

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850195

研究課題名(和文) 乳牛の発情・排卵障害の内分泌メカニズムとNK3受容体作動薬による新規治療法の検討

研究課題名(英文) Endocrine mechanism of estrus and ovulation failure in dairy cows and development of new treatment method by using NK3 receptor agonist

研究代表者

遠藤 なつ美 (Endo, Natsumi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40726684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：酪農現場では乳牛の発情・排卵障害の増加が問題となっている。本研究では、繁殖供用時期の泌乳牛における発情行動の発現状況を加速度センサーを用いた行動量の測定によって調査すると共に、ニューロキニン3受容体作動薬(Senktide)を用いた新規治療法を開発するため、ヤギへの投与を行いホルモン分泌や卵巣への影響を検証した。周排卵期の泌乳牛において目視観察で発情が観察されたのは50%であったが、加速度センサーによる発情検知率は84.6%と高く目視観察の補助手段として有用であることが示された。また、Senktideの投与は、黄体形成ホルモンのパルス状分泌を刺激し、排卵の時期を早めることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：High incidence of estrus and ovulation failure in dairy cows has been a worldwide problem in recent years. Firstly, the expression of estrus behavior in lactating dairy cows were investigated by accelerometer system and visual observation. Estrous behavior was detected for 50.0% cycles by visual observation. The accelerometer system detected estrus correctly for 84.6% cycles, which was higher than that by visual observation ( $P < 0.05$ ). It was suggested that the estrus detection system by the accelerometer system can be utilized as an aid for estrus detection by visual observation. Furthermore, to develop the new therapeutic method to treat anestrus and anovulation animals, the effect of senktide on hormonal secretion and ovarian follicles were determined in follicular-phase goats. The results showed that intravenous administration of senktide stimulates luteinizing hormone secretion, which can enhance the time of ovulation in follicular-phase goats.

研究分野：獣医臨床繁殖学

キーワード：乳牛 発情 排卵障害 ニューロキニン3受容体 NKB ヤギ 発情行動 ビデオトラッキング

### 1. 研究開始当初の背景

牛の人工授精では、発情が確認されてから6~12時間後の授精適期に授精を実施し、その24時間後までに排卵が確認されれば、高い受精率・受胎率が得られると言われている。しかし、近年の酪農現場では、“発情が見つけられない”、“適期と思って授精しても排卵しない”というケースが増えている。このことは牛群の繁殖成績の低下につながり、経済的損失も大きい。現実に、国内の乳牛の受胎率は過去30年で20%低下し、現在は40%程度である。この問題に対処するには、その発症機序に関する基礎研究を踏まえた予防法・治療法の開発が急務である。

発情・排卵障害の背景には、乳牛の高泌乳化に伴い、牛舎環境や飼養管理が大きく変わってきたことが影響していると考えられる。分娩後の栄養・エネルギー不足は卵巣機能の低下につながる。さらに、泌乳と関連して生じる“ステロイドホルモン代謝率の増加”は、末梢血中ホルモン濃度を低下させ、様々な繁殖障害の原因になることが指摘されている。

発情・排卵障害への対処として、臨床現場でエストラジオール(E<sub>2</sub>)製剤の投与による発情誘起や性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)製剤の投与による排卵誘起などのホルモン処置法が行われている。しかし、これらの処置では卵胞の発育状況にかかわらず人為的に発情・黄体形成ホルモン(LH)サーズを誘導する。したがって、卵胞の発育が不十分な段階で処置してしまうと未成熟な卵子が排卵することになり受胎成立への効果があまり期待できない。一方、視床下部のGnRH分泌機構を制御するキスペプチンニューロンに発現が認められるニューロキニン3(NK3)受容体とそのリガンドであるニューロキニンBは、キスペプチンニューロンの神経活動に促進的に働きGnRHのパルス状分泌を増加させることが最近の研究で分かった。この作動薬を利用すれば、GnRHおよびLH分泌のパルス状の増加により卵胞の発育を効果的に刺激してE<sub>2</sub>産生が高められる結果、卵胞からのシグナルにより発情・排卵過程が極めて自然に近い状態で進行するという画期的な発情・排卵障害治療法の開発につながることを期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では発情・排卵障害の原因究明と新規治療法の開発を目指し、具体的には以下のことを検討する。

