

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580320
 研究課題名（和文） 高泌乳牛の肝機能に作用する遺伝形質の解明による繁殖性向上へのアプローチ
 研究課題名（英文） An approach to improvement of fertility by elucidation of the genetic trait to affect on the liver function in high-producing dairy cow.
 研究代表者
 川島 千帆（KAWASHIMA CHIHO）
 国立大学法人 帯広畜産大学・畜産学部・助教
 研究者番号：20374770

研究成果の概要：同じ飼養管理下で同じ乳量の高泌乳牛の中にも繁殖性や疾病発生が個体により異なることから、遺伝的要因が関与している可能性がある。そこで、分娩後の卵巣機能回復に強く関わっている肝臓での IGF-1 の産生や乳生産、成長を促す成長ホルモンの受容体（GHR）に牛で多型が確認されたことに注目し、GHR 多型と分娩後の卵巣機能回復、泌乳および成長期の増体や代謝状態との関連性を解析した。その結果、GHR 多型と成長や代謝状態との関係はみられなかったが、卵巣機能と泌乳に関連があることが示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学 獣医学 ・ 応用動物科学

キーワード：繁殖、遺伝

1. 研究開始当初の背景

分娩後の乳牛は、急激な乳量増加のため、飼料からの摂取エネルギーに乳生産のためのエネルギーが追いつかず、体脂肪を動員し、肝臓でエネルギーに変換して不足分を補っている。乳牛の高泌乳化が進んだことで、この分娩後の負のエネルギー状態はますます深刻になっており、このことが、乳牛の繁殖性の低下や周産期疾病発生率、廃用淘汰率の増加につながっている。

申請者はこれまでの研究で、分娩後早期に排卵し、分娩後3週間以内に黄体を形成した牛はその後の正常な卵巣機能の回復が早

いことを明らかにし、排卵する牛は泌乳初期の乳量増加が緩やかであり、分娩前後のインスリン様成長因子-I（IGF-1）濃度が高いという点について明確に示した。

牛では血中の IGF-1 のほとんどが肝臓で産生される。育成期では成長ホルモン（GH）と同様に成長促進に働くが、成牛では卵胞でのステロイドホルモン分泌や卵胞細胞の増殖に働く。したがって、乳牛にとって IGF-1 は卵巣機能と密接に関わっており、その IGF-1 の産生器官である肝臓の機能が乳牛の卵巣機能を向上させる最も重要な要因の一つであると考えられる。

以上のことから、申請者らは IGF-1 を産生する肝臓に着目し、肝機能に直接的または間接的に関わる因子を遺伝子解析により特定する。さらに特定された因子における成育ステージとの関連性および代謝機能への影響を検証する。

2. 研究の目的

同じ飼養管理で同じ乳量の牛の中にも脂質代謝効率が異なる場合があり、高泌乳牛の中にも繁殖性が良く、疾病になりにくい牛もいる。肝臓は IGF-1 を産生する器官であるため、このような肝機能の差が IGF-1 産生に違いをつくり、卵巣機能に差が出てくる可能性が考えられる。この肝機能の違いはどのようなことが原因で起こるのかは、まだ明確になっていないが、乳量を重視した遺伝選抜が関係している可能性は少なくない。そこで本研究では、下記の2項目について解析を行うこととした。

(1) 肝機能・脂質代謝・摂食に関わる因子の多型解析

日本における乳牛の遺伝的選抜の基準には「繁殖」に関わる因子が含まれない。エネルギー摂取による肝臓での IGF-1 産生の影響や、飼養管理による肝臓での脂質代謝効率の影響は当然考えられるが、乳量重視の選抜を続け、乳量に見合うような飼養管理法を改善してきた結果、現在のような繁殖性の低い高泌乳牛が増加した可能性も無視できない。そこで、血液から DNA を抽出し、肝機能・脂質代謝・接触に関わる因子の DNA 解析を行う。

