向けた研究が数多く行われているが、明確な解決策はまだない。しかし、高泌乳牛の中にも繁殖性に問題がない個体が存在し、加えて同一の飼養管理下にも関わらず繁殖性に個体差があることも事実である。しかしながら、この繁殖性の違いをもたらす要因は未だ解明されていない。

申請者らはこれまでに分娩後最初の主席卵胞が排卵し、分娩後 3 週間以内に黄体形成した牛はその後の正常な卵巢機能回復が早く、早期受胎につながることを示した。そして分娩後早期に排卵した牛の特徴として、排卵しなかった牛に比べて、分娩前後の血中インスリン様成長因子- (IGF-1) 濃度が高く、排卵卵胞が发育期に高濃度の IGF-1 に曝されること、そして総乳量は変わらないが、泌乳初期の乳量増加率が緩やかであることを明らかにした。つまり、このような条件を満たす牛の選定や条件から外れた牛への飼養管理改善が繁殖性向上につながるという。他の研究者らは、春機発動前の子牛とその個体の初産後の血中 IGF-1 濃度に正の相関があることを報告している。したがって肝臓での IGF-1 産生能は子牛の時にすでに決定されている可能性が高いが、どのような要因でいつ決定されるかはわからない。また、成牛や他の反芻動物でエストラジオールが IGF-1 産生を高めることが報告されていることから、申請者らは IGF-1 産生能を判断するために、安息香酸エストラジオール製剤 (EB) を春機発動前の 4 ヶ月齢の乳用雌子牛に投与し、血中 IGF-1 濃度の動態とその個体の初産後の卵巢機能回復および乳量を調査した。その結果、EB 投与による血中 IGF-1 濃度増加率に個体差があり、IGF-1 濃度増加率が高い牛は、低い牛に比べて初産時の分娩前後のエネルギー状態が低く、乳量が多くなったが、分娩後早期排卵が起きなかったことを示した。加えて、泌乳に向けた乳腺の発達には妊娠後期に急速に起こるが、乳腺の发育は春機発動前に起こり、その发育過程には卵巢機能や IGF-1 が深く関与していることが知られている。そして春機発動前の子牛への EB 投与が乳腺での IGF-1 の増加と IGF 結合タンパクの減少、すなわち活性型のフリー IGF-1 を増加させ、乳腺上皮細胞の増殖を促進したという報告もある。このことから、春機発動前の EB 投与による血中 IGF-1 濃度増加率の高い牛が、初産後の乳量は多くなったが早期排卵しなかった理由として、IGF-1 濃度増加率が高い子牛は、内因性のエストラジオールに対

する反応も良いため、活性型フリー IGF-1 が多くなり、乳腺发育が促進され、その結果、乳量が多くなるが卵巢機能回復が遅れるのではないかということが推察される。

以上のことから、本研究では子牛の時点ですでに個体差が生じている IGF-1 産生能を決定要因について、遺伝形質および飼養管理の観点から検討し、近年の高泌乳牛における繁殖性低下の改善策を見出すことを目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、春機発動前の子牛の IGF-1 産生能を決定する要因の解明とともに、子牛の時の IGF-1 産性能とその個体の分娩後の乳量や卵巢機能との関連性のメカニズムの究明し、さらに飼養管理による IGF-1 産生のコントロールが可能であるかを検証することを目的とした。

春機発動前の子牛の肝臓における IGF-1 産生能の決定には遺伝子などの先天的要因と飼養管理などの後天的要因が考えられる。本研究では、まず先天的要因である遺伝形質に的を絞り、遺伝形質の違いと IGF-1 産生能との関連性を解析する。その結果を踏まえ、研究期間の後半で IGF-1 産生を飼養管理でコントロール出来るか検証する。

(1) IGF-1 産生能の先天的要因の解析

春機発動前の子牛への EB 投与における IGF-1 産生能と遺伝形質との関連性

近年、牛において、IGF-1 産生に不可欠な成長ホルモン (GH) と GH 受容体 (GHR) や IGF-1 に遺伝子多型が確認され、その一部と IGF-1 産生との関連性が明らかとなっている。そこで、春機発動前の子牛への EB 投与における血中 IGF-1 濃度増加率とこれらの遺伝子多型との関連性を調査する。

春機発動前の子牛への EB 投与における IGF-1 産生能と乳腺および卵巢の局所 IGF-1 システムとの関連性

乳腺や卵巢には肝臓で産生される IGF-1 に加え、局所での IGF 結合タンパクも含めた IGF-1 システムが重要である。そこで春機発動前の子牛への EB 投与における血中 IGF-1 濃度増加率と乳腺や卵巢の局所 IGF-1 システムとの関連性について、の遺伝子多型の解析結果も含めて検討する。

