

乳用経産牛における活性酸素代謝産物（d-ROMs 濃度）および 血中プロゲステロン（P4）濃度が胚移植の受胎率に及ぼす影響

小林崇之 1)・笹木教隆

1) 現 福井県家畜保健保健衛生所

要 約 乳用経産牛における活性酸素代謝産物（d-ROMs）濃度および血漿中プロゲステロン（P4）濃度が、胚移植の受胎率に及ぼす影響について検討した。その結果、P4 濃度が 2ng/ml 以下または 8ng/ml 以上で受胎率が低くなる傾向にあった。また d-ROMs 濃度が 100U.CARR 以下で受胎率が高い傾向にあった。これらのことから ET の受胎率改善には、P4 濃度を 2ng/ml 以上にすることと d-ROMs 濃度を低減させることが重要であると考えられた。抗酸化物質投与による受胎率への効果を検討したところ抗酸化物質とホルモン剤を併用した区の受胎率が高い傾向にあった。また抗酸化物質投与によって ET 当日の d-ROMs 濃度が 100U.CARR 以下に低減できた牛の受胎率は 54.4% と高い傾向にあった。

キーワード：乳用経産牛、胚移植、受胎率、活性酸素代謝産物、プロゲステロン濃度

緒 言

近年、活性酸素に起因する酸化ストレスの存在が、乳用牛の繁殖成績に影響を与えているとして注目されている。暑熱下などの酸化ストレスの高い環境下では、黄体機能が損なわれるため胎児の成長や着床が阻害され不受胎となる可能性が高くなること（阪谷ら、2103）や高温時のストレスによる細胞内活性酸素の増加が、初期胚の発生を低下させること（高橋ら、2007）などが報告されている。そのため酸化ストレスの低減が、繁殖成績改善に重要であると考えられている。

前報（小林ら、2015）では、乳用牛における酸化ストレス指標の 1 つである活性酸素代謝産物（d-ROMs）濃度およびプロゲステロン（P4）濃度と人工授精（AI）の受胎率との関係を分析した。その結果、d-ROMs 濃度が 100U.CARR 以下で推移している牛では、P4 濃度が周期的に変化しており、100U.CARR 以上の牛では P4 濃度の起伏が小さく低く推移していたことや、平均 d-ROMs 濃度が低い農家では高い農家に比べ受

胎率が高かったこと、AI 後 5 日目の P4 濃度が 2.5ng/ml 以上で受胎率が高く、2.5ng/ml 以下で低い傾向にあった。しかし P4 濃度が 2.5ng/ml 以下であってもプロゲステロン製剤を投与することで受胎率が改善する傾向にあったことから、AI の受胎率改善には、P4 濃度の向上および d-ROMs 濃度の低減が重要であると報告した。

今年度は、乳用牛の胚移植（ET）における d-ROMs 濃度、P4 濃度および受胎率との関係について分析したので報告する。

材料および方法

試験 1. ET における d-ROMs 濃度、P4 濃度、受胎率との関係を調査

平成 26 年 8 月～平成 27 年 3 月の期間に、農家より出血確認後以来のあった牛および同期化処理にて発情誘起した乳用経産牛 34 頭を用いた。全頭に対し発情日を 0 日（D0）とし発情後 5 日目（D5）に直腸検査を実施し、黄体形成不全と診断した牛 27 頭にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hcG）3000 単位（ゲストロン、共立製

薬)を筋肉内に投与した。発情後7日目(D7)に直腸検査を実施し黄体が良好と確認できた牛にのみETを実施した。採血は尾静脈より真空採血管を用いD7におこなった。採取された血液は、氷水で冷蔵保存後、遠心分離(3000ppm、15分、5℃)を行い、-80℃で冷凍保存した。その後分析時に融解後、d-ROMs濃度はヒドロペルオキシドの量を呈色液クロモゲンと反応させ吸光度を測定(フリーラジカル解析装置, FREE, Wismerll, 東京)し、P4濃度を酵素免疫測定法(自動免疫蛍光測定装置, mini VIDAS, シスメックス・バイオメリュー, 東京)により測定した。

試験2. 乳用牛への抗酸化物質の効果を検討

管内酪農家の乳用経産牛8頭を用いた。8頭を無作為に2区に区分し注射による効果と給餌による効果を調査した。

まず注射による効果を検討するため、供試牛4頭に対しビタミンE+セレン(ESE 共立製薬)3mlを1回投与し、0日目、2日目、4日目、10日目と採血を実施した。次に給餌による効果を検討するため、供試牛4頭に対しグリセリン製剤(GLY 花王)300g/日を30日間投与し、0日目、7日目、10日目、14日目、16日目、28日目と採血を実施した。採取した血液は、氷水で冷蔵保存後、遠心分離(3000ppm、15分、5℃)を行い、-80℃で冷凍保存した。その後分析時に融解後、d-ROMs濃度はヒドロペルオキシドの量を呈色液クロモゲンと反応させ吸光度を測定(フリーラジカル解析装置, FREE, Wismerll, 東京)し、投与前と投与後の濃度の変化について分析した。

試験3. ETにおける抗酸化物質投与による受胎率への影響を調査

平成27年3月~平成28年11月の期間で、不受胎と診断された管内酪農家の乳用牛35頭を用いた。全頭に、発情周期の任意の時期に、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)(コンセラルール)を100μg投与し、膈内留置型プロゲステロン製剤(CIDR, 家畜改良事業団, 東京)を挿入した。CIDR挿入後7日目にプロスタグランジンF2α(PG)(ダルマジン, 共立製薬, 東京)を2.5ml投与するとともにCIDRを抜去した。PG投与後48時間後にGnRHを200μg

投与し、排卵誘起を行った。GnRHを投与した日を発情日(Day0)としてDay7に移植を実施した。Day5にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hcG)3000単位投与した区をhcG区(10頭)とし、CIDRを挿入した日からGLY300g/日を30日間投与した区をGLY区(4頭)とした。CIDRを挿入した日からGLY300g/日を30日間投与し、Day5にhcG3000単位投与した区をGLY+hcG区(9頭)、Day5にESE3mlとhcG3000単位を投与した区をESE+hcG区(9頭)とし、Day35で妊娠鑑定を行った。妊娠鑑定は、超音波診断装置(トリンガV, MTF社製、大阪)を用い胎児、心拍の確認をもって妊娠(+)と診断した。P4濃度、d-ROMs濃度は試験1と同様の方法で測定した。各区の受胎率、P4濃度、d-ROMs濃度の推移を測定し比較検討した。

結 果

試験1

ET当日のP4濃度と受胎率との関係を表したグラフを図1に示した。P4濃度が2ng/ml以下の牛の受胎率は0.0%(0/1頭)、2~4ng/mlの受胎率は66.7%(4/6頭)、4~8ng/mlの受胎率は45.5%(5/11頭)、8ng/ml以上の受胎率は25.0%(4/16頭)と2ng/ml以下および8ng/ml以上の受胎率が低い傾向にあった。

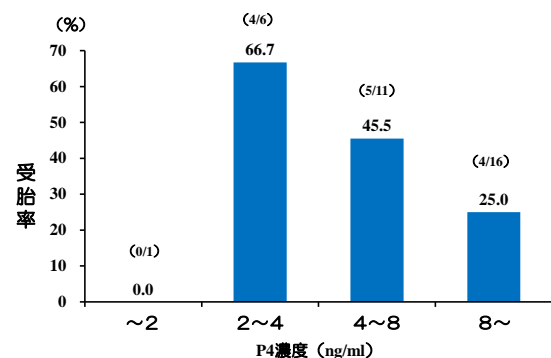


図1 ET当日のP4濃度と受胎との関係

ET当日のd-ROMs濃度と受胎率の関係を表したグラフを図2に示した。d-ROMs濃度が80U.CARR以下の受胎率は57.1%(4/7頭)、80~100U.CARRの受胎率は36.4%(4/1頭)、100~120U.CARRの受胎率は37.5%(3/8頭)、120U.CARR以上の受胎率は25.0%(2/8頭)であった。また100U.CARR以下の受胎率は44.4%

(8/18 頭)、100U.CARR 以上の受胎率は 31.3% (5/16 頭) と 100U.CARR 以下で受胎率が高い傾向にあった。

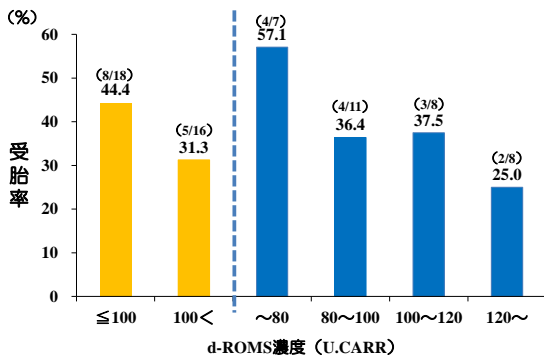


図2 ET当日のd-ROMs濃度と受胎との関係

試験 2

乳用牛への抗酸化物質投与による d-ROMs 濃度の推移を図 3 に示した。ESE 投与、GLY 投与とともに緩やかに d-ROMs 濃度が低減することが判明した。

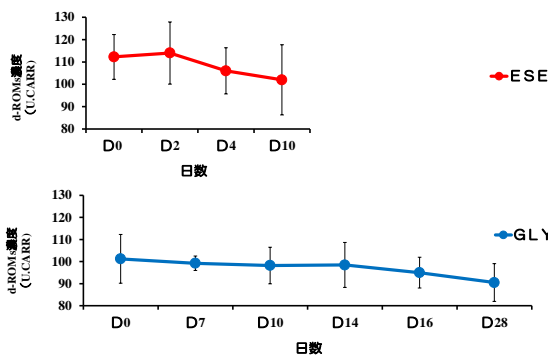


図3 抗酸化物質投与によるd-ROMs濃度の推移

試験 3

各区の受胎率を図 4 に示した。無処置区の受胎率は 0.0% (0/3 頭)、hcG 区は 20.0% (2/10 頭)、GLY 区は 25.0% (1/4 頭)、GLY+hcG 区は 33.3% (3/9 頭)、ESE+hcG 区は 33.3% (3/9 頭) であった。GLY+hcG 区や ESE+hcG 区のホルモン剤と抗酸化物質を併用した区が他の区と比較してやや高い傾向にあった。

各区の平均 P4 濃度の推移を図 5 に示した。hcG を投与した ESE+hcG 区、GLY+hcG 区、hcG 区の P4 濃度は、投与後速やかに上昇し、他の区と比較して高い傾向にあった。

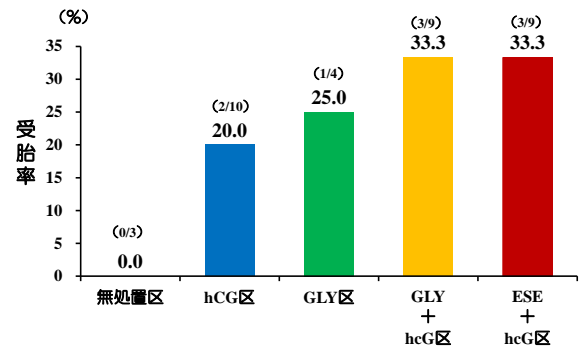


図4 受胎率の比較

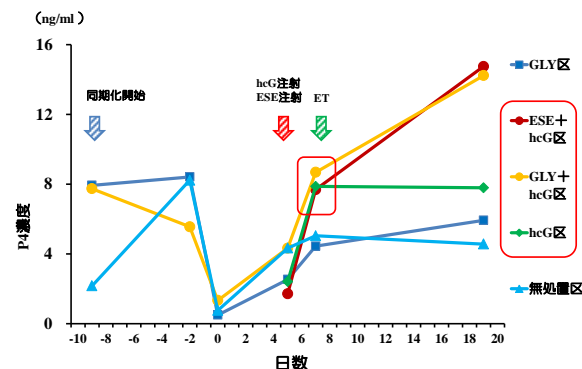


図5 P4濃度の推移【平均】

各区の平均 d-ROMs 濃度を図 6 に示した。抗酸化物質を投与した GLY 区、ESE+hcG 区、GLY+hcG 区の平均 d-ROMs 濃度は、抗酸化物質を投与していない区と比較して低く推移しており、特に GLY 投与区は低い傾向にあった。また抗酸化物質を投与した GLY 区、ESE+hcG 区、GLY+hcG 区において、移植当日の d-ROMs 濃度が 100U.CARR 以下になった牛の受胎率は、54.4% (6/11 頭) で 100U.CARR 以上であった牛の受胎率 9.1% (1/11 頭) と比較して高い傾向にあった (図 7)。

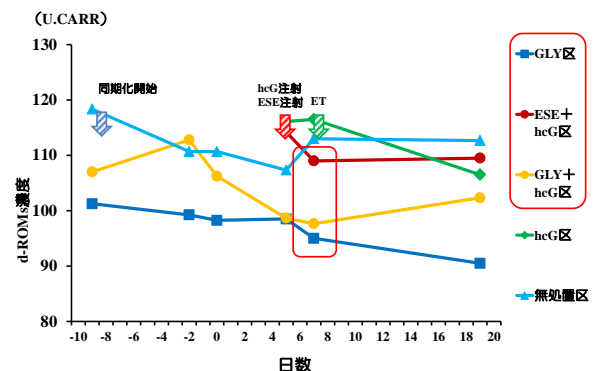


図6 d-ROMs濃度の推移【平均】

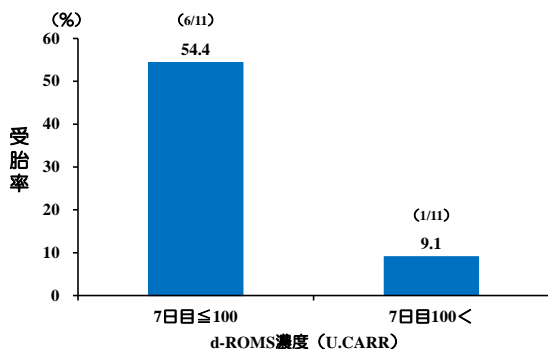


図7 抗酸化物質効果による受胎率

考 察

前回の試験にて、乳用経産牛における人工授精 (AI) の受胎率と P4 濃度、d-ROMs 濃度の関係を調査したところ、AI 後 5 日目の P4 濃度が 2.5ng/ml 以上で受胎率が高い傾向にあったこと、AI 後 5 日目の d-ROMs 濃度が 100U.CARR 以下で受胎率が高い傾向にあったことを報告した (小林ら、2015)。今回の試験 1 では ET における d-ROMs 濃度、P4 濃度、受胎率との関係を調査した。その結果、ET 当日の P4 濃度が 2ng/ml 以下および 8ng/ml 以上で受胎率が低い傾向にあった。Lonergan ら(2007)は、Day7~13 までの平均 P4 濃度が高い牛では、低い牛と比較して Day13 での胚のサイズが 2.3 倍大きくなると報告している。当初、P4 濃度は高いほど受胎率が高くなると考えていたが、今回の結果から一定濃度の P4 濃度があれば受胎には影響なく逆に高すぎると悪影響を与えると考えられた。そのため試験 1 において、hcG3000 単位を投与したが、投与量が多い可能性も考えられた。また通常の ET 適期は 7 日目 ± 1 日が理想とされている。今回、ET 依頼の多くが発情未確認後の出血での依頼であったことから、7 日目に ET を実施したつもりが 9 日目や 10 日目であった可能性があり、出血での依頼には十分注意する必要があると思われた。

ET 当日の d-ROMs 濃度と受胎との関係を分析したところ、100U.CARR 以下で受胎率が高く 100U.CARR 以上で受胎率が低くなる傾向にあった。高橋ら (2009) は、暑熱ストレス時の活性酸素の増加が、初期胚の発育を妨げると報告している。このため ET は、活性酸素が初期胚へ影響を与える時期を逃れることができること

から受胎率への影響は少ないと考えていた。しかし今回の結果では、d-ROMs 濃度が高いと受胎率が低下する傾向にあった。阪谷ら (2013) は、暑熱環境下では黄体維持機能が損なわれるため、胎児の成長や着床が阻害されると報告している。今回の試験でも、活性酸素が黄体や子宮に直接影響を与えたことが受胎を低くした要因ではないかと考えられた。

移植試験において抗酸化物質と P4 濃度の成績改善効果について検討したところ、例数は少ないが GLY+hcG 区、ESE+hcG が他と比較して高い傾向にあった。梅木ら(2004)は、発情後 5 日目と ET 当日に hcG1500 単位を投与することで受胎牛の血中 P4 濃度が上昇し、受胎率が向上したと報告している。また坂上ら (2005) も発情後 5、6、7 日目の hcG 投与は、既存黄体の増強と副黄体の形成による発情後 14 日目の血中 P4 濃度の上昇により、受胎率を向上させる可能性があることを報告している。今回の試験でも、hcG3000 単位を投与したことで P4 濃度が向上し、受胎率が改善したと考えられた。しかし試験 1 の結果から高すぎる P4 濃度は受胎率が低くなる可能性も考えられることから、黄体の状態によって投与量を調整することが望ましいと考えられる。

