

令和元年6月19日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07738

研究課題名(和文)ウシの血中脂肪酸濃度と卵子品質・胚発生の関連性と繁殖性に及ぼす影響について

研究課題名(英文) The effect of bovine blood fatty acid concentration causes in ovum or embryo quality and reproduction

研究代表者

高橋 正弘 (TAKAHASHI, Masahiro)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：50582334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：牛胚の輝度について定量的測定を実施した。黒毛和種牛はホルスタイン種牛に比べて胚の輝度が有意に高かった。黒毛和種牛における胚の輝度は季節間で有意差が見られた。胚の輝度を定量的に測定し、客観的に評価することが可能であった。

バイパス不飽和脂肪酸投与が、経膈採卵により採取した牛卵子の脂肪酸濃度ならびに輝度を与える影響について調査した。卵子の輝度ならびに脂肪酸濃度は、0～4週に至るまで有意な変化は認められなかった。血漿脂肪酸濃度はPL分画にてオレイン酸とリノール酸、SE分画にてリノール酸およびTG分画にてオレイン酸の濃度の上昇が確認されたが、卵子脂肪酸濃度は有意な変化は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

牛胚の輝度は品種間ならびに季節間で差が認められた。輝度ヒストグラム簡易測定法によって胚ならびに卵子の輝度を定量的に測定し、客観的に比較することが可能であった。また、牛にバイパス不飽和脂肪酸を投与すると血漿中脂肪酸濃度は上昇するが、必ずしも卵子中脂肪酸濃度に影響を及ぼさなかった。今回の研究成果は、胚輝度の定量的測定は胚ならびに卵子品質の評価項目の一つとして用いることができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： The brightness of the cow embryo was measured quantitatively. The embryo brightness of the Japanese black cow was significantly higher than Holstein cow. The embryo brightness of the Japanese black cow had a significant difference in a season (summer> autumn> winter). We could measure the embryo brightness quantitatively and were able to evaluate it objectively. We studied effect on the fatty acid concentration and brightness of bovine ovum collected by ovum pick-up (OPU) during bypass polyunsaturated fatty acid administration. The ovum brightness and the fatty acid concentration did not have the significant change for 0-4 weeks. The concentration of oleic acid and linoleic acid of the PL fraction, linoleic acid of the SE fraction, and oleic acid of the TG fraction increased in plasma. The ovum fatty acid concentration did not have the significant change.

研究分野：臨床繁殖学，産業動物臨床学

キーワード：牛 繁殖性 バイパス不飽和脂肪酸 卵子 胚 脂肪酸分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

牛の人工授精による受胎率は年々低下しており、世界的に大きな問題となっている。問題は深刻であるものの、原因はいまだ解明されておらず、解決策は見えてきていないのが現状にある。脂肪酸は牛の繁殖機能に重要な役割を果たしているが、卵子品質や胚発生を向上させる機序は、いまだ明らかとなっていない。ある種の不飽和脂肪酸を生体牛に投与することにより、牛卵子品質が可逆的に改善され、牛の繁殖性が向上する可能性が示唆される。また、牛において胚の品質は肉眼で形態学的に判断されており、輝度の低い胚は耐凍性も低く、形態学的に判断される品質よりも受胎性が低い可能性がある。これは、胚の脂質組成が異なるのではないかと考えられているが明らかとなっていない。

2. 研究の目的

牛の受胎率低下の要因については、いまだ明確に解明されておらず、その要因を除去するためには、特に雌側からのアプローチが重要である。本研究では、雌側の要因、すなわち血中の脂肪酸濃度と卵子品質の関連性を調べ、卵子や胚に与える影響を詳しく解析することにより牛の受胎率低下の原因を探ることを目的とする。また、バイパス不飽和脂肪酸の給与が与える影響を解析し、受胎率向上の対策に役立てることにある。