(2) 育成期や周産期の代謝状態、泌乳および卵巣機能を遺伝形質との関連性

乳牛における IGF-1 や GH の役割は育成牛と成牛で異なる。育成期ではタンパク合成や骨端の成長を促進するが、春機発動前になるとこれらの作用は急激に縮小され、成牛になると GH は主に脂質分解や泌乳に作用し、IGF-1 は過剰な GH 分泌の抑制や卵胞発育、ステロイドホルモン合成などに働くようになる。そこで、育成牛では成長との関連性、成牛では分娩前後の代謝状態、泌乳および卵巣機能の回復と遺伝形質との関連を解析する。

3. 研究の方法

(1) 肝機能・脂質代謝・摂食に関わる因子の多型解析

本学畜産フィールド科学センターおよび道内の大型農場において、血液を採取した。採取した血液から血漿を取り除き、血球から DNA を抽出し、解析に用いた。各多型は制限酵素法により分類した。

(2) 育成期や周産期の牛の代謝状態、泌乳および卵巣機能を遺伝形質との関連性

① 育成期の代謝状態および成長と遺伝形質との関連性

本学畜産フィールド科学センターの3ヶ月齢以降の育成牛において、毎月の体格測定および2ヶ月ごとの血液生化学成分および代謝ホルモン測定を行い、各多型における成長および代謝状態との関連性と解析した。また、成牛や他の動物種ではエストラジオールが肝臓での IGF-1 産生を促進することが知られていることから、春機発動前の牛に対し安息香酸エストラジオール投与による負荷試験を行い、IGF-1 濃度変化と遺伝的多型との関連性も解析した。

② 周産期の代謝状態および分娩後の卵巣機能回復と遺伝形質との関連性

本学畜産フィールド科学センターにおいて、分娩前後の血中代謝ホルモンおよび代謝産物濃度と各多型との関連性を解析した。また、分娩前にインスリン感受性試験も行った。分娩後の卵巣機能回復に関しては、本学畜産フィールド科学センターおよび道内の一般の大規模農場において調査を行い、分娩後早期の排卵の有無における各多型との関連性を解析した。

③ 泌乳と遺伝形質との関連性

本学畜産フィールド科学センターにおいて、1～3産時の泌乳期の総乳量と各多型との関連性を解析した。泌乳期の総乳量は、最長305日間とし、途中で乳房炎などで搾乳中止になった牛は除外した。

4. 研究成果

本研究の遂行過程において、これまでに知られている GH 受容体 (GHR) 多型のうちの1つと卵巣機能・泌乳の関係性が明確になってきたため、この多型に焦点をあて、各項目の解析を行った。

(1) GHR の多型解析

各牛群における GHR 多型の内訳を表1に示した。

表1. 各牛群における GHR 多型の頭数

	C/C (両側変異型)	C/T (片側変異型)	T/T (野生型)
畜産フィールド科学センター	26頭	28頭	7頭
道内一般酪農家	55頭	20頭	2頭
合計	81頭 (58.7%)	48頭 (34.8%)	9頭 (6.5%)

