

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05946

研究課題名(和文)牛第四胃変位発症に寄与する脂肪酸関連シグナルの解析と早期診断マーカーへの応用

研究課題名(英文) Analysis of fatty acid-related signals contributing to the pathogenesis of bovine abomasum displacement and their application to early diagnostic markers

研究代表者

田島 剛 (Tajima, Tsuyoshi)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号：60508878

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)：ホルスタイン牛において妊娠末期(分娩予定1週前)、分娩後0～8週に血液サンプルを採取して血中脂肪酸プロファイルを解析するとともに供試牛の第四胃聴打診を含む健康状態の観察を行い第四胃変位(DA)および同症の病態形成の基礎疾患と考えられているケトーシスの状況との相関を検討した。内因性TLR4リガンドとして働きうるラウリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸の血中濃度は健康牛・罹患牛間で変化はみられなかった。一方でケトーシス罹患牛では、TLR4シグナル抑制に関与する血中n-3脂肪酸(ドコサヘキサエン酸およびドコサペンタエン酸)のn-6脂肪酸比が分娩後1-2週で低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

第四胃平滑筋を用いたin vitro試験からTLR4シグナルの増強に関連する脂肪酸の分娩前後における血中動態について解析した。内因性TLR4リガンドとして働きうる推察されたラウリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸の血中濃度は健康牛・罹患牛ともに分娩前後で有意な変化はみられなかった。一方、n-3脂肪酸/アラキドン酸比が低下するとTLR4シグナル抑制機構の減弱に関与することから、DA発症に重要なTLRシグナル亢進の基盤として分娩直後にn-3脂肪酸が減少していることが寄与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Blood samples were obtained from Holstein cows one week before calving and at 0-8 weeks after calving. The samples were analyzed to assess the blood fatty acid profile. A health check of the cows was also conducted to explore the relationship between abomasal displacement (DA) and ketosis, a known underlying pathological process of DA. The study investigated the correlation between DA and ketosis, which is considered the underlying factor in the development of DA.

The blood fatty acids level, including lauric acid, palmitic acid, and myristic acid, which act as endogenous toll-like receptor 4 (TLR4) activators, did not show significant differences between healthy cows and ketosis cows. However, blood levels of n-3 fatty acids (docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid) ratio vs arachidonic acid, which have a role in suppressing TLR4 signalling, decreased in ketosis cows within 1-2 weeks after calving.

研究分野：獣医学

キーワード：牛 第四胃変位 n-3脂肪酸 n-3/AA比 TLR4シグナル

1. 研究開始当初の背景

分娩後の牛で好発する第四胃変位は発症後に乳量減少を伴うだけでなく死亡・廃用淘汰率も高いことから供用年数短縮の要因にもなっている。牛第四胃変位の病態解析では代謝プロファイリングを中心とした知見が得られているが、最も重要な要因である第四胃アトニーの発症メカニズムについて「実際には第四胃平滑筋に何がおきているのか」が不明なままであり、本症の制圧を難しくする原因となっている。申請者はこれまでに第四胃の平滑筋組織を用いた研究を通じ、中鎖脂肪酸の増加と $n-3$ 脂肪酸の減少が第四胃収縮を抑制して第四胃変位の発症のプロセスに大きく関わっていることを発見した。しかし、これらの変化が実際の第四胃変位牛の生体内でいつどのように発生しているのかは不明である。

2. 研究の目的

牛第四胃変位の病態解析では代謝プロファイリングを中心とした知見が得られているが、第四胃変位に最も重要な要因である第四胃アトニーの発症メカニズムについて「実際には第四胃平滑筋に何がおきているのか」が不明なままであり、本症の制圧を難しくする原因となっている。本研究では、供試牛の血中脂肪酸プロファイルを分娩前から分娩後 8 週まで継続的にモニタリングし、脂肪酸産生・代謝経路および脂肪酸/TLR4 シグナルの活性化がどのように変化するかを理解することをめざす。これまでの先行研究では、ある一時点における牛群の評価を行い、その結果から考察することが一般的な研究デザインとして用いられてきたが、本研究ではそれぞれの供試牛について分娩前から分娩後 8 週まで連続して解析を行なうことにより、より明瞭な成績が得られることが期待される。

3. 研究の方法

富士アニマルファームにて飼養されているホルスタイン種経産泌乳牛 ($n=48$ 、産次 3.4 ± 1.4) を用いた。分娩 1 週前から分娩後 8 週まで毎週、20G 採血針を接続した血清分離用真空採血管を用いて尾静脈より採血を行った。採取した血液は -30°C で保存し、その後の分析に用いた。

血中脂肪酸の測定はキャピラリーカラムを装着したガスクロマトグラフを用い、血清より Folch らの方法で抽出し BF3 メタノールでエステル化した試料を分離分析した。測定した脂肪酸は以下の通り。ラウリン酸 (12:0)、ミリスチン酸 (14:0)、ミリストレイン酸 (14:1)、5)、パルミチン酸 (16:0)、パルミトレイン酸 (16:1)、7)、ステアリン酸 (18:0)、オレイン酸 (18:1)、9)、リノール酸 (18:2)、6)、 $n-3$ リノレン酸 (18:3)、6)、アラキジン酸 (20:0)、エイコセン酸 (20:1)、9)、エイコサジエン酸 (20:2)、6)、5-8-11 エイコサトリエン酸 (20:3)、9)、ジホモ- $n-3$ リノレン酸 (20:3)、6)、アラキドン酸 (20:4)、6)、エイコサペンタエン酸 (20:5)、3)、ベヘニン酸 (22:0)、エルシン酸 (22:1)、9)、ドコサテトラエン酸 (22:4)、6)、ドコサペンタエン酸 (22:5)、3)、リグノセリン酸 (24:0)、ドコサヘキサエン酸 (24:6)、3)、ネルボン酸 (24:1)、9)。

