

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450423

研究課題名(和文) 摂食・代謝・繁殖の相互作用解析に基づく繁殖性向上に直結する飼養技術開発

研究課題名(英文) Development of feeding technology to improve reproductive function based on the analysis of interaction among feeding, metabolism and breeding

研究代表者

田中 知己 (TANAKA, Tomomi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20272643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：この研究は摂食と栄養学的観点から牛の繁殖性の向上に直結する飼養管理技術について検討した。乳牛の摂食や栄養状態が繁殖機能に及ぼす影響を調べ、泌乳の有無自体は卵巣機能に対して負の影響を及ぼさないことを明らかとした。また、我々が考案した間欠的な高栄養給餌処置を施すことにより卵巣で発育する卵胞数が増加する傾向が認められた。さらに乳牛の分娩後における栄養状態と関連する子宮内細菌汚染の消失の程度を感度よく検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：This study analyzed feeding management technology directly linked to the fertility of cattle from the viewpoint of feeding and nutrition. We investigated the influence of feeding and nutritional status of dairy cattle on reproductive function and found that lactation itself does not have a negative influence on ovarian function. In addition, the number of follicles growing in the ovaries tended to increase with intermittent high nutritional feeding treatments we devised. Furthermore, we successfully detected the nutritional status of calves after delivery and the extent of disappearance of intrauterine bacterial contamination with high sensitivity.

研究分野：獣医臨床繁殖学

キーワード：栄養 繁殖 卵巣 インスリン 過剰排卵処置 子宮 臨床細菌学的検査 牛

1. 研究開始当初の背景

栄養条件は動物の生殖ステージの様々な相において繁殖機能を調節し、家畜の生産性に影響を及ぼす。特に、近年の乳牛における繁殖率を低下させる主な原因として、泌乳量の増加に伴う分娩後のエネルギーバランスの低下が推測されており、栄養管理の重要性が強く指摘されている。しかしながら、先進国における乳牛の繁殖率低下傾向に改善の兆しは見られない。我が国の乳用牛において平成3年から23年までの20年間の間に分娩間隔は30日延びており(乳用牛群検定全国協議会)、その経済的損失は大きい。

この問題に対処するため、国内外において様々な研究が行われているが、その多くは、数種類の性ホルモン剤やサプリメント剤を繰り返し投与することで繁殖率の向上を達成しようとするものである。しかし一方で、生産者は食品の安全に対する消費者のニーズを考慮し、生産過程での薬品や添加物の使用を可能な限り制限し、家畜の健康を適切な飼養管理によって維持する、安全で安定的な畜産物の生産を求められている。したがって、栄養管理の技術向上により家畜の繁殖率を高めることは社会の要請に沿う最も有効な手段の一つと考えられるが、現在まで繁殖率向上に直結する学術的基盤に立った栄養管理技術の確立は極めて不十分な状況にある。

研究代表者はこれまで独自性の高い研究手法をヤギおよびヒツジにおいて確立し、栄養が繁殖機能を制御する過程において、血中グルコースおよびインスリン濃度の変化が生殖内分泌系を調節することを示した(Tanaka et al. 2000, 2004, Haruna et al. 2009)。すなわち、栄養条件によって変化する代謝因子が視床下部・下垂体ホルモン分泌を介して生殖系を制御しているというものである。研究代表者はこの生理機構を応用して、ヤギをモデルとし、グルコースとインスリン濃度を上昇させる短期間の間欠的高栄養給餌処置が、発育卵胞数および排卵数を増加させることを実証している(Zabuli et al. 2010)。これらの研究成果が示すように、栄養条件に伴う生理的变化が代謝性因子や生殖内分泌系を調節し、家畜の繁殖率に影響を及ぼすことは明らかである。

一方、牛においては連携研究者である遠藤が、泌乳牛における給餌前後の黄体ホルモン分泌の変化を後大静脈カテーテル法というユニークな研究手法を用いて解析し、泌乳牛では採食直後に卵巢黄体からのプロジェステロン(妊娠成立のために必須のホルモン)が増加し(Endo et al. 2013)、末梢血中プロジェステロン濃度が減少することを実証した。このような栄養摂取直後に生じる生殖内分泌系の反応は制限給餌をしたヤギにおける給餌後の反応でも観察されており(Tanaka et al. 2002, 赤星ら未発表)、栄養による繁殖機能調節においては単に栄養

