

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月15日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18805

研究課題名(和文) バイオマーカーによる家畜の卵巣機能の質および量的評価法の確立

研究課題名(英文) Evaluation by clinical biomarker for quality and quantity of ovarian function in livestock animals

研究代表者

北原 豪 (Kitahara, Go)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：90523415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、家畜としてウシにおける卵巣機能の質的評価のバイオマーカーとなる物質をサイトカインや代謝関連物質から探索し、既に明らかになっている量的評価のバイオマーカーである抗ミュラー管ホルモン(AMH)と組み合わせ、実証試験を行いながら評価法の開発を行った。その結果、肝機能や脂質代謝に関わる血液化学物質(総コレステロール、LDL、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、リン)は、AMHと相関性を有し、さらに牛群の繁殖性の違いを示すこともできた。よって、AMHとともにこの血液化学物質をもって、卵巣機能を質および量的評価でき、さらには牛群の繁殖性の良し悪しを判断できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

繁殖効率の改善には、繁殖能力の高い個体の選抜や増産、科学的根拠に基づいた繁殖管理(診断、治療、評価など)が必要で、本課題で開発するバイオマーカーによる卵巣機能の質と量の両面をカバーした評価法は、ホルモン剤に依存しない食の安全・安心に寄与した新しい繁殖管理技術として国内外の家畜生産に速やかに受け入れられ、さらにウシと同様に繁殖効率が求められるブタやヒツジなどの産業動物への応用に期待が持てる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was 1) Search clinical biomarkers for evaluation of quality in bovine ovarian function, and 2) Clinical trial in field on the evaluation of reproductive performances by them with anti-Müllerian hormone (AMH), which was the clinical biomarker for evaluation of quantity.

In the result, some blood chemicals (total cholesterol, LDL, aspartate aminotransferase, and phosphorus) correlated with blood AMH levels. Moreover, their blood levels were differed among farms which reproductive performances were unlike. In conclusion, the combination of some blood chemicals which related to liver function and lipid metabolism and AMH may be able to evaluated not only ovarian function but also reproductive performances in farms.

研究分野：獣医臨床繁殖学

キーワード：ウシ 卵巣機能 臨床バイオマーカー 抗ミュラー管ホルモン 質的評価 量的評価

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

1. 研究開始当初の背景

畜産業の生産性の向上には、雌畜の繁殖効率の改善が挙げられる。ウシは、理論的に一年に一回の分娩を行うことができる。しかし、国が平成 27 年に改正した家畜改良増殖目標に肉用牛の分娩間隔を短縮させること(平成 27 年は 405 日、平成 37 年には 380 日)を掲げている様に、実際には達成できていない。これまでも分娩間隔の短縮に向け、ホルモン製剤による発情周期の調整や早期妊娠診断などが講じられてきたが、目標の達成には至っていない。この理由には、個体の能力や個体が今おかれている現状を適正に把握できていないことがある。この点において、雌性性腺である卵巣における要因として、卵巣内の 1) 卵胞数、2) 局所環境がある。

バイオマーカーとは、血液や尿などの体液や組織に含まれる生体由来の物質で、生体内の生物学的変化を定量的に把握するための指標である。家畜の繁殖機能をバイオマーカーで評価した事例は少ない。バイオマーカーによって卵巣機能を量(卵胞数)と質(局所環境)の両面から個体を的確に評価できれば、優良家畜の選抜、飼養や治療の適正な管理が可能となり、分娩間隔の短縮が期待できる。

家畜において、生まれた時には卵巣内にある卵胞数が既に決定しており、経年齢的に減少する。抗ミュラー管ホルモン(AMH)は卵胞内の顆粒層細胞からのみ合成、分泌され、卵巣内の卵胞数と正に相関する。これを基に、乳用ウシの胚生産(Rico, *et al.*, 2012)、日本固有の肉用ウシである黒毛和種の春機発動の開始時期(El-Sheikh Ali, *et al.*, 2015)や胚生産(北原ら, 日本産業動物獣医学会九州地区学会, 2012)において、AMH がバイオマーカーとなる可能性が明らかになってきた。よって、AMH がウシの卵巣機能の量的バイオマーカーとして有用であることが示唆されている。

