

機関番号：30109

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580350

研究課題名（和文）国際標準プロトコールによる高産乳牛における妊娠喪失発生状況の解析

研究課題名（英文）Pregnancy loss in high yielding dairy cows determined by the international standard protocols

研究代表者

片桐 成二（KATAGIRI SEIJI）

酪農学園大学・獣医学部・教授

研究者番号：00292061

研究成果の概要（和文）：乳牛の不妊原因を特定するための診断および研究手法の標準化を実現するため、EU および北米の研究者との国際共同研究により、妊娠が中断する時期を特定するための国際標準プロトコールを開発した。また、この標準プロトコールを用いて実施した予備調査の結果から、わが国と海外の乳牛における胚死滅発生時期および頻度の違いを明らかにし、わが国が独自で開発し、重点的に実施しなければならない不妊症対策の領域を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：International standard protocols for diagnosis and research to determine causes of infertility in dairy cows were developed with co-investigators in EU and North American countries. A pilot survey using the standard protocols revealed potential difference in time and frequency of embryonic death between countries and/or regions. These results highlighted a few areas on which Japanese dairy industry needs to focus research activities to reduce pregnancy loss caused by embryonic death.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
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

キーワード：臨床繁殖・産科

## 1. 研究開始当初の背景

酪農業の収支を左右する乳牛の妊娠率は、過去20年間泌乳量の増加に反比例する形で低下し続けている。乳牛では、受精した胚が発生過程で失われる胚死滅とよばれる現象による不妊が、交配した牛の50%以上にみられるが、その発生時期および頻度は報告により大きく異なり、受胎性改善に向けた対策を

困難にしている。その背景には、研究者毎に不受胎につながる疾病および飼養管理の不良の定義や基準、研究手法の異なることが挙げられていた。

## 2. 研究の目的

(1) 妊娠喪失の発生状況調査に必要な研究手法を標準化する。

(2) 乳牛における受精障害、胚死滅、流・死産を含めた、いわゆる妊娠喪失の発生状況を調査し、今後わが国の酪農業が国際競争力を維持する上で緊急に取り組まなければならない、受胎性改善に向けた重点課題を明らかにする。

### 3. 研究の方法

従来、妊娠喪失の発生状況については、各研究者がそれぞれ独自の調査時期、研究手法および診断基準を用いて実施しており、その手技および方法の違いが調査結果に影響を及ぼしていた。そこで、海外の研究者と協力し、それぞれの得意分野の技術を提供し合い、同じ診断基準、研究手法を用いて妊娠喪失の頻度を調査することとした。このため、多くの研究者が直ちに利用可能なように、実施が容易で、かつ精度の高い調査が可能な標準プロトコルを開発し、これらのプロトコルを用いて調査を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 標準プロトコルの作成

研究代表者は、1) 不妊原因の鑑別診断、2) 子宮内膜採取および子宮内膜中の増殖因子、サイトカイン測定、3) 早期胚死滅のモニタリング（一部）を担当し、標準プロトコルを作成した。作成した標準プロトコルは、共同研究者が開発したものを含め、国際学会の開催に合わせて年2回のワークショップを開催し、共同研究者および一般臨床家と共有した。

子宮内膜採取および子宮内膜中の増殖因子およびサイトカイン発現の評価については、採取器具の試作、改良を行った。増殖因子およびサイトカインについては、上皮成長因子、顆粒球コロニー増殖因子、インシュリン様増殖因子-I、インターロイキン-1、-6、-8 および-10 について子宮内膜組織の生検材料を用いて酵素免疫測定法により濃度を決定する系を開発した。

科学研究費補助金による本研究の実施期間は3年間であったが、共同研究者との間では、このプロジェクトは5年間の期間で進めており、最終年となる2012年には日本でのワークショップ開催を予定している。

#### (2) 国・地域間での胚死滅発生状況の比較

胚死滅の頻度は、米国で最も高く（29～52%）、次いでわが国（12～38%）、英国、ドイツ、カナダ、スウェーデンの順であったが、発生率に有意な差はみられなかった。標準プロトコルによる調査で明らかになったわが国の高産乳牛における胚死滅の発生状況は（図1）、米国および英国の状況と類似していた。