両群 C/C と C/T の割合は両牛群で違いがあるものの、T/T を示した牛は両牛群ともに非常に少なかった。

(2) 育成期や周産期の代謝状態、泌乳および卵巣機能を遺伝形質との関連性

① 育成期の代謝状態および成長と遺伝形質との関連性

育成期における代謝および成長因子の一部を図1に示した。GHRの各多型と代謝および成長の各因子に関連性はなかった。

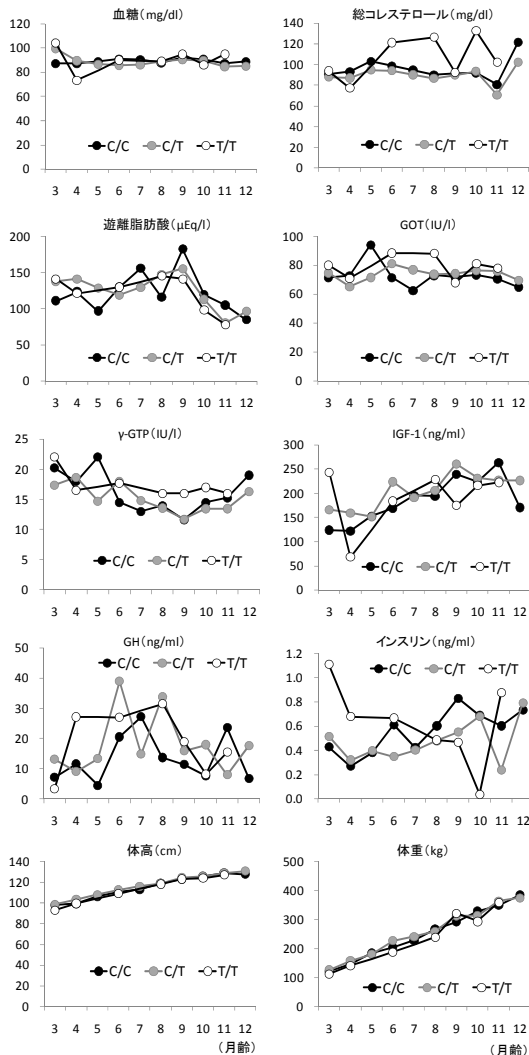


図1. 育成期の代謝因子の血中濃度および体高と体重の変化

②周産期の代謝状態および分娩後の卵巣機能回復と遺伝形質との関連性

周産期の代謝状態とGHRの多型との関連性を延べ43頭の経産牛を用いて解析し、図2に示した。各多型の頭数はC/Cが16頭、C/Tが21頭、T/Tが6頭であった。経産牛の周産期の代謝状態はGHRの多型で違いが確認されなかったが、例数が少ないため、今後頭数を追加する必要があると考えられた。

また、初産牛やインスリン負荷試験については、例数がまだ少ないため、これらについても追試を行う予定である。

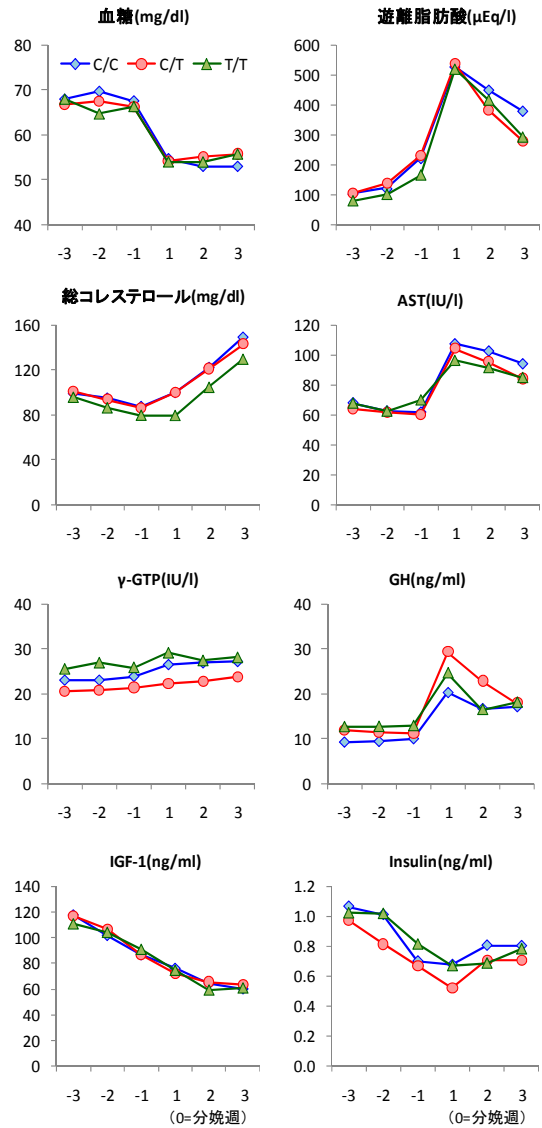


図2. 経産牛の代謝因子の血中濃度の変化

分娩後の卵巣機能回復と遺伝形質との関連性について、本学畜産フィールド科学センターの乳牛61頭(延77頭)および道内の一般の大規模農場の乳牛77頭を対象に調査を行った。分娩後3週間以内に血中プロゲステロン濃度が1ng/ml以上を示した場合を分娩後早期に初回排卵有りとし、この排卵の有無とGHR多型との関連性を検討した。