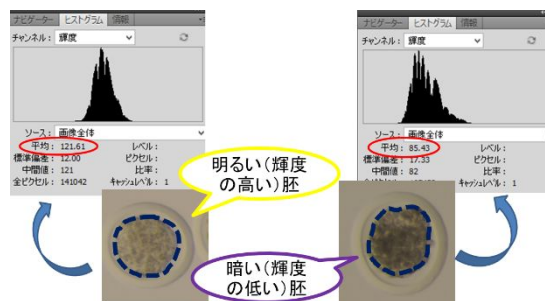
3. 研究の方法

(1) ホルスタイン種牛の血中脂肪酸濃度測定法の確立

ホルスタイン種経産牛 30 頭 (健康牛 10 頭、炎症性疾患牛 11 頭、代謝性疾患牛 9 頭) の血中脂肪酸濃度を測定した。脂質抽出 (Bligh 法) および薄層クロマトグラフィーで処理を行い、脂質をステロールエステル (SE)、トリグリセリド (TG)、遊離脂肪酸 (FA)、リン脂質 (PL) に分離し、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸濃度を測定した。

(2) 胚の品質 (輝度) と血中脂肪酸濃度の関係

牛胚の輝度について定量的測定を検討し、採胚成績との関連性について調査した。黒毛和種牛 46 頭ならびにホルスタイン種牛 8 頭に対して過剰排卵処置を施し採胚を行った。採胚成績 (回収総数、正常胚数、正常胚率) ならびに胚の品質を記録し、検卵時に胚のデジタル画像を撮影した。Adobe Photoshop を用いて、輝度ヒストグラム簡易測定法によって個々の胚の輝度を測定し、品種間の比較を行った (右図)。さらに黒毛和種牛の胚の輝度については、胚の品質、採取した季節ならびに発育ステージ (収縮桑実胚 ~ 胚盤胞) における比較を行った。また、採胚日に尾動静脈より採血し、血漿分離し血液生化学測定、脂肪酸濃度測定を行い、採胚成績ならびに胚の輝度との関係を解析した。



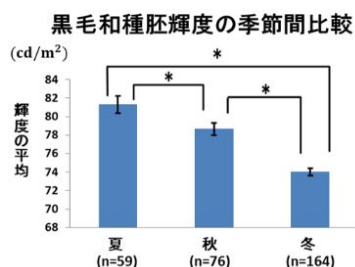
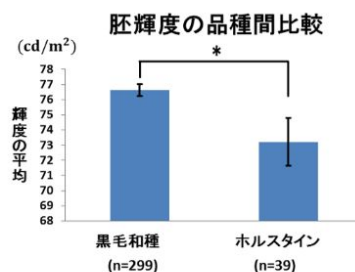
Photoshop®ソフトでデジタル画像を読み込み、細胞をなげなわツールで囲んで選択し、輝度ヒストグラムを測定した。

(3) バイパス多価不飽和脂肪酸 (PUFA) 投与が牛卵子の脂肪酸濃度ならびに輝度と与える影響

ホルスタイン種牛 6 頭にバイパス PUFA としてトマリノール (日清丸紅飼料 (株)) を与え、非投与日 (対照群) から約 1 週間おきに経腔採卵 (OPU) を行った。卵子のデジタル画像を記録し、Adobe Photoshop CS5.1 を用いた輝度ヒストグラム簡易測定法にて、個々の卵子の輝度を測定し、輝度測定後の卵子と血漿から脂肪酸抽出を行った。