また、第四胃変位発症の基礎疾患と考えられているケトosis 牛における血中脂肪酸解析のため、血中 D- β -ヒドロキシ酪酸 (BHB) が 1 mmol/L 以上を示した牛 (ケトosis 群、 $n=25$) で同様の実験を行った。

4. 研究成果

in vitro 試験で内因性 TLR4 リガンドとして働きうると推察されたラウリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸の血中濃度は正常群の分娩前後で有意な変化はみられず、また正常群-ケトosis 群間でも有意な差はみられなかった。一方ケトosis 群と正常群とで $n-3/n-6$ 脂肪酸比を比較すると、各脂肪酸の血中濃度は有意な変化が見られなかったが、分娩 1 週後でドコサヘキサエン酸/アラキドン酸、ドコサペンタエン酸/アラキドン酸比が低下していた。これは分娩 4 週後には改善し有意差がみられなくなった。

これらの結果から、 $n-3/n-6$ 脂肪酸比の低下により TLR4 シグナルが活性化しやすくなり、これが炎症性シグナル亢進の起点となってケトosis やアトニーをひきおこし、第四胃変位発症につながることを示唆された。

血中 $n-3$ 脂肪酸/ $n-6$ 脂肪酸比の減少は、泌乳開始に伴う給餌内容の変化だけでなく、分娩後の負のエネルギーバランスに起因して発生するものと考えられ、給餌の失敗やマイクロフローラの不適応などにより脂肪酸代謝が変化した結果としておこるものと考えられる。これまでの成績から第四胃局所では分娩後の急激な脂肪動員により TLR4 リガンドとなる中鎖脂肪酸が増加すると考えられており、血液由来の $n-3$ 脂肪酸の減少により TLR4 シグナルが加速され、NF- κ B を介

した免疫関連シグナルの亢進につながる可能性が考えられた。このメカニズムは今後の第四胃変位発症牛の成績を解析するための基礎的知見として重要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 TAJIMA Tsuyoshi, SAIGA Masumi, YAMAMOTO Haru, ELBADAWY Mohamed, ABUGOMAA Amira, MIURA Ryotaro, USUI Tatsuya, SASAKI Kazuaki, SHIMODA Minoru	4. 巻 85
2. 論文標題 Oral pharmacokinetics of sulfadiazine and sulfamonomethoxine in female Holstein milking cows	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 715 ~ 720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.23-0110	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miura Ryotaro, Inoue Takuma, Kunugi Yuka, Yasukawa Miya, Koyama Saku, Sato Rena, Matsumura Tomochika, Tajima Tsuyoshi, Yoshimura Itaru, Ajito Tadaharu	4. 巻 10
2. 論文標題 Prediction of the Spontaneous Estrus Expression Period Based on Large (?10 mm) Follicle Numbers in Lactating Holstein Dairy Cows	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Veterinary Sciences	6. 最初と最後の頁 231 ~ 231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vetsci10030231	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rena Sato, Saku Koyama, Miya Yasukawa, Takuma Inoue, Tomochika Matsumura, Asuka Kanazawa, Yukari Nozue, Yuriiko Wada, Itaru Yoshimura, Yujiro Hagita, Hisashi Mizutani, Tsuyoshi Tajima, Tadaharu Ajito, Ryotaro Miura	4. 巻 12
2. 論文標題 Evaluation of Prolonged Endometrial Inflammation Associated with the Periparturient Metabolic State in Dairy Cows	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 3401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ani12233401	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryotaro Miura, Yukari Nozue, Yujiro Hagita Tsuyoshi Tajima and Tadaharu Ajito
2. 発表標題 Associations between postpartum uterine luminal fluid volume and long-term reproductive performance in lactating Holstein dairy cows.
3. 学会等名 11th International Ruminant Reproduction Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三浦亮太郎、萩田祐二郎、田島剛、味戸忠春、濱野晴三、白砂孔明
2. 発表標題 黒毛和種リピートブリーダー牛における 繁殖開始時期の子宮内および糞便中の メタゲノム解析の特徴
3. 学会等名 日本畜産学会131回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三浦 亮太郎, 佐藤 玲奈, 小山 朔, 安川 美弥, 井上 拓馬, 松村 智周, 金澤 明日香, 野末 優花里, 和田 有里子, 吉村 格, 萩田 祐二郎, 水谷 尚, 田島 剛, 味戸 忠春
2. 発表標題 乳牛における子宮内膜の炎症収束時期と分娩前後の栄養代謝との関連
3. 学会等名 第115回 日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2022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
研究 分担者	三浦 亮太郎 (Miura Ryotaro) (60782133)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授 (32669)	
研究 分担者	金田 剛治 (Kaneda Takeharu) (10350175)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授 (32669)	

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
---------	---------