表2. 各牛群での分娩後早期排卵の有無におけるGHR多型の頭数

	C/C (両側変異型)	C/T (片側変異型)	T/T (野生型)
畜産フィールド科学センター	14/34	17/35	6/8
道内一般酪農家	18/55	13/20	1/2
合計	32/89	30/55	7/10

※合計で、P=0.0236 (カイ二乗検定)

各農場での分娩後早期排卵の有無における GHR の多型の分布を表 2 に示した。

両牛群を合わせると、GHR の多型により排卵頭数にバラつきがみられ、野生型 (T/T)、片側変異型 (C/T) 両側変異型 (C/C) の順に排卵する頭数が多かった。

さらに GHR に「T」を含む牛、すなわち「野生型・片側変異型」が排卵の有無に含まれる割合を解析したところ、「T」を持つ牛が排卵しやすいという結果が示された (表 3)。

以上より、本試験で解析した GHR の変異部位は卵巣機能と関係があることが示唆された。

表 3. 各牛群での分娩後早期排卵の有無における「T」を持つ割合

	排卵有	排卵無
畜産フィールド科学センター	23/37	20/40
道内一般酪農家	14/32	8/45
合計	37/69	28/85

※開新; P=0.0129、
合計; P=0.0098 (カイ二乗検定)

③泌乳と遺伝形質との関連性

本学畜産フィールド科学センターの乳牛 58 頭と対象に 1～3 産時の泌乳期の総乳量について解析した。初産の解析には 51 頭、2 産は 45 頭、3 産には 22 頭用いた。解析条件は、①泌乳期間の途中で乳房炎などにより搾乳中止した牛は除く、②305 日以上搾乳した牛は 305 日までの乳量とすることとした。表 4 に、各産時の GHR 多型の分布、表 5 に各泌乳期の搾乳日数を示している。

表 4. 各産時での GHR 多型の内訳

	C/C (両側変異型)	C/T (片側変異型)	T/T (野生型)
初産	2 2	2 3	6
2 産	2 1	1 9	5
3 産	9	9	4

表 5. 各産時での搾乳日数

	C/C (両側変異型)	C/T (片側変異型)	T/T (野生型)
初産	295 ^{ab}	300	293
2 産	288 ^a	296	301
3 産	304 ^b	301	294

※a vs. b; P<0.05 (C/C 群の産次内有意差)