ウシにおいて、遊離脂肪酸(NEFA)やアンモニア(NH₃)などが高いレベルで存在すると卵子の品質に影響することが報告されているが、*in vitro*での試験が多い。ヒト医療では、体外受精の成否に吸引した卵胞の卵胞液あるいは同液より回収した顆粒層細胞における AMH(嶋田ら, 2013)、顆粒球コロニー刺激因子(:G-CSF, Ledee, *et al.*, 2013)、インターロイキン-6(:IL-6, Altun, *et al.*, 2011)などのホルモンやサイトカインの発現量が関与している可能性が報告されており、卵胞液や顆粒層細胞で AMH が高い、G-CSF や IL-6 が低いと、同卵胞より獲られた卵子は未受精となる割合が高かった報告がある。一方で、ブタにおいて、IL-6 の体外発生培地への添加はブタ卵子の発生を促進させることが報告されているなど、異なる見解もある。しかし、ウシを含む雌畜の生体で、これら生理活性物質について、卵巣機能の質的バイオマーカーとして検討した報告はほとんどない。

2. 研究の目的

本研究では 2 つの試験を通して、家畜の卵巣機能におけるバイオマーカーを用いた質および量的評価法の開発を行った。

試験 1

卵巣内の局所環境の評価を担うバイオマーカーの探索を行う上で、代謝関連物質およびサイトカインについて、卵胞液と体循環血液の関係性を明らかにし、さらに量的指標である AMH に影響を及ぼす代謝関連物質について調べた。

試験 2

家畜の卵巣機能におけるバイオマーカーを用いた質および量的評価法の確立するため、試験 1 で可能性を見出したバイオマーカーについて、肉用繁殖牛を飼養している農場を用いた実証試験を行った。

3. 研究の方法

試験 1

試験 1 - 1 : 代謝関連物質の卵胞液と体循環血液の比較

黒毛和種経産牛(n=7)を排卵同期化し、排卵卵胞より超音波ガイド下で卵胞液を回収し、遠心分離し、上清を測定に用いた。また、卵胞液の回収時に頸静脈より採血を行い、遠心分離し、血漿を測定に用いた。代謝関連物質として、NEFA、尿素窒素(UN)および NH₃ を酵素法にて測定し、卵胞液と体循環血液での濃度を比較した。

試験 1 - 2 : サイトカインの卵胞液と体循環血液の比較

正常な発情周期を営む黒毛和種経産牛(n=3)について隔日に 11 回採血を行い、インターロイキン-6(IL-6)および顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の発現と血中プロジェステロン濃度を調べ、発情周期による両サイトカインへの影響を調べた。体循環血液中の各サイトカイン発現量はリアルタイム PCR にて、血中プロジェステロン濃度は免疫蛍光測定法にて、それぞれ測定した。また、試験 1 - 1 の卵胞液と体循環血液の各サイトカイン発現量を比較した。サイトカインのプライマーは、IL-6 (Forward: CCAGGAACGAAAGAGAGC、Reverse: CAGAAGTCATCACCAGGAG)、G-CSF (Forward: CGCCATGCCGACCTTCACT、Reverse: ATGCCAGCTCCAGGAAACGA)とし、ハウスキーピングとして GAPDH (Forward:

GTTCACGGCAGTCAAGGCAGAG、Reverse: ACCACATACTCAGCACCAGCATCAC) を用いた。

試験 1 - 3 : 血液中の AMH と代謝関連物質との関係

黒毛和種経産牛 (4 農場、n = 74) について、経静脈より採血を行い、AMH と代謝関連物質との関係を調べた。AMH は酵素免疫測定法で測定した。代謝関連物質は、総蛋白質 (TP)、アルブミン (ALB)、血中尿素窒素 (BUN)、総コレステロール (T-Cho)、LDL コレステロール、HDL コレステロール、リポ蛋白、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、グルタミルトランスペプチダーゼ (GTP)、カルシウム (Ca)、マグネシウム (Mg)、リン (P)、グルコース (Glu) および NEFA を酵素法および比色法で測定した。

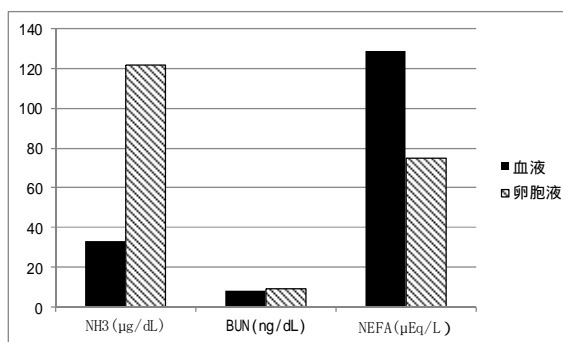
試験 2

試験 1 - 3 で調べた農場のうち 3 農場 (n = 65) をモデルに、繁殖性と AMH や代謝関連物質との関係を明らかにした。繁殖性について、分娩後初回人工授精 (AI) 日数、分娩後初回 AI 受胎率および空胎日数を調べ、これらの項目の優れた順に、高繁殖性農場、中繁殖性農場、低繁殖性農場とし、農場間での AMH や代謝関連物質の差異を調べた。

4. 研究成果

試験 1 - 1

NH₃ において卵胞液中のレベルが血液中に比べ有意に高いことが分かった (P < 0.01)。また、UN と NH₃ は、卵胞液と血液の間において、強い正の相関関係 (それぞれ r = 0.88、0.75) にあることが分かった。



試験 1 - 2

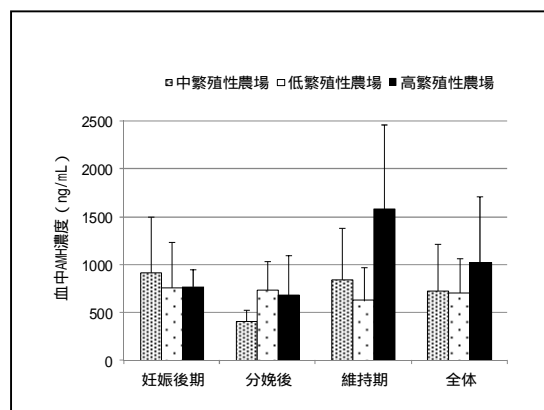
発情周期別 (卵胞期、黄体初期、黄体開花期、黄体退行期) における IL-6 および G-CSF は変動せず、また血中プロジェステロン濃度や末梢血中好中球数との間に有意な相関性はみられなかった。よって、健全であれば、発情周期や好中球数を考慮せず用いることができるサイトカインであったが、血液及び卵胞液での相関性や有意な差はみられなかった。

試験 1 - 3

血中 AMH レベルに影響を及ぼす代謝関連物質を探索した結果、T-Cho、LDL、AST および P が AMH と有意な相関性を示した (それぞれ相関係数が、0.27、0.23、-0.25、-0.28、いずれも P < 0.05)。

試験 2

T-Cho、LDL、AST および P は、繁殖性の異なる農場間で有意な差を示した。また、牛群の平均血中 AMH 濃度は、低および中繁殖性農場に比べ、高繁殖性農場が高くなることが分かった (それぞれ P < 0.10、0.05)。



結論として、ウシにおける卵巢機能を質的および量的に評価する上での臨床バイオマーカーとして、サイトカインからは本研究で見出すことはできなかった。しかし、肝機能や脂質代謝に関係する血液化学物質は、抗ミュラー管ホルモン (AMH) と相関性を有し、卵巢機能に続く牛群の繁殖性を評価する上で、AMH とともに有用な臨床バイオマーカーとなる可能性が示唆された。今後は、更に臨床バイオマーカーの探索を行うとともに、見出された物質の組み合わせによってより最適な指標を有した評価法へのブラッシュアップが望まれる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) 北原 豪、畜産業の生産性向上に向けた将来の繁殖性を評価する技術開発、311、2-8、2019 (査読無)
- 2) 北原 豪、産業動物分野における抗ミュラー管ホルモンの臨床応用、家畜診療、65、491-499、2018 (査読無)

〔学会発表〕(計1件)

- 1) 北原 豪、先生、どうすればいい？これからのウシの繁殖管理、大分県獣医師会産業動物部会(招待講演) 2019年3月

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/rinpan/job.html>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：大澤 健司、小林 郁雄、目堅 博久、邊見 広一郎

ローマ字氏名：Osawa Takeshi, Kobayashi Ikuo, Mekata Hirohisa, Hemmi Koichiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。