(1) 分娩後の泌乳牛を対象に発情の発現状況および排卵時期を調査し、それらに影響を及ぼすことが考えられる栄養・代謝機能を調べ、発情行動の微弱化や無発情、排卵遅延といった発情・排卵障害との関連および受胎性への影響を明らかにする。

(2) 発情・排卵障害の新規治療法の開発に向け、NK3受容体作動薬のLHおよびE<sub>2</sub>分泌効果を明らかにする。さらに、投与量や投

与回数の調整によって発情・排卵誘起につながる投与プロトコルを考案する。

また、発情・排卵障害の発症メカニズムの解明を進める上で発情行動の定量化が重要である。そこで、ビデオトラッキングによりヤギの発情期にみられる行動量や行動パターンの変化を解析する手法の確立を行った。

### 3. 研究の方法

(1) 国内で最近開発された加速度センサーシステムを用いた発情発見補助装置を用いて以下の試験を実施した。まず、ホルスタイン種搾乳牛10頭の頸部に加速度センサーのタグを装着し、発情周期における行動量の変化を解析した。次いで、搾乳牛13頭の合計26発情周期について発情行動の観察と排卵の確認を行い、加速度センサーによる発情検知率との比較を行った。また、発情周期を営んでいる乳牛において採血と超音波画像検査による卵巣の観察を行い、血中栄養代謝物などを調べ、発情・排卵障害や受胎の有無との関連について検討した。

(2) NK3受容体作動薬を発情・排卵障害の治療薬として用いるための第一歩として、臨床的に無発情を呈したヤギ6頭にNK3受容体作動薬の少量頻回投与(4時間間隔×7回)を行い、その効果を検証した。

臨床例で得られた知見を踏まえ、次の実験では給餌制限によって卵胞発育障害および無発情を呈したヤギを発情・排卵障害のモデル動物として作出し、卵胞発育の促進および発情・排卵誘起効果を検討した。

Senktideのより効果的な投与方法を検討するため、発情周期を正常に営んでいるヤギの卵胞期においてsenktideを単回あるいは持続投与を行い、LH分泌パターンの違い、卵胞発育およびE<sub>2</sub>分泌への効果を調査した。

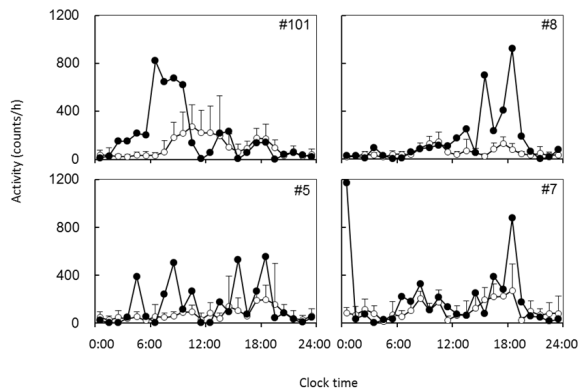
発情・排卵障害の発症メカニズムの解明を進める上で発情行動の定量化が重要である。そこで、ビデオトラッキングによりヤギの発情期にみられる行動量や行動パターンの変化を解析する手法の確立を行った。

### 4. 研究成果

(1) 加速度センサーによって記録された黄体期と発情日の行動量の代表例として4頭のデータを図1に示す。非発情期、すなわち黄体期の行動量は、夜間に少なく、朝夕の搾乳および給餌の時間帯とほぼ一致して増加していた。発情日においては1時間当たりの行動量が、黄体期の平均行動量に比べて9.2 ± 3.3(5.2~11.0)倍に増加するピークが認められた。さらに、日内の行動量がピークとなる時刻は、その殆どが日中の作業時間帯に生じており、発情周期における観察日間(黄体期、発情日前日、発情日、排卵日)での有意な差は認められなかった。次いで、搾乳牛13頭の合計26発情周期について発情行動の観察と排卵の確認を行い、加速度センサーによ

