

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850209

研究課題名(和文) 抗ミュラー管ホルモンを用いた新しい繁殖管理技術の開発

研究課題名(英文) The development of novel reproductive management using anti-Mullerian hormone in Japanese Black cattle

研究代表者

北原 豪 (Kitahara, Go)

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号：90523415

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)：黒毛和種ウシにおける抗ミュラー管ホルモン(AMH)をバイオマーカーとした新しい繁殖管理技術の開発を行うべく、春機発動期および周産期における血液中のAMHの動態と、AMHと春機発動時期や分娩後の繁殖成績との関係性について検討した。

その結果、黒毛和種雌ウシの血中AMH濃度は、出生後10週にかけて上昇しその後低下すること、分娩後より妊娠期が高くなることが分かった。また、血中AMH濃度は、春機発動が早期にみられる牛で高く推移すること、分娩後の発情回復日数と相関性がみられたことから、繁殖機能のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to establish anti-Mullerian hormone (AMH) for biomarker in reproductive management in Japanese Black cattle. We investigated the changes of blood AMH concentrations from postnatal to puberty or during perinatal period, and the relationship between blood AMH concentration and the onset of puberty or the reproductive performance after parturition.

The results of this study suggested that the peak in the blood AMH concentration by puberty was showed around 10 weeks after birth. The blood AMH concentration in the third trimester was higher than in postpartum. The blood AMH concentration in the calves, which had the earlier onset of puberty, was higher than in the other calves. There was partly significant correlation between the blood AMH concentrations and the return to estrus. Blood AMH concentration may be useful biomarker in bovine reproductive function.

研究分野：獣医臨床繁殖学

キーワード：抗ミュラー管ホルモン(AMH) 黒毛和種ウシ 春機発動 周産期 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

家畜の生産において、繁殖効率の向上による非生産日数の短縮は、畜産業における安定的な経営に寄与する。繁殖効率には遺伝的要因、疾病、飼養管理など様々な要因が影響を及ぼしており、その改善には繁殖能力の高い個体の選抜、増産や科学的根拠に基づいた繁殖管理（診断、治療、評価など）が必要である。

バイオマーカーとは、血液や尿などの体液や組織中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。家畜においてバイオマーカーによる繁殖機能の評価を確立させ、活用した事例は少ない。バイオマーカーによって個々の家畜の繁殖機能を的確に評価することができれば、生時より備わっている個々の能力や非生産時の機能を的確に把握でき、優良家畜の選抜や適正な管理が可能となり、畜産経営の安定化が図られる。

抗ミュラー管ホルモン (AMH) は、形質転換増殖因子  $\beta$  ファミリーに属する糖タンパク質ホルモンで、雄はセルトリ細胞、雌は顆粒層細胞からのみ分泌される。AMH は前胞状卵胞や初期胞状卵胞で主に産生され、原始卵胞のリクルートメントと胞状卵胞以降のゴナドトロピン依存性の卵胞発育を抑制する作用を有し、二重に卵胞の枯渇を防ぐメカニズムが示されている。

AMH は卵巣における卵胞の発育や卵胞数を反映するホルモンで、ヒトの生殖医療において、卵胞刺激ホルモン (FSH) とともに卵巣機能の評価するホルモンとして用いられている。血中の FSH 濃度は卵胞の動員や成熟が低下すると高くなることが知られており、AMH 濃度は卵巣疾患や卵巣予備能（卵巣に残存する卵胞数）によって変化する。血液において、FSH 濃度は月経周期のステージで変動するが、AMH 濃度はほとんど変動がみられないため、バイオマーカーとして用いやすい。

家畜における AMH に関する報告は、国内ではほとんどみられない。また国外での報告は少なからずあるが、そのほとんどが過剰排卵処置の反応性の予測に関する報告である。最近、研究代表者らは、AMH が家畜の繁殖障害（顆粒膜細胞腫や潜在精巣）の評価に有用なバイオマーカーであることをはじめて報告した (Kitahara G. et al., *J Reprod Dev*, 58, 98-104 and 310-315, 2012)。個々の生時より備わっている繁殖能力や周産期の非生産時における繁殖機能を把握するバイオマーカー