の過不足のみが重要ではなく、摂食行動に関係した比較的短時間に生じる生理的变化が繁殖機能を調節する系も存在していることを強く示唆している。したがって、栄養状態が劇的に変化し、摂食量が急激に変化する乳牛の分娩後の状態を考慮すれば、その機構の詳細を明らかにし、その生理作用を技術応用することで、繁殖機能の向上につながる新たな飼養技術を確立することが可能であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では乳牛を用い、摂食・代謝・繁殖の相互作用の機序を明らかにし、摂食後の繁殖機能の反応は動物の栄養状態、泌乳の有無および泌乳ステージにより異なるという仮説を検証する。さらに、これまでの我々の研究成果および本検証結果に基づく高い有効性が期待される給餌法を提唱し、摂食後の短期間に生じる繁殖機能の反応を制御する新たな栄養管理技術を確立することを目指す。加えて、栄養状態が大きく変化する分娩後のステージにおいて卵巢機能に加えて卵管および子宮機能を評価する。

3. 研究の方法

(1) 発情周期における泌乳牛と未経産牛の卵巢機能状態の比較

飼料給与前後の泌乳牛における黄体機能と代謝系変化との関連を調べる。具体的には非泌乳牛(未経産牛)と比較することで泌乳牛における特殊性を明らかにする。

(2) 牛における間欠的高栄養給餌処置が代謝系および繁殖機能に及ぼす影響

ヤギにおいて明らかになった成果および泌乳牛の摂食後における代謝・繁殖系の反応に基づき、分娩後の卵巢機能を刺激して受胎性を向上させる給餌法を検証する。具体的には、発情周期における間欠的な高栄養給餌処置が卵巢機能におよぼす影響を調べる。

(3) 牛の分娩後における卵管および子宮機能の評価

乳牛において栄養状態が大きく変化する分娩後のステージにおいて、卵巢機能に加えて卵管および子宮機能について臨床繁殖学的に評価する。具体的には、牛の卵管超音波造影法を確立し、分娩後の子宮の状態を臨床細菌学的に調査する。

4. 研究成果

(1) 発情周期における泌乳牛と未経産牛の卵巢機能状態の比較

未経産と泌乳牛を供試し、発情周期中の卵胞発育および黄体形成と血漿中ホルモン濃度の推移について比較検討を行った。排卵日をDay 0としDay 0~Day 16までは隔日でDay 17以降次回排卵までは連日で、超音波画像検査と採血を行った。また次回排卵時に発情を観

察し、人工授精 (AI) を行った。超音波画像検査では直径 6mm 以上の卵胞および黄体を観察し、AI 後の Day6 において、給餌前後に 2 時間間隔で採血を行った。採血は頸静脈より行い、血漿中プロゲステロン (P_4) およびエストラジオール 17 (E_2) 濃度を EIA 法を用いて測定した。最大黄体直径および Day0 から黄体が対抗するまでの期間の黄体直径は、泌乳牛で未経産に比べ有意に大きくなった。また、同様の期間において P_4 濃度は泌乳牛で高かったが、その最大濃度に有意な差は認められなかった。また、第一卵胞波後半の Day 8 以降の期間の第一卵胞波主席卵胞直径および排卵卵胞最大直径も泌乳牛で有意に大きくなった。発情期における E_2 の最大濃度に両群間で有意な差は認められなかった。AI 後 Day6 において、給餌前後および泌乳牛と未経産の間で P_4 、 E_2 濃度ともに有意差は認められなかった。また、Day12 および Day18 において、卵巣内構造物と P_4 および E_2 濃度には、泌乳牛と未経産牛間および受胎周期と不受胎周期の両比較において、ほとんどの解析項目において有意な差は認められなかった。以上の結果より、発情周期における卵巣内構造物や血中ステロイドホルモンについて、泌乳牛で未経産牛と比較して、黄体、第一卵胞波主席卵胞、排卵卵胞直径が大きく P_4 濃度が高い、給餌前後でステロイドホルモン濃度に給餌の影響が認められないという結果が得られた。また、黄体初期において給餌による血中ステロイドホルモン濃度への影響は観察されず、今回実施した飼養条件であれば、卵巣機能に対する泌乳による負の影響は生じにくいと考えられた。