(2) IGF-1 産生能の後天的影響の検証

上記の遺伝子多型の解析結果も踏まえ、人為的に IGF-1 産生をコントロール出来るのかを 4 ヶ月齢までの发育に最も影響すると考えられる哺乳期に焦点を絞り検証する。

3. 研究の方法

本研究では、春機発動前の乳用雌子牛への EB 投与における血中 IGF-1 濃度増加率から診断される肝臓での IGF-1 産性能を決定する遺伝的要因の解明、子牛の時の IGF-1 産性能とその個体の分娩後の乳量や卵巢機能との関連性のメカニズムの究明、IGF-1

産生の人為的コントロールが可能であるかの検証を行う。研究期間の前半は と の解明に重点を置き、その結果を踏まえ、研究期間の最終年度には について、哺乳期の管理方法を変えることで、4ヶ月齢でのEB投与による血中IGF-1濃度増加率が影響を受けるか検証する。具体的な方法は下記の通りである。

試験1．春機発動前の子牛へのEB投与におけるIGF-1産生能と遺伝形質との関連性

<4ヶ月齢乳用雌子牛へのEB投与試験>

4ヶ月齢雌子牛(体重約120kg)に対し、成牛の発情時のレベルに相当するエストラジオール400μgの安息香酸エストラジオール製剤を筋注し、投与前と投与24時間後に採血する。採取した血液からIGF-1およびエストラジオール濃度と健康状態把握のために代謝物濃度を測定する。

<遺伝子多型解析>

血液からDNAを抽出し、4種類の制限酵素で同定されるGHR-SNPの解析を行う。

以上より、4ヶ月齢乳用雌子牛へのEB投与における血中IGF-1濃度増加率と各遺伝子多型との関連性を解析し、IGF-1産生能と遺伝形質との関連性を検討する。

試験2．春機発動前の子牛へのEB投与におけるIGF-1産生能と乳腺および卵巣の局所IGF-1システムと乳腺発育との関連性

4ヶ月齢でEB投与試験を行った牛において、血中IGF-1濃度増加率が異なる個体を選抜し、ホルモン剤で発情周期同期化後に屠殺し、乳腺および卵巣組織採取を行う。採取した組織からIGF-1およびIGF結合タンパクのmRNA発現量と乳腺上皮細胞数を測定し、EB投与におけるIGF-1産生能と乳腺および卵巣の局所IGF-1システムと乳腺発育との関係を検討する。

試験3．出生後の飼養管理方法が肝臓でのIGF-1産生に及ぼす影響

以上の研究結果を考慮した上で、人為的に肝臓でのIGF-1産生をコントロール出来るか検証する。本研究では4ヶ月齢までの飼養管理で最も発育に影響を及ぼす哺乳期に重点を置き、哺乳量のエネルギー供給増加を行い、4ヶ月齢でのEB投与試験による血中IGF-1濃度増加率がどのような影響を受けるのかを検討する。

4．研究成果

(1) IGF-1産生能の先天的要因の解析

春機発動前の子牛へのEB投与におけるIGF-1産生能と遺伝形質との関連性

血中IGF-1濃度との関連が報告されている4つのGHR-SNPと初産時の乳量および繁殖成績との関連性を調査した結果、2つのGHR-SNPと繁殖成績との関連性が明らかとなった。そこで次に、この2つのGHR-SNPとすでにIGF-1産生能が決定していると予測される春機発動前の4ヶ月齢乳用雌子牛のIGF-1産生能との関連を調査するため、EB

投与における血中IGF-1濃度増加率を調べた。今回ターゲットとしたGHR-SNPのうち1つは1種類のSNPタイプしか同定されなかったため、解析はもう1つのGHR-SNPで行った。このGHR-SNPにおいてGG型は54頭、AG型は17頭、AA型は0頭であった。出生時の体重および哺乳期間やその期間の日増体量はGHR-SNPのタイプにより違いはなかった(表1と図1)。

表1. 出生時体重および哺乳期間の発育状況

	GG群 (n=54)	AG群 (n=17)	有意差
生時体重(kg)	43.3 ± 0.6	43.3 ± 1.0	ns
哺乳日数(日)	71.1 ± 1.1	74.1 ± 1.1	ns
離乳時体重(kg)	94.8 ± 1.4	96.6 ± 2.5	ns
哺乳期間の日増体量(kg/d)	0.73 ± 0.02	0.72 ± 0.02	ns