として、新たな繁殖管理技術への展開を検討した報告は国内外でみられない。

## 2. 研究の目的

本課題は、AMH をバイオマーカーとした新しい繁殖管理技術の開発を行うべく、2つの試験を行った。

(1) 試験 1: 生時より備わっている繁殖能力を評価する技術の開発

出生時から春機発動時期における雌ウシの AMH の動態と繁殖性を調べた報告は、ほとんどない。唯一、Rota, A. ら (*Gen Comp Endocrinol*, 129, 39-44, 2002) が、5頭のホルスタイン種雌ウシを 12 カ月齢まで 1 カ月間隔で調査し、血中 AMH 濃度が 90 ng/ml 以下の低値だったと報告している。しかし、血中 AMH 濃度の当時の測定感度は低く、繁殖性との関係も明らかにされていない。

本試験では、雌ウシの出生後から春機発動時期までの AMH の動態を明らかにする。さらに、米内ら (*東北農業試験場報告* 86, 101-118, 1993) は、黒毛和種の初回発情時日齢が  $367.5 \pm 39.6$  (平均  $\pm$  標準偏差) 日、初回発情時体重が  $243.5 \pm 18.4$  kg と報告している。この報告における平均値と標準偏差を考慮し、本試験では、出生時からの血液採取に加え、300 日齢か体重が 200 kg 以上となった供試ウシについて、卵巣構造を超音波診断装置で解析するとともに血中プロゲステロン ( $P_4$ ) 濃度を測定することで春機発動時期を記録し、血中 AMH、FSH 濃度の動態と繁殖性との関係を明らかにする。

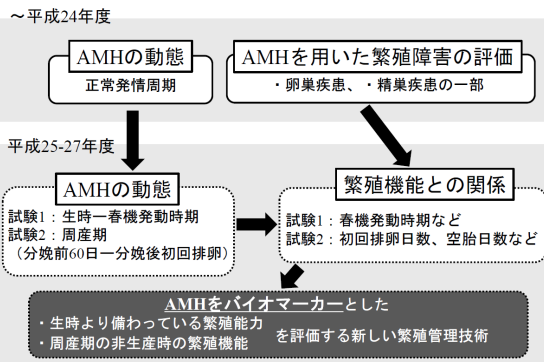
(2) 試験 2: 周産期における非生産時の繁殖機能を評価する技術の開発

分娩前の卵胞発育は抑制されている (Ginther OJ, et al., *J Reprod Fertil*, 108, 271-279, 1996)。分娩後 2 週間以内に血中 FSH 濃度が増加し、分娩後最初の卵胞発育と優性卵胞の選択が起こる。その約 80~100 日前から、これら卵胞は原始卵胞より既に発育を開始している (Britt JH, R Bras *Zootec, suple.*, 37, 110-115, 2008)。

AMH は前胞状卵胞や初期胞状卵胞の顆粒層細胞より合成、分泌され、原始卵胞の発育開始や胞状卵胞における FSH の感受性を制御している。よって、AMH は卵胞の発育におけるバイオマーカーの可能性があるが、

AMH と周産期における卵巢周期の再開との関係を明らかにした報告はない。分娩前後の卵胞発育の状況を適正に評価できれば、分娩後の発情回帰日数の短縮に寄与する。

本試験では、各個体の周産期における、血液中の AMH および IGF-1 の動態を明らかにするとともに、分娩後の卵巢周期の再開や子宮修復を超音波診断装置で観察し、AMH、IGF-1 のバイオマーカー候補とその後の繁殖成績の関係を明らかにする。



### 3. 研究の方法

#### (1) 試験 1

黒毛和種雌ウシ 11 頭を供し、出生後 6 日以内を W0 とし、W0 から 2 週間隔で採血および体重測定を行った。さらに 300 日齢か体重が 200 kg 以上(およそ W40)からは、初回排卵が観察されるまで、超音波検査による卵巢構造の解析を行った。

同一個体の出生から春機発動時期における血中 AMH、FSH、プロゲステロン (P<sub>4</sub>) 濃度を測定し、超音波検査および血中 P<sub>4</sub> 濃度から初回排卵時期を確定し、その予測性について AMH の指標としての有用性を検討した。

#### (2) 試験 2

授乳中の黒毛和種雌ウシ 20 頭(3~13 産、平均 6.8 産)を供し、分娩の-9 週 (-9w)、-4 週 (-4w)、-2 週 (-2w)、分娩後 6 日以内 (0w)、分娩後 2 週 (2w)、4 週 (4w) に採血、分娩後 1 週間隔で超音波検査を行い、発情回帰と子宮修復について観察した。同一個体の分娩前後の血中 AMH および血中インスリン様成長因子 (IGF) -1 濃度を測定した。