(2) 牛における間欠的高栄養給餌処置が代謝系および繁殖機能に及ぼす影響

ヤギを用いたこれまでの研究において、短期間の高栄養給餌処置が排卵数を増加させることを明らかにしている。今回同様の方法を牛に適用し、代謝系および卵巣活動に及ぼす影響を検討した。発情周期を回帰する非泌乳牛を用い、まず通常飼育下 (乾草 3.5kg と濃厚飼料 1.5kg を 8:00 と 17:00 に給餌) において採材を行い (対照周期 (n=4))、その後の発情周期に高栄養給餌処置 (処置周期 n=5) を実施した。処置周期では排卵後 12~15 日および 18~21 日において通常の飼料に加えアルファルファヘイキューブ 6.0kg を追加給餌した。排卵後 0, 6, 10 および 12 日~排卵日までは連日 16:00 に採血し、血漿中インスリンおよびグルコース濃度を測定した。また、排卵後 12 日の 7:00~14:00 に 15 分毎の頻回採血を行い、高栄養給餌直後の影響を調べた。排卵後、適宜、超音波画像検査により卵巣の状態を調べた。その結果、処置周期のインスリン濃度は対照周期に比べて有意に上昇した。一方、グルコース濃度に有意な変化は認められなかった。処置周期において 2 排卵が 2 例観察され、1 例は発情周期中に出現した 2

回の卵胞波のうち、第 2 卵胞波で出現した 2 つの卵胞が排卵し、もう 1 例は 3 回の卵胞波のうち、第 2 卵胞波と第 3 卵胞波で出現した卵胞がそれぞれ 1 つずつ排卵した。直径 2~5mm 未満の卵胞数、5~10mm 未満の卵胞数、黄体断面積の推移に両群間で有意な差はなかった。牛において、本実験で適用した間欠的高栄養給餌処置は二峰性のインスリン分泌増加を引き起こすことが明らかとなった。一方、卵胞発育や黄体形成に有意な刺激効果は観察されなかったものの、2 排卵する例が増加する傾向が認められた。

(3) 牛の分娩後における卵管および子宮機能の評価

栄養状態と繁殖機能との関連について卵巣機能に加えて卵管および子宮機能について解析を行った。まず、牛において超音波子宮卵管造影を行い、卵管疎通検査法としての有用性を検討した。排卵後 10 日前後の黄体期の乳用牛 5 頭を供試し、うち 4 頭は検査による卵管への影響の有無を確認するために次回発情周期の黄体期に再度検査を行った。超音波造影剤は注射用ペルフルプタン (ソナゾイド® 注射用 16 μ L、第一三共) 1 バイアルを生理食塩液で 60 mL あるいは 100 mL に希釈した溶液を用いた。片側子宮角に消毒したバルーンカテーテル (16Fr) を挿入し、先端が子宮角分岐部から約 5 cm 頭側に至った位置でバルーンを膨らませた。超音波プローブを直腸に挿入後、調製した造影剤溶液の半量を子宮角腔内に注入し、造影検査を開始した。検査は超音波画像診断装置の B モードを用いて行い、子宮角、卵管峡部、卵管膨大部ならびに卵管漏斗が造影される様子を注入後 20 分まで観察した。18 例中 12 例を卵管疎通性ありと評価した。注入された造影剤は速やかに卵管峡部、卵管膨大部および卵管漏斗に達し、卵管漏斗は卵巣に近接した扇状の高エコー構造物として観察された。卵管漏斗は短い例では注入後 1 分まで、長い例では注入後 19 分まで観察された (中央値 \pm 四分位偏差: 6.5 \pm 3.3 分)。子宮腔内に注入された造影剤が卵管を通過し、漏斗部へ流入する像が観察されたことから、本法は牛の卵管疎通性を評価するための有用な検査法と考えられた。