抗酸化物質を投与することで d-ROMs 濃度は低下し、受胎率が改善する傾向にあった。田中ら (2014) は脂肪酸とビタミン類を投与することによって d-ROMs 濃度が有意に低下したと報告している。今回の試験でも、ESE 投与が活性酸素の発生を抑制し子宮や卵巣の環境を改善したことが受胎率を向上させる要因となったと考えられた。古川ら (2008) は、代謝による熱産生が油脂よりグルコースのほうが 13% 程度少なく、ルーメンに悪影響のない糖源は暑熱ストレス軽減に利用できる可能性があるとしている。今回の試験ではグリセリンを給与することで d-ROMs 濃度が低下し受胎率が改善につながった。これは、グルコースと同様にグリセリン給与によって熱産生を抑制し、酸化ストレスの抑制に働いたためと考えられた。

以上のこと、ET の受胎率には、d-ROMs 濃度の低減と P4 濃度の向上が重要であると考えられ、d-ROMs 濃度の低減には抗酸化物質の投与が重要であり、P4 濃度の向上には hcG の投

与が有効であると考えられた。しかし抗酸化物質の効果には個体差があることや、ET 当日の P4 濃度が 8ng/ml 以上では受胎率が逆に低くなる可能性があることから hcG や抗酸化物質の投与量、時期はさらに検討する必要がある。

文 献

- 阪谷美樹, 暑熱による低受胎, 日本胚移植学誌
Vol.35.No.03.109-115.2013
- 田中正仁・野中最子・神谷裕子・鈴木知之, 栄養管理による高温環境下の泌乳生産性改善に関する研究. 栄養生理研究会報.
Vol.58, No.2, 1-11, 2014
- 高橋昌志・山中賢一・阪谷美樹, 牛胚の初期発生に及ぼす暑熱ストレスの影響. 日本胚移植学雑誌, Vol.31, No.1, 9-17, 2009
- Lonergan P, Woods A, Fair T, Carter F, Rizos D, Ward F, Quinn K, Evans A. Effect of embryo Source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 19(7), 861-868. 2007
- 小林崇之・堀川明彦・笹木教隆. ホルスタイン種経産牛における活性酸素代謝産物および血中プロゲステロン濃度が人工授精の受胎率に及ぼす影響. 福井県畜産試験場研究報告 第 28 号 7-11, 2015
- 坂上信忠・秋山清・田中嘉州・稲村慎二・仲澤慶紀・岸井誠男, 牛の受精卵移植における hcG 投与が受胎率に与える影響. 神奈川畜産試験場研究報告 No.90 1-11 2005
- 古川 修, 暑熱期の栄養並びに資料給与管理, 牧草と園芸 第 56 巻第 4 号, 8-12, (2008)

Effects of active oxygen metabolites (d-ROMs) concentration and plasma progesterone (P4) concentration on the conception rate of embryo transfer in dairy cows

Takayuki KOBAYASHI 1) and Kiyotaka SASAKI

1) Fukui Prefectural Health and Sanitation

Fukuil Preceftural Livestock Experiment Station

I examined the influence that the Reactive Oxygen Metabolites (d-ROMs) concentration and plasma progesterone (P4) concentration gave to a conception rate of the embryo transfer in the dairy cows. As a result, P4 concentration tended to come to have low conception rate in more than less than 2ng/ml or 8ng/ml. The d-ROMs density tended to come to have the highest conception rate below 100U.CARR. It was thought that it was important to conception rate improvement of ET doing P4 concentration than 2ng/ml and that I reduced d-ROMs concentration. After examining the influence that an antioxidant material gave to a conception rate of the embryo transfer, a conception rate of the ward that used hcG together with an antioxidant material tended to be high. In addition, the conception rate of the cow that less than 100U.CARR were able to reduce d-ROMs density of the day of ET by the antioxidant material dosage tended to be high with 54.4%.

Key word : dairy cow, embryo transfer, conception rate, Reactive Oxygen Metabolites,
progesterone concentration