4. 研究成果

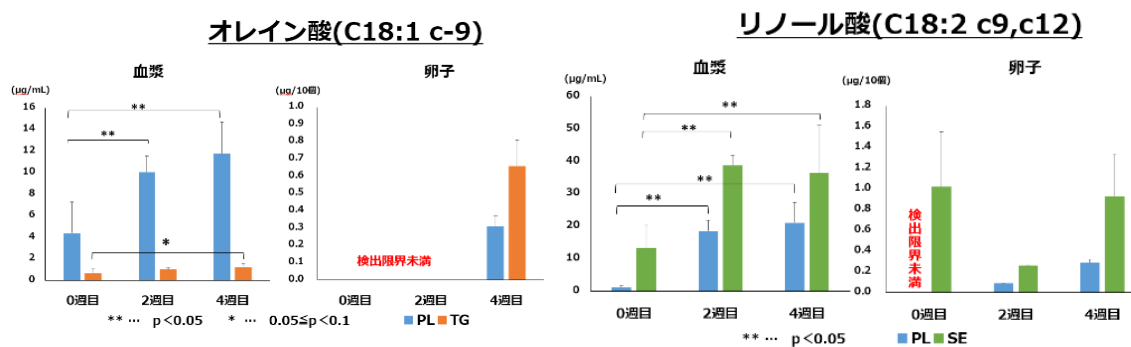
(1) 炎症性疾患牛の脂肪酸濃度は、PL の C17:0 における高値、FA 分画の C16:0 における低値がみられた。SE の C18:1 (c-11) における高値、FA の C15:0、C16:0、C18:1 (c-9)、C20:0、C22:0、C24:0、PL の C12:0、C16:0、C22:0、C20:5 (n-3) における低値がみられた。代謝性疾患牛の脂肪酸濃度では、SE の C18:2 (c9, c12)、PL の総不飽和脂肪酸における高値、FA の C12:0 における低値がみられた。これらより、炎症性疾患牛では FA の C16:0 濃度が特異的に減少することが認められた。代謝性疾患牛では PL の不飽和脂肪酸濃度が上昇することが示唆された。



(2) 黒毛和種牛はホルスタイン種牛に比べて胚の輝度が有意に高く、黒毛和種牛における胚の輝度は季節間 (夏 > 秋 > 冬) で有意な差が見られた (右図)。胚の品質ならびに発育ステージ間では差は見られなかった。相関分析では回収総数と総蛋白で有意な正の相関、回収総数とトリグリセリドならびに正常胚率と尿素窒素には有意な負の相関がみられた。胚の輝度と血液生化学値の間には相関性は認められなかった。採胚成

績と血液生化学値に相関性があり，血液生化学性状は採胚成績に影響を与えている可能性が認められた．

(3) 卵子輝度は対照群にあたる 0 週目から 4 週目に至るまで有意な変化は認められなかった．卵子脂肪酸濃度は，遊離脂肪酸 (FA)，リン脂質 (PL)，ステロールエステル (SE) およびトリグリセリド (TG) 分画全てにおいて経時的な変化は認められず，全期間において飽和脂肪酸であるパルミチン酸とステアリン酸が高値を示した．一方で，血漿脂肪酸濃度は PL 分画にてオレイン酸とリノール酸，SE 分画にてリノール酸および TG 分画にてオレイン酸の濃度の上昇が確認された (下図)．血漿脂肪酸濃度がバイパス PUFA の投与によって上昇したのに対し，必ずしも卵子中脂肪酸濃度に影響を及ぼさなかった．現在では卵子のランク分類は卵丘細胞の状態により判断されている．輝度測定は単独で品質判断に用いることは適さないが，卵子卵丘細胞複合体 (COC) の客観的品質評価の一指標として用いることができる可能性がある．



< 引用文献 >

Takahashi M, Sawada K, Kawate N, Inaba T, Tamada H. Improvement of superovulatory response and pregnancy rate after transfer of embryos recovered from Japanese Black cows fed rumen bypass polyunsaturated fatty acids. *J Vet Med Sci.* 2013; 75:1485-90.
 Fouladi-Nashta AA, Wonnacott KE, Gutierrez CG, Gong JG, Sinclair KD, Garnsworthy PC, Webb R. Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids. *Reproduction.* 2009; 138:771-81.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

T. Tamura, Y. Okubo, Y. Deguchi, S. Koshikawa, M. Takahashi, Y. Chida, K. Okada. Dairy cattle behavior classifications based on decision tree learning using 3-axis neck mounted accelerometers. *Anim Sci J.* 査読有, 90 巻, 2019, 589-596.
 DOI: 10.1111/asj.13184.