次に、牛において子宮灌流法により採材された回収液の遠心濃縮後のサンプルについて細菌培養を行い、子宮内細菌学的検査法としての有用性を検討した。分娩牛および対照牛についてそれぞれ妊角側および任意の子宮角にバルーンカテーテルにて生理食塩液 50 ml を 1 回注入し灌流液を回収した。回収液のうち 1 ml を 15,000 rpm、10 分間遠心し沈渣を 100 μ l の生理食塩液に浮遊させ 10 倍濃縮液とした。濃縮液、原液、および 10 倍希釈した検体を 100 μ l ずつ羊血液寒天培地に接種後、好気培養を行った。検体を接種した複数枚の培地のうち、1 枚以上において肉眼的に 1 または 2 種類の細菌が 11 コロニ

ー以上発育したものを細菌感染が疑われると評価し、特定の細菌の増殖と定義した。特定の細菌の増殖は、分娩牛および対照牛においてそれぞれ9例中5例、10例中2例で認められた。分娩牛および対照牛において、灌流液中の細菌数 (Colony forming unit, CFU) および原液から発育したコロニー数 (平均値) の範囲はそれぞれ $3.0 \sim 5.1 \times 10^3$ /ml および $0 \sim 391.5$, $2.5 \times 10^{-1} \sim 2.4 \times 10^2$ /ml および $0 \sim 7$ となり、分娩牛の細菌数は対照牛に比べ有意に多かった。再検査を行った7例について、6例では濃縮液における細菌数の減少が見られたが、1例では濃縮液中の細菌数の増加と特定の細菌の増殖が確認された。再検査も含めた全26例について、特定の細菌の増殖は濃縮液および原液の培養結果のそれぞれ8例および2例において認められ濃縮液で有意に多かった。以上より、子宮灌流液を遠心濃縮することで子宮内に存在する細菌の検出感度が向上する可能性が示唆され、臨床細菌学的観点から栄養状態が負のエネルギー状態である分娩後3週の牛における子宮修復は不十分であると考えられた。

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)

[学会発表](計7件)

田中知己「動物の発情発現機構」平成28年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会、2017年2月25日、石川県立音楽堂(石川県・金沢市)

古沢みのり、遠藤なつ美、田中知己「牛における子宮内部の臨床細菌学的検査法の検討」第109回日本繁殖生物学会、2016年9月14日、麻布大学(神奈川県・相模原市)

黒木玲実、遠藤なつ美、田中知己「同一農場で飼育されるブラウンスイス種及びホルスタイン種乳牛の栄養状態・繁殖性の比較」第109回日本繁殖生物学会、2016年9月12日、麻布大学(神奈川県・相模原市)

K. Itoh, N. Endo, S. Kataoka, T. Tanaka
「Assessment of tubal patency by hysterosalpingo-contrast sonography in cow」2016 ASAS-ADSA-CSAS-WSASAS Joint Annual Meeting、2016年7月21日、Salt Lake City (Utah, USA)

田中知己、遠藤なつ美「反芻家畜における栄養による繁殖機能調節」第18回日麻布大学生殖・発生工学セミナー、2016年3月13日、麻布大学(神奈川県・相模原市)

水澤毅士, Larasati Puji Rahayu, 遠藤なつ美、田中知己「牛の発情周期における高栄養給餌処置が代謝系および繁殖機能に及ぼす影響」第108回日本繁殖生物学会、2015年9月17日、宮崎大学(宮崎県・宮崎市)

松田千絵、遠藤なつ美、田中知己「発情周期における泌乳牛と未経産牛の卵巣機能の

比較」第157回日本獣医学会、2014年9月9日、北海道大学(北海道・札幌市)

[図書](計1件)

田中知己、堀達也、河上栄一 他、朝倉書店、動物臨床繁殖学、2014年373(309-329)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 知己 (TANAKA, Tomomi)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 20272643

(2) 連携研究者

遠藤 なつ美 (ENDO, Natsumi)

東京農工大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号: 40726684