分娩後 40 日から 80 日の黒毛和種ウシ 32 頭を供し、ショートシンク (SS)法を行った。卵巢に機能的な黄体 (直径が 18 mm 以上)を確認し、プロスタグランジン F<sub>2</sub> としてクロプロステノール 500 μg を投与、56 時間後に GnRH として酢酸フェルチレリン 100 μg

を投与、16 時間後に定時人工授精 (AI) を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 試験 1

血中 AMH 濃度は、W0 の 0.22 ng/mL から W10 の 0.75 ng/mL と有意に上昇し (P < 0.01)、その後、低下した (図 1)。血中 FSH 濃度は、W0 の 0.36 ng/mL から W4 の 0.83 ng/mL にかけて有意に上昇し (P < 0.05)、その後春機発動がみられる (WP0) まで概ね 1.0 ng/mL 以上で推移した。以上より、血中 FSH 濃度に続き、血中 AMH 濃度が上昇することが分かった。血中 AMH 濃度について、出生後から春機発動までの相関性を検討した結果、春機発動後 4 週 (WP4) および 6 週 (WP6) と W16 の間に有意な正の相関性 (それぞれ r=0.69、0.71、P<0.05) がみられた。

W48 までに春機発動がみられたウシ (n=4、0.65ng/mL) は、みられなかったウシ (n=7、0.30ng/mL) に比べ有意に高かった (P<0.001)。

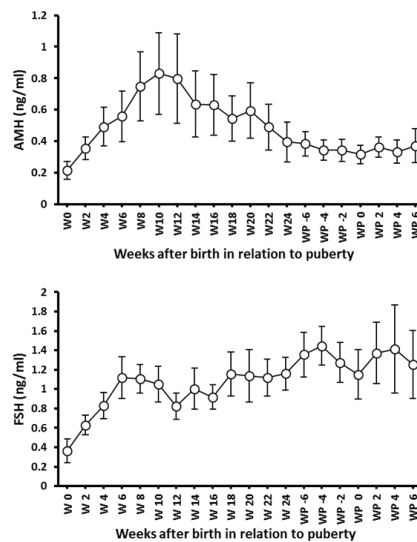


図 1 出生後から春機発動までの血中 AMH および FSH 濃度の動態 (n=11、平均 ± SE) W0:出生した週、WP0:春機発動がみられた週

#### (2) 試験 2

血中 AMH 濃度は、-9w の 0.13 ng/ml と -4w の 0.10 ng/ml が -2w から 4w (0.07~0.08 ng/ml) よりも、血中 IGF-1 濃度は、-2w と 0w (それぞれ 116.1、100.5 ng/ml) が 2w と 4w (それぞれ 56.9、55.2 ng/ml) よりも有意に高かった。血中 AMH 濃度は各週のすべての間で有意な相関 (r = 0.49~0.86) がみられ、血中 IGF-1 濃度は一部に有意な相関 (r = 0.46~0.76) がみられた。各週の血中 AMH および IGF-1 濃

度と発情回帰、初回 AI 日数、受胎までの AI 回数、空胎日数との相関は、血中 IGF-1 濃度では 0w の初回 AI 日数 ( $r = -0.39$ )、4w の空胎日数 ( $r = -0.44$ )、血中 AMH 濃度では 4w の発情回帰日数 ( $r = 0.48$ ) に有意な相関がみられた。

SS 法を行ったウシ ( $n = 32$ ) に SS 法において、血中 AMH 濃度は、受胎したウシ ( $n=20$ 、 $0.18 \text{ ng/mL}$ ) と不受胎のウシ ( $n=12$ 、 $0.17 \text{ ng/mL}$ ) の間に有意な差はみられなかった。

図 2 分娩前後の血中 AMH および IGF-1 濃度の動態 ( $n = 20$ 、平均  $\pm$  SE)

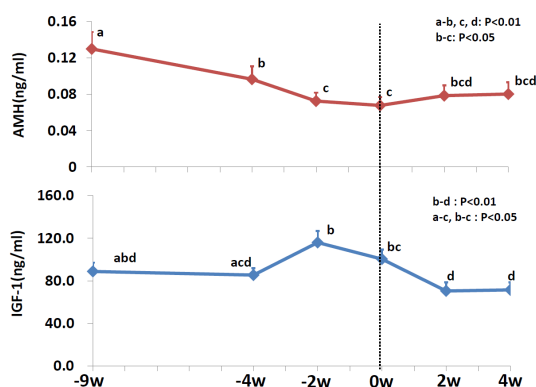


表 1 血中 AMH および IGF-1 濃度と繁殖成績との相関性 ( $n = 20$ 、\* $P < 0.05$ )