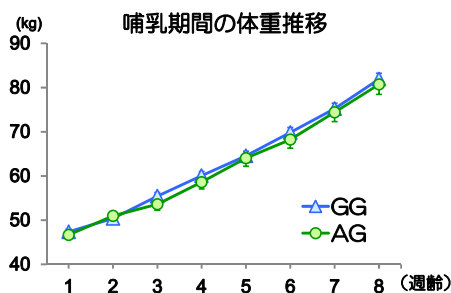


図1. 各GHR-SNPを示す牛の哺乳期間の体重推移

4ヶ月齢でのEB投与試験の結果を図2に示した。GG型の牛はEB投与により血中IGF-1濃度が増加したが、AG型の牛は血中濃度が変化せずIGF-1産生を促すGHの血中濃度上昇のみが確認された。このSNP部位はプロモーター領域であることから、このGHR-SNPはIGF-1産生効率に違いをもたらす可能性が考えられた。

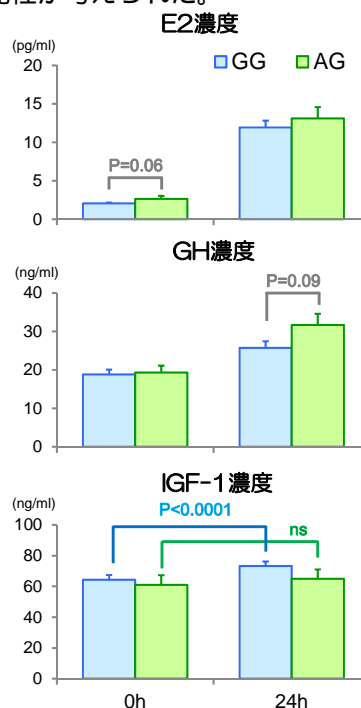


図2. 4ヶ月齢時のEB投与前後における各GHR-SNPを示す牛のホルモン濃度の変化

春機発動前の子牛への EB 投与における IGF-1 産生能と乳腺および卵巣の局所 IGF-1 システムとの関連性

乳腺および卵巣の局所 IGF-1 システムと乳腺発育との関連性を検証するため、育成牛から乳腺組織のサンプリングを行い、GHR-SNP を解析したが、採取部位によって抽出できる RNA 量の差が大きく、また個体差もあり、データが安定しなかった。次に、その成果から、生体レベルで IGF-1 産生能に違いがあると考えられた GHR-SNP タイプの違いにおける卵巣での IGF-1 産生能の違いを細胞レベルで検討した。しかし、この GHR-SNP タイプによる IGF-1 産生能の違いは認められなかった。

(2) IGF-1 産生能の後天的影響の検証

IGF-1 産生能に対する後天的要因の影響を検証する調査として、哺乳子牛に代用乳の給与量を増やす強化哺育を行った(強化哺育牛 10 頭、対照牛 13 頭)。出生時体重は強化哺育をした牛の方が重い傾向があった(表 2)。哺乳日数は両群変わらなかったが、哺乳期間の日増体量は強化哺育群の方が多く、離乳時体重が重くなった(表 2 と図 3)。

表2. 出生時体重および哺乳期間の発育状況

	対照群 (n=13)	強化群 (n=10)	有意差
生時体重 (kg)	41.4 ± 1.2	44.4 ± 0.7	P=0.07
哺乳日数 (日)	69.5 ± 0.9	69.4 ± 1.0	ns
離乳時体重 (kg)	87.0 ± 2.1	98.2 ± 1.8	P<0.001
哺乳期間の日増体量 (kg/d)	0.66 ± 0.03	0.78 ± 0.02	P<0.01

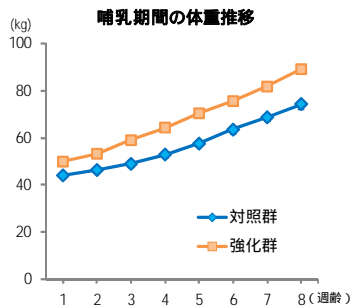


図 3. 強化哺育の有無における哺乳期間の体重推移

哺乳期間の血中 IGF-1 濃度は両群間に差はなかったが(図 4) 4ヶ月齢時に試験と同様の EB 投与試験を行った結果、強化哺育群の方が EB 投与前の血中 IGF-1 濃度が高く、さらに EB 投与によって著しい血中 IGF-1 濃度の増加が確認された(表 3)。