両側変異型 (C/C) で、2 産が 3 産に比べ搾乳日数が短いことが示されたが、他に差はなかった。

初産 (図 3)、2 産 (図 4) および 3 産 (図 5) での乳量を GHR の多型ごとにそれぞれ

示した。

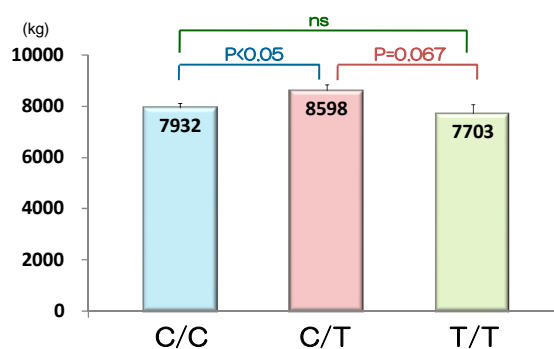


図 3. 初産時の総乳量

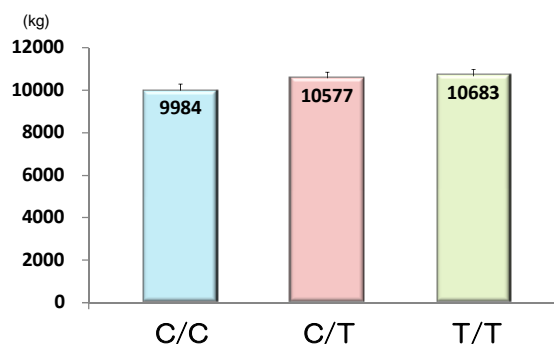


図 4. 2 産時の総乳量

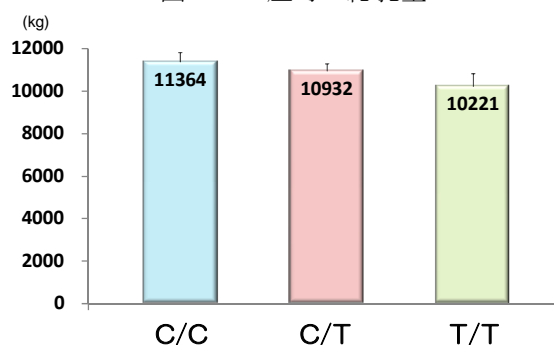


図 5. 3 産時の総乳量

初産時の乳量は片側変異型 (C/T) が両側変異型 (C/C) に比べ多く、野生型 (T/T) に比べ多い傾向があったが (図 3)、2 産および 3 産の乳量は GHR の多型による差はなかった (図 4・5)。

GHR の各多型における 1～3 産の総乳量の変化を図 6～8 に示した。片側変異型

(C/T) および野生型 (T/T) では初産から 2 産にかけて総乳量が増加したものの、2 産と 3 産の総乳量に差がなかった (図 7・8)。

一方、両側変異型 (C/C) は産次を追うごとに乳量が増加した (図 6)。しかしながら、両側変異型では 2 産と 3 産の搾乳日数に差があるため、今後さらに例数を重ねて検討する必要がある。また、乳量の増加の仕方において、片側変異型 (図 7) が両側変異型 (図 6) と野生型 (図 8) のほぼ中間を示しており、この点についても例数を増やし、更なる

解析を行いたい。

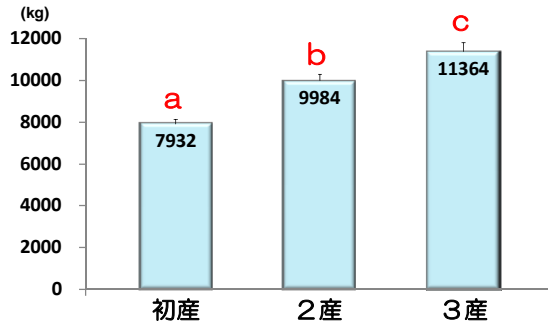


図 6. 両側変異型 (C/C) の総乳量
※a, b, c ; P<0.05

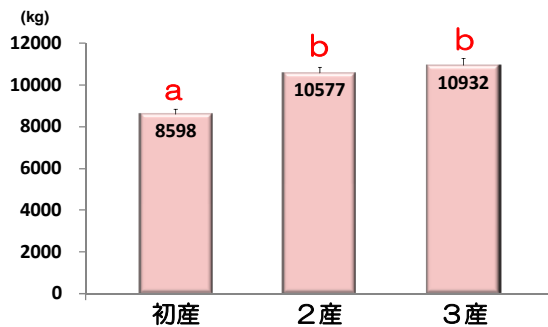


図 7. 片側変異型 (C/T) の総乳量
※a vs. b ; P<0.05

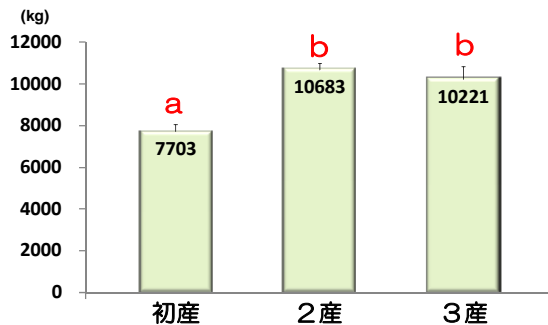


図 8. 野生型 (T/T) の総乳量
※a vs. b ; P<0.05

以上より、本試験で解析した GHR の変異部位は成長には関与しないものの、卵巣機能および泌乳に関係があることが示唆された。

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)