スウェーデンでは、わが国を含む他の国に

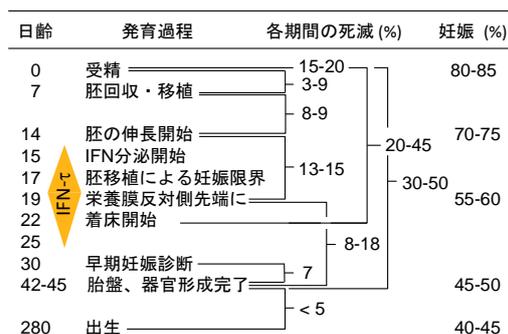


図1 経産乳牛における胚死滅の発生時期と頻度

比べ、特に夏季において妊娠14～24日目の胚死滅の割合の低いことが明らかとなった。この理由としては、スウェーデンは他の国に比べ高緯度に位置しており夏季の暑熱による影響が少ないこと、および調査対象とした乳用牛群の約30%でホルスタイン種以外の品種（スウェーデン赤牛）が飼養されていたことが挙げられる。

米国の研究者による妊娠喪失の発生状況のデータは、わが国およびEU諸国と異なり、受精障害および妊娠3日目までの胚死滅を含めた、授精後3日目までの妊娠喪失の頻度が高い傾向が示された。また、早期妊娠診断（30日頃）実施後の胚死滅が高い傾向にあることも明らかとなった。

わが国の高産乳牛群では、分娩後90日以内に授精された場合、着床期にあたる妊娠19～25日頃に胚死滅の起こる頻度が米国を除く他の国に比べて高い傾向がみられた。分娩後120日以降に授精された牛では、国および地域による胚死滅の発生状況に違いはみられなかった。

#### (3) 子宮での増殖因子発現異常と胚死滅の関係

子宮内膜での上皮成長因子（Epidermal growth factor, EGF）発現に異常のみられた乳牛では、授精後7日目までおよび同14日目から30日目までの胚死滅の頻度が増加することが分かった。この傾向は、海外の牛群においても同様であったが、EGF発現異常のみられる牛の割合は、日本および米国の牛群で高く（5～11%）、EU諸国およびカナダの牛群では低い（6%以下）傾向がみられた。

#### (4) わが国の乳牛における胚死滅発生状況の特徴と今後の課題

わが国における授精後全期間を通しての胚死滅の発生頻度は、全ての調査対象国と同等であったが、妊娠認識時期（授精後16～19日頃）および着床期の胚死滅の頻度が一部の国に比べ有意に高い傾向がみられた。特に、わが国では牛群間でこの時期の胚死滅の発生頻度に大きな差異がみられ、農場間の飼養管理技術の水準における差が反映されるこ

とが示唆された。

また、わが国では、分娩後 90 日までに授精された牛での胚死滅の発生頻度が、他の国に比べ高い傾向にあり、早急にその原因を明らかにする必要があると考えられた。

最後に、子宮内膜での増殖因子発現異常を示す牛の割合が高く、卵巣ホルモンを含めた内分泌環境の改善が必要であることもわが国の牛群の特徴であり、子宮での増殖因子発現を正常化するための治療処置、あるいは飼養管理の改善による予防方法の開発が必要である。

本プロジェクトでは、平成 23 年度に標準プロトコルを完成したところであり、上記データは標準プロトコル試案を現場で評価する過程で得られたものである。現在、標準プロトコルによる胚死滅の発生状況に関するデータ採取を継続しているところであり、2012 年に成果をとりまとめる予定である。

#### 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 9 件)

1. Higaki S, Fujii H, Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y. Measurement of pO<sub>2</sub> in cultured mouse oocytes using electron paramagnetic resonance oximetry. *Biomed Res* 31:165-168, 2010. 査読あり

2. Higaki S, Eto Y, Kawakami Y, Yamaha E, Kagawa N, Kuwayama M, Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y. Production of fertile zebrafish (*Danio rerio*) possessing germ cells (gametes) originated from primordial germ cells recovered from vitrified embryos. *Reproduction* 139:733-740, 2010. 査読あり