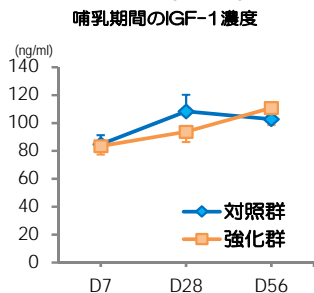


図 4. 強化哺育の有無における哺乳期間の血中 IGF-1 濃度の推移

表3. 4ヶ月齢のEB投与試験結果

	対照群 (n=13)	強化群 (n=10)	有意差	
E2濃度	0h	2.2 ± 0.2	1.5 ± 0.2	P=0.06
	24h	10.8 ± 0.9	10.0 ± 1.7	ns
	24h/0h	5.1 ± 0.3	6.8 ± 0.9	ns
IGF-1濃度	0h	54.1 ± 1.7	79.8 ± 8.5	P<0.01
	24h	62.0 ± 2.6	90.7 ± 7.7	P<0.001
	24h/0h(%)	114.8 ± 3.4	117.0 ± 5.4	ns
GH濃度	0h	14.5 ± 1.5	22.9 ± 3.8	P<0.05
	24h	23.9 ± 3.7	28.5 ± 2.6	ns
	24h/0h(%)	173.3 ± 22.6	143.9 ± 22.4	ns

以上が当初の研究計画に対する成果であるが、これに加え、GHR-SNP の違いが分娩前後の栄養代謝状態、乳量や繁殖成績に及ぼす影響についても検討した。

GG 型は 34 頭、AG 型は 9 頭、AA 型は 1 頭であったため、AA 型は解析から除外した。GG 型の方が AG 型よりも分娩前後の BCS が高く(分娩前後ともに P<0.0001)、血中 GH 濃度が低いにも関わらず(分娩前; P=0.06、分娩後; P<0.01) 血中 IGF-1 濃度に差はなかった(図 5)。また、分娩後 100 日以内の乳量も多くなった(図 6)。しかし、繁殖成績は違いが認められなかった。

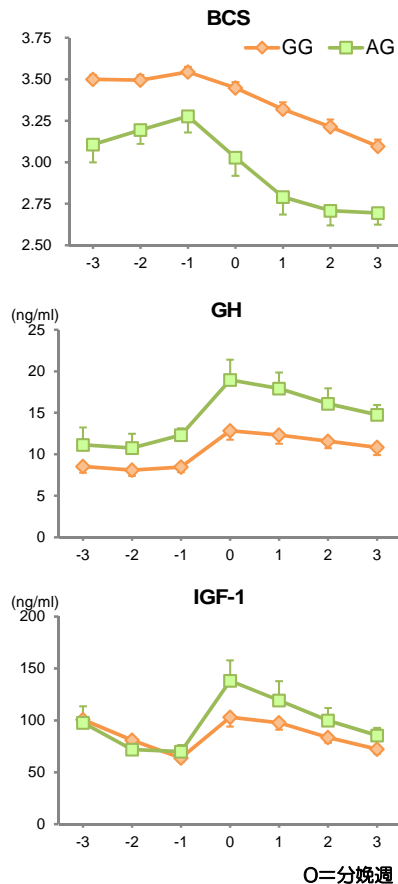


図 5. GHR-SNP の違いにおける分娩前後の BCS と血中 GH および IGF-1 濃度の推移

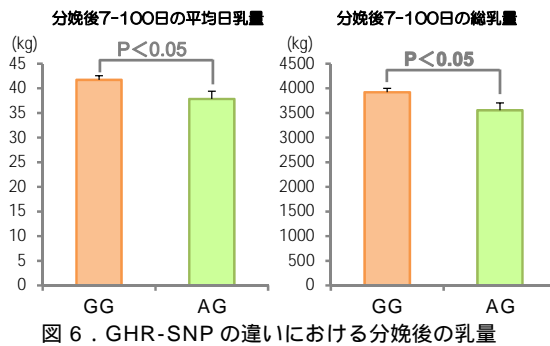


図 6 . GHR-SNP の違いにおける分産後の乳量

以上より、本研究でターゲットとした GHR-SNP のタイプの違いにより、生体レベルでは IGF-1 産生能が異なること、強化哺育により子牛時の血中 IGF-1 濃度は高められるが、IGF-1 産生能には影響しないこと、そして、GHR-SNP のタイプは、初回分産後の乳量やエネルギー状態に違いをもたらすことが示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

川島千帆, (2014) 乳牛における分産後の繁殖機能回復および受胎に影響を及ぼす栄養代謝因子に関する研究, *北海道畜産草地学会報*, 2: 31-38. 総説、査読無

Castro N, Kawashima C, van Dorland HA, Morel I, Miyamoto A, Bruckmaier RM. (2012) Metabolic and energy status during the dry period is crucial for the resumption of ovarian activity postpartum in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95(10): 5804-5812. 査読有.