る発情検知率との比較を行った結果、目視観察による発情検知率は 13/26 周期 (50.0%) であったのに対し、加速度センサーによる発情検知率は 22/26 周期 (84.6%) と目視観察よりも有意に高かった ( $P < 0.05$ )。また、加速度センサーにより黄体期に発情が誤検知された周期は 8/26 周期 (30.8%) だったが、これらの周期ではその後の卵胞期で加速度センサーにより発情が正しく検知されていた。本研究により、加速度センサーによる発情検知システムは、飼養頭数の少ない小規模な牛群においても目視観察による発情発見の補助手段として十分活用できることが示された。

また、乳牛の発情周期において、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸などの血中栄養代謝物や筋疲労の程度を示す乳酸値の測定を行ったが、供試した乳牛では発情行動の発現状況との関連が認められなかったため、今後は、発情・排卵障害の発症牛での検討も視野に入れ、調査を進める必要がある。



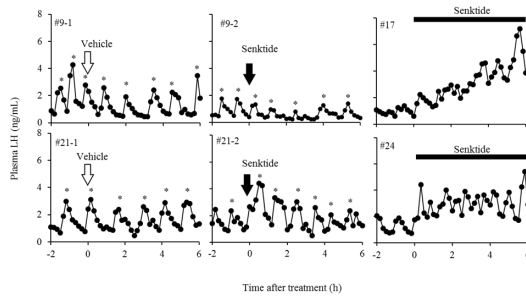
**図1** 発情日(●)の行動量は非発情期(○)に比べて増加するが、#101や#8のように明瞭なピークの後に行動量の増加が数時間持続して認められる場合、もしくは#5のようにピークが複数回に渡って認められる場合が観察された。

(2) 臨床的に無発情を呈したヤギ6頭にNK3受容体作動薬の少量頻回投与(4時間間隔×7回)した結果、senktideの投与によるLH分泌の増加は卵胞の発育を刺激し、発情および排卵をそれぞれ2/6および5/6頭で誘起することができることが明らかとなった(雑誌論文)。

次の実験では、制限給餌によって卵胞発育が抑制された条件下でNK3受容体作動薬を少量頻回投与(4時間間隔×7回)した結果、LH分泌の促進により排卵の時期を促進することが明らかとなった(雑誌論文)。

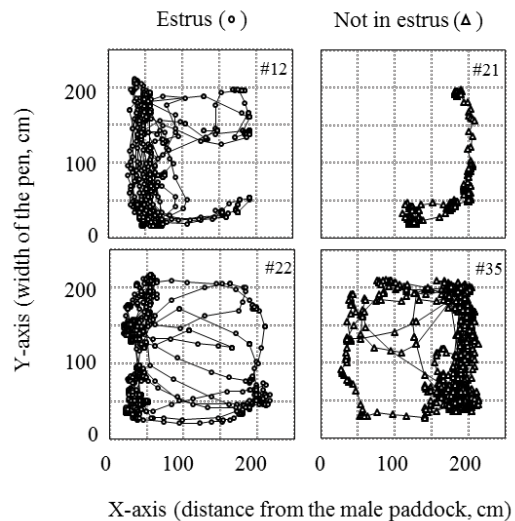
さらに、senktideの効果的な投与方法について検証するため、発情周期を正常に営んでいるヤギの卵胞期においてsenktideを単回あるいは持続投与を行った結果、図2に示したように持続投与の方が単回投与に比べてLH分泌を効果的に促進することが明らかと