T. Yamamoto, H. Manabe, N. Misawa, W. Yamazaki, M. Takahashi, K. Okada. Combination effect of allyl isothiocyanate and hoof trimming on bovine digital dermatitis. *J Vet Med Sci.* 査読有, 80 巻, 2018, 1080-1085.
 DOI: 10.1292/jvms.18-0097. Epub 2018 May 9.

K. Yoshida, Y. Ohta, N. Kawate, M. Takahashi, T. Inaba, S. Hatoya, H. Morii, K. Takahashi, M. Ito, H. Tamada. Long-term feeding of hydroalcoholic extract powder of *Lepidium meyenii* (maca) enhances the steroidogenic ability of Leydig cells to alleviate its decline with ageing in male rats. *Andrologia.* 査読有, 50 巻, 2018, e12803.
 DOI: 10.1111/and.12803.

M. Takahashi, T. Honda, S. Hatoya, T. Inaba, N. Kawate, H. Tamada. Efficacy of mechanical micro-vibration in the development of bovine embryos during in vitro maturation and culture. *J Vet Med Sci.* 査読有, 80 巻, 2018, 532-535.
 DOI: 10.1292/jvms.17-0607

高橋正弘, 山本公平. 牛の繁殖性や過剰排卵反応に及ぼす多価不飽和脂肪酸の効果, 産業動物臨床医誌. 査読有, 8 巻, 2017, 201-207.
 DOI: https://doi.org/10.4190/jjla.8.201

T. Shinohara, Y. Ohta, N. Kawate, M. Takahashi, N. Sakagami, T. Inaba, H. Tamada. Treatment with the MAPK kinase inhibitor U0126 during the first two hours of in vitro maturation improves bovine oocyte developmental competence. *Reprod Domest Anim.* 査読有, 53 巻, 2017, 270-273.
 DOI: 10.1111/rda.13096.

R. Kanegi, S. Hatoya, Y. Tsujimoto, S. Takenaka, T. Nishimura, V. Wijewardana, K. Sugiura, M. Takahashi, N. Kawate, H. Tamada, T. Inaba. Production of feline leukemia

inhibitory factor with biological activity in *Escherichia coli*. *Theriogenology*. 査読有, 86 巻, 2016, 604-611.

DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.02.013

Y. Ohta, K. Yoshida, S. Kamiya, N. Kawate, M. Takahashi, T. Inaba, S. Hatoya, H. Morii, K. Takahashi, M. Ito, H. Ogawa, H. Tamada. Feeding hydroalcoholic extract powder of *Lepidium meyenii* (maca) increases serum testosterone concentration and enhances steroidogenic ability of Leydig cells in male rats. *Andrologia*. 査読有, 48 巻, 2016, 347-354.

DOI: 10.1111/and.12453. Epub 2015 Jul 14.

H. Tamada, K. Takemoto, M. Tominaga, N. Kawate, M. Takahashi, S. Hatoya, S. Matsuyama, T. Inaba, T. Sawada. Expression and localization of epidermal growth factor, transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor in the canine testis. *J. Reprod. Dev.* 査読有, 62 巻, 2016, 59-64.

DOI: 10.1262/jrd.2015-079. Epub 2015 Oct 26.

K. Hatate, K. Shinya, A. Mastsuo-Sato, S. Sasaki, B. Devkota, M. Takahashi, T. Hirata, N. Yamagishi. Changes in the plasma levels of several bone markers in newborn calves during the first two days of life. *J. Vet. Med. Sci.* 査読有, 78 巻, 2016, 337-340.

DOI: 10.1292/jvms.15-0358. Epub 2015 Oct 10.

高橋正弘, 平田統一, 山岸則夫. 過剰排卵処置による採胚性が低い牛における経膈採卵の有効性. *J. Mamm. Ova Res.* 査読有, 32 巻, 2015, 173-176.

https://kenkyuukai.m3.com/journal/journal_contents.asp?j_type=0&id=2148&co_id=36291&s_id=150&file=1

B. Devkota, M. Takahashi, S. Sato, K. Sasaki, A. Ueki, T. Osawa, M. Takahashi, N. Yamagishi. Plasma fluctuation in estradiol-17 and bone resorption markers around parturition in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 査読有, 77 巻, 2015, 875-878

DOI: 10.1292/jvms.15-0018

MA. Hannan, N. Kawate, Y. Kubo, IN. Pathirana, EE. Büllesbach, S. Hatoya, T. Inaba, M. Takahashi, H. Tamada. Expression analyses of insulin-like peptide 3, RXFP2, LH receptor, and 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in testes of normal and cryptorchid dogs. *Theriogenology*. 査読有, 84 巻, 2015, 1176-1184.

DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.06.021.

〔学会発表〕(計 11 件)

白土 夏穂, 山本公平, 岡田啓司, 高橋正弘. 多価不飽和脂肪酸投与が経膈採卵により採取したウシ卵子の脂肪酸濃度ならびに輝度に与える影響. 第 59 回日本卵子学会学術集会, 2018 年

品田若菜, 出口善隆, 越川志津, 高橋正弘, 千田廉, 岡田啓司. 乳牛の分娩前における行動と分娩時間帯の関係. 平成 30 年度獣医学術東北大会, 2018 年

嶽間澤直弥, 越川志津, 伊藤孝浩, 藤原哲雄, 出口善隆, 高橋正弘, 千田廉, 岡田啓司. 乳用経産牛における頸部装着 3 軸加速度センサによる周産期疾病予知の可能性. 平成 30 年度獣医学術東北大会, 2018 年

白土夏穂, 山本公平, 岡田啓司, 高橋正弘. 多価不飽和脂肪酸投与が経膈採卵により採取したウシ卵子の脂肪酸濃度ならびに輝度に与える影響. 第 59 回日本卵子学会学術集会, 2018 年

佐藤拓, 出口善隆, 越川志津, 伊藤孝弘, 藤原哲雄, 千田廉, 岡田啓司, 高橋正弘. 乳牛における頸部装着 3 軸加速度センサによる分娩前行動と産次・分娩時間帯の関係. 日本畜産学会第 123 回大会, 2017 年

中鉢友紀乃, 千葉祐一, 大津信一, 坂下憲悦, 丸田博, 木村健, 佐藤早央梨, 宮崎珠子, 岡田啓司, 高橋正弘. ウシ胚の輝度と血液生化学値ならびに採胚成績との関係. 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016 年

宮崎珠子, 宮崎雅雄, 山下哲郎, 高橋正弘, 佐藤繁, 岡田啓司. 新生子牛の初乳摂取前後における血清メタボローム解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016 年

篠原健志, 太田祥弘, 川手憲俊, 高橋正弘, 坂上信忠, 稲葉俊夫, 玉田尋通. ウシ卵子の体外成熟培養時における MAPKK 阻害剤 (U0126) 添加の胚発生に及ぼす影響. 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016 年

高橋正弘, 本田龍駿, 鳩谷晋吾, 稲葉俊夫, 川手憲俊, 玉田尋通. 成熟培養時の機械的振動によるウシ胚発生率の向上. 第 22 回日本胚移植研究会, 2015 年

吉田圭佑, 太田祥弘, 川手憲俊, 高橋正弘, 稲葉俊夫, 鳩谷晋吾, 森井浩子, 高橋勝美, 井藤美咲, 玉田尋通. *Lepidium meyenii* (マカ) エキス末の性成熟期および成熟雄ラットへの長期給与が精巢のテストステロン産生に及ぼす影響. 第 158 回日本獣医学会学術集会, 2015 年

羽立薫, 新屋和彦, 佐藤麻子, 佐々木修一, Bhuminand Devkota, 高橋正弘, 平田統一, 山岸則夫. 黒毛和種新生子牛における血中骨代謝マーカーの変動. 第 158 回日本獣医学会学術集会, 2015 年

術集会, 2015 年

〔その他〕

<http://univdb.iwate-u.ac.jp/profile.php?userId=785>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山本 公平

ローマ字氏名：YAMAMOTO, Kohei

所属研究機関名：大阪府立大学

部局名：総合リハビリテーション学研究科

職名：客員研究員

研究者番号(8桁): 20364028