	-9w	-4w	-2w	0w	2w	4w	
AMH	出生子牛体重	0.32	-0.04	0.05	-0.13	0.04	0.13
	発情回帰日数	0.00	-0.14	-0.19	-0.14	0.26	0.48*
	初回AI日数	0.24	0.14	0.35	0.15	0.22	0.37
	空胎日数	0.13	-0.02	0.07	0.13	0.05	0.24
IGF-1	出生子牛体重	0.11	0.36	0.33	0.20	0.23	-0.01
	発情回帰日数	0.12	-0.15	0.31	-0.09	-0.17	-0.23
	初回AI日数	0.24	0.33	0.12	0.39*	-0.04	0.00
	空胎日数	-0.21	-0.08	0.18	-0.11	-0.22	-0.44*

### (3) まとめ

黒毛和種ウシにおける出生後および周産期の AMH の動態

黒毛和種雌子ウシにおいて、血中 FSH 濃度が出生後 4 週にかけての上昇に続き、血中 AMH 濃度は出生後 10 週にかけて上昇し、その後低下することが分かった。また黒毛和種雌ウシの周産期では、妊娠期の血中 AMH 濃度が分娩後より高くなること分かった。

黒毛和種ウシにおける繁殖機能のバイオマーカー

黒毛和種ウシにおいて、血中 AMH 濃度は、幼若期における春機発動および分娩後の繁殖成績のバイオマーカーとなる可能性が示

唆された。今後は、規模を拡大し調査を行うとともに、結果に影響を与える要因を多角的に解析することで、普遍的なバイオマーカーとして確立し、産業動物の生産現場への活用と生産性の向上への寄与に向けた研究を推進していく。

## 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3件)

北原 豪、抗ミュラー管ホルモン

(AMH) の産業動物臨床への応用、MP アグロジャーナル、査読無、2016、24、14-17

El-Sheikh Ali, H., Kitahara, G., Torisu, S., Nibe, K., Kaneko, Y., Hidaka, Y., Osawa, T. Evidence of spontaneous recovery of granulosa-theca cell tumor in a heifer: A retrospective report, *Reprod. Dom. Anim.*, 査読有, 2015, 50, 696-703

北原 豪、抗ミュラー管ホルモン

(AMH) - 牛の繁殖分野での臨床バイオマーカー -、牛臨床寄生虫研究会誌、査読無、2014、4、29-33

[学会発表](計5件)

北原 豪 . 牛の繁殖分野における獣医療のこれから、平成 27 年度鹿児島県家畜共済獣医師研修会、2015 年 7 月 31 日、鹿児島県農業共済組合連合会 (鹿児島市)

北原 豪、岩村智美、日高勇一、一色大志、宮田逸郎、大澤健司 . 黒毛和種牛の雄性仮性半陰陽 1 例における内分泌学的検討 . 平成 26 年度九州地区日本産業動物獣医学会、2014 年 10 月 4 日、かごしま県民交流センター (鹿児島市) : 九州地区学会賞 平成 26 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会、2014 年 2 月 13-15 日、岡山コンベンションセンター (岡山市)

El-Sheikh Ali, H., Kitahara, G., Nibe, K., Yamaguchi, R., Osawa, T. Anti-Müllerian hormone as a unique diagnostic biomarker for ovarian sex cord-stromal tumors in cattle. The 107th SRD Meeting, 2014. 8. 21, Obihiro(Japan)

北原 豪 . 抗ミュラー管ホルモン 牛の繁殖分野での臨床バイオマーカー(招

待講演) . 第 1 回九州沖縄産業動物臨床  
研究会研究集会、 2013 年 10 月 6 日、  
ANA ホリデイインリゾート宮崎 (宮崎  
市)

北原 豪、鎌田 立、邊見広一郎、小林  
郁雄、大澤健司 . 黒毛和種雌ウシにおけ  
る繁殖性バイオマーカーとしての血中  
抗ミューラー管ホルモンとインスリン  
様成長因子 1 の有用性の検討 . 第 106 回  
日本繁殖生物学会大会、2013 年 9 月 14  
日、東京農工大学 (府中市)

〔図書〕(計 1 件)

北原 豪 (分担) 2.6 性の役割と性分化 : 講  
談社、畜産ハンドブック、扇元敬司、他/編、  
2014、68-73

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/rinpan/rinpan%20home.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

北原 豪 (KITAHARA GO)

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号 : 90523415