なった。さらにその結果として、排卵の時期が通常のヤギより1~2日早まるヤギがsenktideの持続投与を受けた群の半数例で認められた(雑誌論文)。



**図2** 卵胞期のヤギにsenktideを単回あるいは持続投与した後の血中LH濃度の推移を示す。矢印は溶媒あるいは20 nmolのsenktideの静脈内投与を示し、横棒はsenktideの持続投与(20 nmol/min、6 h)、\*はLHパルスのピークを示す。

ヤギの発情行動を詳細に観察するための新たな手法として、ビデオトラッキングデータを用いた解析を試みた結果、ヤギの動きの軌跡を図3のように示すことができる。発情期のヤギでは非発情期に比べて、雄のいるパドック付近に滞在する時間が増加し、雄パドックへの接近回数も増えることが示され、このようなパラメーターを用いることで行動の変化を定量的に評価することが可能となった(雑誌論文)。



**図3** ヤギの動きを0.5秒間隔で10分間トラッキングしたデータから、発情期のヤギ(左列、●)は、非発情期のヤギ(右列、▲)に比べて雄のパドックに滞在する時間が増加していることが確認できる。

## 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 4 件)

N. Endo, L.P. Rahayu, Y. T, Arakawa, T. Tanaka, Video tracking analysis of behavioral patterns during estrus in goats. Journal of Reproduction and Development, 査読有, Vol.62, 2016, pp.115-119 DOI: 10.1262/jrd.2015-118.

N. Endo, L.P. Rahayu, Y. Ito, T. Tanaka, Ovarian and hormonal responses to single or continuous peripheral administration of senktide, a neurokinin 3 receptor agonist, during the follicular phase in goats. Domestic Animal Endocrinology, 査読有, Vol.53, 2015, pp.136-143 DOI: 10.1016/j.domaniend.2015.07.003

N. Endo, T. Tanaka, Effect of intermittent administration of neurokinin 3 receptor agonist on luteinizing hormone secretion, estrus, and ovulation in feed-restricted goats. Small Ruminant Research, 査読有, Vol.127, 2015, pp.50-57 DOI: 10.1186/1756-0500-7-773

N. Endo, T. Tanaka, Effect of senktide, a neurokinin 3 receptor agonist on luteinizing hormone secretion and follicular development in anestrus Shiba goats: a pilot study. BMC Research Notes, 査読有, Vol.7, 2014, pp.773 DOI: 10.1186/1756-0500-7-773

〔学会発表〕(計 5 件)

N. Endo, L. P. Rahayu, Y. Ito, T. Tanaka. Ovarian and hormonal responses to single injection or continuous infusion of senktide, a neurokinin 3 receptor agonist, during the follicular phase in goats. 8th ICFAE, ビルン(デンマーク), 2015 年 8 月 27 日

遠藤 なつ美, 荒川俊也、田中知己、ヤギの動画トラッキングデータに基づく発情行動の解析、日本畜産学会第 119 回大会、宇都宮大学(栃木県・宇都宮市) 2015 年 3 月 29 日

荒川 俊也、遠藤 なつ美、田中 知己、隠れマルコフモデルを用いたヤギの行動自動推定の試み。研究集会「最適化：モデリングとアルゴリズム 28」、統計数理研究所(東京都・立川市) 2015 年 3 月 19 日

N. Endo, T. Tanaka. Ovarian and hormonal responses of female goats to feed restriction and intermittent administration of neurokinin B analog.

World Congress of Reproductive Biology 2014, エディンバラ(スコットランド), 2014 年 9 月 3 日

遠藤 なつ美、田中 知己、制限給餌下のヤギにおけるニューロキニン B 類縁物質の投与が黄体形成ホルモン分泌、卵胞発育および発情に及ぼす影響、第 107 回日本繁殖生物学会、帯広畜産大学(北海道・帯広市) 2014 年 8 月 21 日

〔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〕

ホームページ等

<http://kenkyu-web.tuat.ac.jp/Profiles/49/0004805/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 なつ美(ENDO, Natsumi)

東京農工大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号: 40726684