3. Higaki S, Mochizuki K, Akashi Y, Yamaha E, Katagiri S, Takahashi Y. Cryopreservation of primordial germ cells by rapid cooling of whole zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J Reprod Dev* 56:212-218, 2010. 査読あり

4. Higaki S, Mochizuki K, Baba H, Akashi Y, Yamaha E, Katagiri S, Takahashi Y. Feasibility of cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by whole embryo freezing. *Jap J Vet Res* 57:119-128, 2009. 査読あり

5. Yanagawa Y, Matsuura Y, Suzuki M,

Saga S, Okuyama H, Fukui D, Bando G, Katagiri S, Takahashi Y, Tsubota T. Fetal age estimation of Hokkaido Sika deer (*cervus nippon yesoensis*) using ultrasonography during early pregnancy. *J Reprod Dev* 55:143-148, 2009. 査読あり

6. 片桐成二. 乳牛の分娩後の子宮回復および炎症性子宮疾患の分類. *臨床獣医* 27:10-15, 2009. 査読なし

7. 片桐成二. 牛の子宮内膜における上皮成長因子濃度と受胎性の関係—受精卵移植レシピエント牛の選抜への応用の可能性. *家畜人工授精* 255: 1-13, 2009. 査読なし

8. Katagiri S, Takahashi Y. A progestin-based treatment with a high dose of Estradiol benzoate normalizes cyclic changes in endometrial EGF concentrations and restores fertility in repeat breeder cows. *J Reprod. Dev* 54:473-479, 2008. 査読あり

9. Yanagawa Y, Matsuura Y, Suzuki M, Katagiri S, Tsubota T. Immunohistochemical localization of the estrogen receptor alpha (ERα) and progesterone receptor (PR) in the uterus of sika deer (*cervus nippon*) during pregnancy. *Jap J Vet Res* 56:139-149, 2008. 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

1. 片桐成二. 牛の精漿による子宮内膜の免疫調節. 平成 22 年度北海道牛受精卵移植研究会講演会・シンポジウム、2011 年 2 月 17 日、札幌、招待講演

2. 永井克尚、Gautam Gokarna、小坂啓太、安藤貴朗、森好政晴、片桐成二. 2 種の腔内留置型プロジェステロン徐放剤を用いた定時胚移植プログラムにおける受胎率、P<sub>4</sub>濃度変化および排卵後 2 日目の子宮内膜 EGF 濃度の検討. 日本獣医師会学会年次大会、2011 年 2 月 12 日、岐阜

3. Katagiri S, Akemi Y, Nakata Y, Shirasawa A, Kaneko E, Takahashi Y. Seminal plasma contains protein to normalize the epidermal growth factor profile in the uterine endometrium and to restore fertility in repeat breeder cows. XXVI World Buiatrics Congress (第 26 回世界牛病学会)、2010 年 11 月 18 日、サンチアゴ、チリ

4. Kaneko E, Shirasawa A, Katagiri S, Akemi Y, Nakata Y, Takahashi Y. Effect of seminal plasma on uterine EGF profile and fertility in high yielding repeat breeder cows. International Symposium on Declining Fertility in Dairy Cows in the World; Its Causes and Possible Solutions. 2010年1月31日、宮崎

5. 片桐成二. 乳用牛にみられる子宮内膜での上皮成長因子発現異常とその対策. 第102回日本繁殖生物学会大会、2009年9月11日、奈良 **招待講演**

6. 白澤篤、片桐成二、金子絵美、高見野枝、明見好信、中田喜雄、高橋芳幸. 牛精漿による子宮内膜上皮成長因子の発現増強および受胎促進効果. 2009年9月11日、奈良

7. 片桐成二. 牛子宮内膜における増殖因子発現調節による受胎性促進の試み. 第28回北海道牛受精卵移植研究会、2009年8月18日、札幌 **招待講演**

8. 片桐成二. 牛における子宮内膜上皮成長因子(EGF)発現と受胎性の関係. 日本獣医学会学術集会、2009年4月2日、宇都宮 **招待講演**

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

片桐 成二 (KATAGIRI SEIJI)  
酪農学園大学・獣医学部・教授

研究者番号：00292061

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし