

令和 3 年 4 月 28 日現在

機関番号：11201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14579

研究課題名(和文) 乳牛の「沈黙の排卵」を見破る尿中発情期判定バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Urinary biomarker search for estrus detection of "silent ovulation" in dairy cows.

研究代表者

宮崎 珠子 (Miyazaki, Tamako)

岩手大学・農学部・日本学術振興会特別研究員 (RPD)

研究者番号：00727456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：乳牛は、牛乳を供給するため毎年出産を繰り返し泌乳し続ける。そのため出産後2か月の子宮回復期間後、発情徴候を見逃さず人工授精を施し、早い時期に妊娠させ、次の泌乳に備える必要がある。しかし高泌乳牛では発情徴候を見せずに排卵する「沈黙の排卵牛」が増えており、一年一産が破綻し酪農経営を圧迫している。本研究では、発情期を正確に判定する尿中発情期バイオマーカーを探索することを目的に、排卵に先立ち脳から血中に大量放出される黄体形成ホルモン(LH)に着目した。血中LHの増加の約3時間後に尿中LHも増加し、その後排卵することが確認できたので、尿中LH検出により排卵予知できることを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで牛の行動観察と、獣医師や授精師による卵巣触診を頼りに行ってきた牛の繁殖管理に、尿中ホルモンを検出するという生化学的視点を加えたことになる。またヒトでは排卵検査薬として、尿中LHを検出するキットが市販されているが、ヒト以外の哺乳動物で、尿中にLHが検出できるか調べた報告はほとんどなく、牛の排卵に先立つLHの血中動態と尿中動態を明らかにした学術的意義は大きい。さらに「沈黙の排卵牛」の人工授精適期を見つけ出す新技術を創出する可能性を示すことができたことは、畜産技術向上につながるため社会的意義も大きいと考える。

研究成果の概要(英文)： Dairy cows maintain lactation by producing calves every year. After two months of recovery period from parturition, cows must be artificially inseminated immediately by finding estrus behavior to prepare next lactation. However it has been difficult for the farmers to find estrus in high yielding cows who show "silent ovulation".

The luteinizing hormone (LH) surge plays a dominant role in ovulation in mammals. This study examined urinary LH concentrations after inducing abrupt rise in blood LH in six cows. Plasma and urinary LH peaked at 2 and 5 hours after the induction, respectively. A positive correlation was observed between plasma LH concentrations and urinary LH amounts. Ovulation was confirmed in the cows after 48 hr of GnRH administration. These data strongly suggest that urinary LH is derived from plasma LH, which triggers ovulation in cows.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：牛 発情 バイオマーカー 黄体形成ホルモン(LH) 尿

1. 研究開始当初の背景

乳牛は妊娠と出産を繰り返すことで牛乳の生産を継続できる。牛の妊娠期間は280日で、2カ月の子宮回復期間を含め、一年一産させることが理想である。近年の乳牛の品種改良や飼養管理の改善により分娩後の高泌乳期間が延長し、1頭当たりの牛乳生産量は著しく向上した。しかし、その一方で乗駕許容などの発情徴候を示さず排卵する無発情牛、いわゆる「沈黙の排卵」を示す高泌乳牛が増え(Anim.Reprod.Sci.2011:123;127-38)、発情がわからず人工授精できないため、一年一産の分娩計画が破綻し、酪農経営を圧迫している。

牛は周年繁殖動物で、不妊の場合は21日間隔で発情を繰り返す。この発情周期はホルモンに支配されている。視床下部の周期的な興奮が下垂体を介して卵胞を刺激すると、視床下部 下垂体系へのフィードバックにより卵胞が成熟し、それに伴いエストロジェンの分泌が増加する。そして発情徴候の出現と同時に、下垂体から黄体形成ホルモン(LH)の急激な一過性の放出(LHサージ)が起こり排卵する。これを踏まえ、人工授精の適期は、雌牛が他の牛の乗駕を許容する発情徴候を示す発情期で排卵の約12~30時間前とされている。ヒトではLHサージがおきると尿中にもLHが一過性に大量排泄されることが分かっており、女性の排卵を予知し妊娠しやすい時期を特定する尿中LH検査キットが既に市販されている。しかし牛においてLHサージで尿中LH排泄量も有意に上昇するか分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、発情期の雌牛の尿に特異的に排泄される尿中化合物を特定し、明確な発情徴候を示さない無発情牛でも正確に人工授精適期を特定できる尿中バイオマーカーを探索する。具体的には、まず排卵に先立ち血中に大量放出される黄体形成ホルモン(LH)が尿でも検出でき、発情期に有意に上昇するか調べ、尿中LH動態分析で排卵を予知できるか検証する。

3. 研究の方法

(1) 牛尿中LH定量法の確立

牛LH抗体を使い、ウェスタンブロッティングで牛LH標準物質が検出できるよう条件検討を行う。次に尿にLH標準物質を添加しても検出できることを確認したら、発情期の牛の尿を用いて、尿中LHが検出できるか検証する。発情期の尿でLHが検出できたら、検体のLH濃度を定量できるようにLH標準物質の濃度を変えて標準曲線を描いて、酵素結合免疫吸着法(ELISA)による測定系を確立する。

(2) 発情前後の牛尿中LH動態の解析

黒毛和種成雌牛6頭を用いて、ホルモン処置で発情周期を同期化し、性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤であるフェルチレリン(GnRH)を100 μ g筋肉内に投与し、投与後48時間まで血液と尿を採取する。また処置前とGnRH投与後48時間に卵巣の超音波画像を撮り、卵胞の発育状態や排卵の有無を確認する。ELISAを用いて血中および尿中LH濃度を測定し、GnRH投与後の経時的変化を観察する。なお尿中化合物は、尿量により影響を受ける為、尿中LH濃度はクレアチニンで除した値を求めて、血中LH濃度と比較する。

4. 研究成果

(1) 牛尿中 LH 定量法と予備試験結果

最初に牛 LH を検出するために、ウェスタンブロッティング (WB) に用いる一次抗体を選定した。ウシ尿のタンパク質濃度から尿の濃縮と、免疫沈降による効率的な LH 検出が必要であった。最終的に尿中ウシ LH 標準物質 1ng まで検出できる系を確立した。GnRH を投与して人為的に発情を起こした牛の発情前期 (2 日前)、発情期、無発情期 (14 日後) の尿を用いて、尿中 LH の検出を試みた。尿に牛 LH 標準物質を添加したものは検出できたが、尿のみからは LH を検出することはできなかった。ウシ尿中 LH が検出限界より低濃度の可能性を考え、血中 LH サージとの相関を見る必要性があり、次の試験を行った。同様に GnRH を投与した牛 2 頭を用い、1 時間おきに 4 時間まで採血と採尿を行った。採尿は導尿にて全量採取し、翌々に排卵を確認した。WB により血中 LH 濃度は、投与後 1 時間から 4 時間まで検出することができた (図 1)。しかし濃縮尿を免疫沈降により WB にて LH の検出を試みたが検出できなかった。そこでより多くの尿からタンパク質を分離するためにイオン交換クロマトグラフィーによる解析を行った。LH の等電点をアミノ酸配列から算出し、陽イオン交換を行った。血中 LH が 1 時間後から検出されたウシの 3 時間目の尿を用いた。まずは脱塩するために透析し、それから陽イオン交換カラムに通し、タンパク質が検出された分画を銀染色したところ、LH の分子量付近にバンドを検出したため、質量分析計にて解析したが該当バンドは LH ではなかった。そこで市販の牛の血中 LH 測定用の ELISA を用いて、尿中 LH の検出を試みたところ、血液に比較して約 100 分の 1 の LH が尿に検出された。また GnRH により LH が放出され、血液中 LH が一過性の上昇を見せ、その 1-2 時間後に尿中 LH 濃度が上昇したことから、ホルモン剤投与後 4 時間では、尿中 LH 動態を把握しきれていないことが明らかになった。

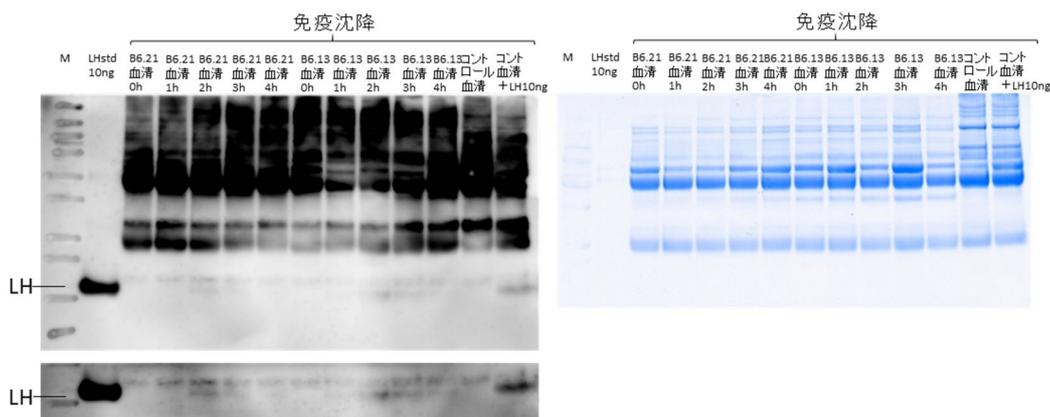


図1. GnRH投与牛の血清(フィブリン除去)1mLから免疫沈降後ウェスタンブロッティングにてLH検出

(2) 牛尿中 LH 動態の解析

6 頭の黒毛和種成雌牛を用いて、GnRH100 μ g を筋肉内に投与し、投与前、投与後 0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、24、48 時間に採血した。また投与前、投与後 1.5、3、4、5、6、7、8、24、48 時間に自然排尿させ、全量採取した。投与後 48 時間に排卵を確認した。ELISA にて血中 LH 濃度を測定したところ、GnRH 投与後 2 時間に最高値に達することが確認できた。また尿中 LH を ELISA にて検出することができ、GnRH 投与後 5 時間に最高値に達することを発見できた。詳細を図 2 に示す。

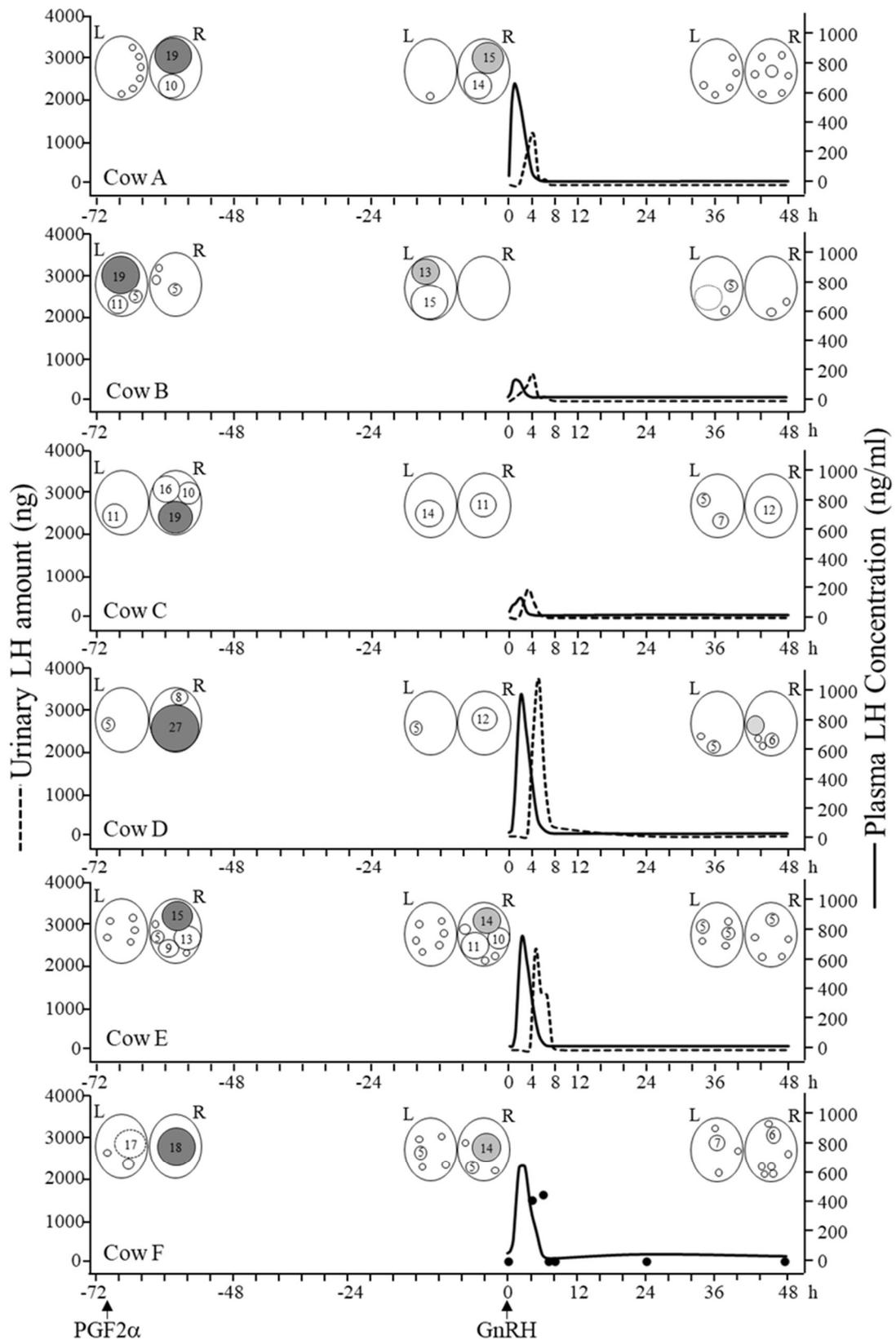


図2. GnRH投与牛6頭の卵巣所見と尿・血液のLH動態

GnRH投与によりLHが放出され、血中LHが一過性の上昇を見せ、その3時間後に尿中LHが上昇したことから、尿中LHは血中LH由来だと考えられた。またその値は個体により大きく異なることが分かった。血中および尿中動態の詳細を図3に示す。

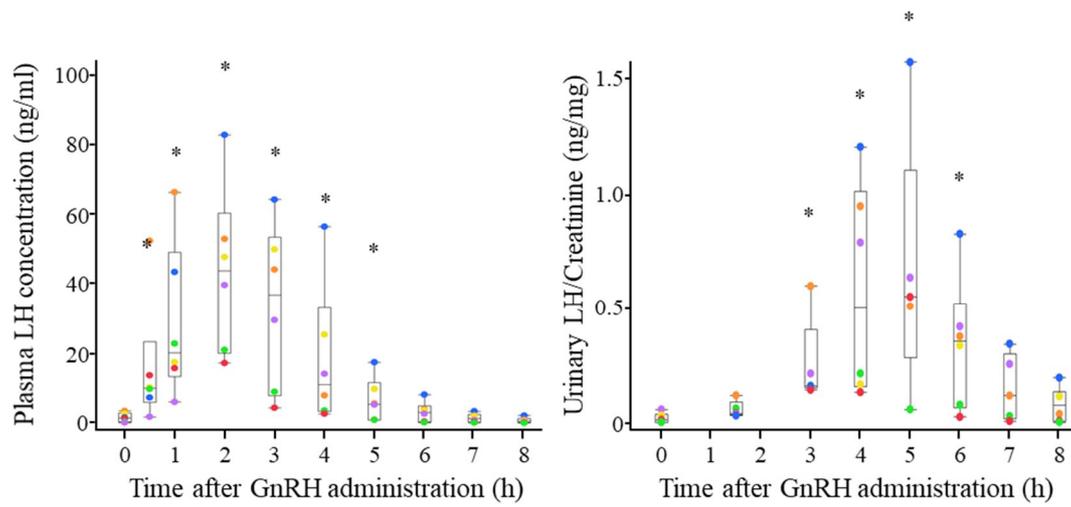


図3. GnRH投与牛の血中および尿中LH動態

本研究で初めて牛の尿中 LH を検出したことと、排卵に先立つ LH の一過性の上昇を尿で確認できたことから、尿 LH 検出により排卵を予知し牛の発情期を正確かつ容易に判定する技術開発の糸口が得られた。

引用文献

Walsh, S. W., Williams, E. J. and Evans, A. C. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*123: 127-138.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 MIYAZAKI Tamako, UENOYAMA Reiko, MATSUZAKI Takashi, YAMASHITA Tetsuro, HIRATA Toh-ichi, MIYAZAKI Masao	4. 巻 83
2. 論文標題 Detection of urinary luteinizing hormone in Japanese black cows after administration of gonadotropin-releasing hormone	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 431 ~ 434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.20-0506	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮崎珠子、上野山怜子、山下哲郎、平田統一、宮崎雅雄
2. 発表標題 ウシ尿中黄体形成ホルモンの検出
3. 学会等名 日本生化学会東北支部会第86回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎珠子、上野山怜子、平田統一
2. 発表標題 牛で尿検査による発情発見は可能か？
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------