Shirasuna K, Matsumoto H, Kobayashi E, Nitta A, Haneda S, Matsui M, Kawashima C, Kida K, Shimizu T, Miyamoto A. (2012) Upregulation of interferon-stimulated genes and interleukin-10 in peripheral blood immune cells during early pregnancy in dairy cows. *J. Reprod Dev.*, 58(1): 84-90. 査読有

Kawashima C, Matsui M, Shimizu T, Kida K, Miyamoto A. (2012) Nutritional factors that regulate ovulation of the dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high-producing dairy cows. *J. Reprod Dev.*, 58 (1):10 -16. 総説、査読無

川島千帆、宮本明夫 (2011) 乳牛の分産後早期初回排卵の有無を決定する分産前後の栄養代謝状態 *栄養生理研究会報* 55 (2): 107-118 査読有

Çolak M, Shimizu T, Matsunaga N, Murayama C, Nagashima S, Kataoka M, Kawashima C, Matsui M, Van Dorland HA, Bruckmaier RM, Miyamoto A. (2011) Oestradiol enhances plasma growth hormone and insulin-like growth factor-I concentrations and increase the expression of their receptors mRNAs in the liver of ovariectomized cows. *Reprod Dom Anim.*, 46(5): 854-861. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

川島千帆, 宗像めぐみ, 松井基純, 宮本明夫, 木田克弥, 清水隆, 4ヶ月齢雌子牛へのエストロゲン投与による血中インスリン様成長因子-I 濃度変化と成長ホルモン受容体一塩基多型および生時体重との関連性, 第106回日本繁殖生物学会大会, 東京農工大学(東京都府中市), 2013年9月12-14日

川島千帆, 宗像めぐみ, 木田克弥, 松井基純, 妊娠末期の乳牛のインスリン抵抗性と栄養代謝状態、乳量、繁殖成績および産子の体重と血液性状との関係, 2013年度日本畜産学会第117回大会, 新潟大学(新潟県新潟市), 2013年9月9-10日

川島千帆, 唐木智尋, 宗像めぐみ, 松井基純, 木田克弥, 乳牛における乾乳後期のエネルギー状態と分産後の初回授精での受胎との関係, 2012年度日本畜産学会, 広島大学(広島市), 2013年3月28-30日

Munakata M, Shirasuna K, Kida K, Miyamoto A, Shimizu T, Kawashima C., Relationship between single nucleotide polymorphisms of growth hormone receptor and reproductive performance in Holstein dairy cows, 17th International Congress on Animal Reproduction, Vancouver Convention Centre (Vancouver, British Columbia Canada), July 29-August 2, 2012

川島千帆, 宗像めぐみ, 白砂孔明, 宮本明夫, 清水隆, 木田克弥, 乳牛における成長ホルモン受容体の一塩基多型と繁殖性との関連性, 2011年度日本畜産学会, 名古屋大学(名古屋市), 2012年3月28-29日

青木祐歌, 白砂孔明, 川島千帆, 清水隆, 村山千明, 宗像めぐみ, 増田豊, 宮本明夫, エストロゲン受容体 α : の一塩基多型と泌乳持続性が乳牛の繁殖性及び乳量へ与える影響, 2011年度日本繁殖生物学会, 岩手大学(盛岡市), 2011年9月15-17日

宗像めぐみ, 白砂孔明, 青木祐歌, 村山千明, 増田豊, 宮本明夫, 清水隆, 木田

克弥, 川島千帆, 乳牛における成長ホル
モン受容体の一塩基多型と繁殖性およ
び泌乳能力との関連, 2011年度日本繁殖
生物学会, 岩手大学(盛岡市), 2011年9
月15-17日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川島 千帆 (KAWASHIMA, Chiho)
帯広畜産大学・畜産学部・講師
研究者番号: 20374470

(2) 研究分担者

木田 克弥 (KIDA, Katsuya)
帯広畜産大学・畜産学部・教授
研究者番号: 70419216

清水 隆 (SHIMIZU, Takashi)
帯広畜産大学・畜産学部・准教授
研究者番号: 90375113

白砂孔明 (SHIRASUNA, Koumei)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20552780