- ① Matsui M, Miyamoto A., Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: Practical use for reproductive management in the cow. *Vet J.*, 181(3), 232-240, (2009) 査読有
- ② Kawashima C, Kida K, Schweigert FJ, Miyamoto A., Relationship between

plasma β -carotene concentrations during the peripartum period and ovulation in the first follicular wave postpartum in dairy cows. *Anim Reprod Sci.*, 111, 105-111, (2009) 査読有

- ③ Hayashi KG, Matsui M, Shimizu T, Sudo N, Sato A, Shirasuna K, Tetsuka M, Kida K, Schams D, Miyamoto A., The absence of corpus luteum formation alters the endocrine profile and affects follicular development during the first follicular wave in cattle. *Reproduction*, 136(6), 787-97, (2008) 査読有
- ④ Shimizu T, Murayama C, Sudo N, Kawashima C, Tetsuka M, Miyamoto A., Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. *Anim Reprod Sci.*, 106(1-2), 143-152, (2008) 査読有
- ⑤ Amaya Montoya C, Matsui M, Kawashima C, Hayashi K-G, Matsuda G, Kaneko E, Kida K, Miyamoto A, Miyake Y-I., Induction of Ovulation with GnRH and PGF₂ α at Two Different Stages during the Early Postpartum Period in Dairy Cows: Ovarian Response and Changes in Hormone Concentrations. *J. Reprod Dev.*, 53(4), 867-875, (2007) 査読有
- ⑥ Kawashima C, Amaya Montoya C, Masuda Y, Kaneko E, Matsui M, Shimizu T, Matsunaga N, Kida K, Miyake Y-I, Suzuki M, Miyamoto A. A positive relationship between the first ovulation postpartum and the increasing rate of milk yield in the first part of lactation in high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 90(5), 2279-2282, (2007) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Kawashima C., Effect of exogenous estradiol on plasma metabolic hormone concentrations in the female calf. 6th International Congress on Farm Animal Endocrinology., 2008年 11月 14日, Roanoke, Virginia, USA.
- ② 川島千帆, 春機発動前の4ヶ月齢雌子牛における安息香酸エストラジオール製剤投与による血中代謝ホルモン濃度の動態、日本繁殖生物学会、2008年 9月 20日、九州大学
- ③ 川島千帆, 乳牛における分娩後の正常な卵巣周期回復時期と代謝因子との関係、

日本繁殖生物学会、2007年10月21日、
東京大学

- ④ Kawashima C., Logistic regression analysis for relationship between the timing of the resumption of normal ovarian cycles and metabolic status in postpartum dairy cows., Joint Annual Meeting ADSA-PSA-AMPA-ASAS., 2007年7月10日, San Antonio, Texas, USA.

[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) 研究代表者

川島 千帆 (KAWASHIMA CHIHO)
国立大学法人帯広畜産大学・畜産学部・
助教
研究者番号：20374470

(2) 研究分担者

松井 基純 (MATSUI MOTOZUMI)
国立大学法人帯広畜産大学・畜産学部・
准教授
研究者番号：20374462

木田 克弥 (KIDA KATSUYA)
国立大学法人帯広畜産大学・畜産学部・
准教授
研究者番号：70419216

清水 隆 (SHIMIZU TAKASHI)
国立大学法人帯広畜産大学・畜産学部・
准教授
研究者番号：90375113

宮本 明夫 (MIYAMOTO AKIO)
国立大学法人帯広畜産大学・畜産学部・
教授
研究者番号：10192767

(3) 連携研究者