

# ホルスタイン種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）濃度が人工授精の受胎率に及ぼす影響

小林崇之・堀川明彦・笹木教隆

**要 約** ホルスタイン種経産牛において活性酸素代謝産物（d-ROMs）濃度および血漿中プロゲステロン（P4）濃度の推移を調査し、その後の人工授精の受胎率に及ぼす影響について検討した。その結果、d-ROMs 濃度が 100U.CARR 未満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。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。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。以上のことから、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考えられた。

キーワード：ホルスタイン種経産牛、受胎率、活性酸素代謝産物、プロゲステロン濃度

## I 緒 言

本県では、酪農家のホルスタイン種経産牛を借り腹とした受精卵移植（ET）を活用しブランド牛「若狭牛」の生産拡大を進めてきた。しかし、乳用牛の飼養頭数は年々減少していることや繁殖成績が低下していることなどの要因により移植頭数が増えないことや受胎率が向上しないなど課題が多いのが現状である。

近年、繁殖成績の低下の要因として、酸化ストレスの存在が注目されている。通常、乳牛は乳生産などでエネルギーを生産するとき副産物として活性酸素が発生するが、抗酸化物質と反応し水などに変換され無毒化されるといわれている。しかし泌乳量の増加に伴い、乳生産に必要なエネルギー代謝が活発化することで活性酸素の発生量が増加し、除去しきれなくなる。この除去能力を超えた状態を酸化ストレス状態といい、大量に発生した活性酸素は、卵巣や子宮の細胞を損傷し、子宮環境を悪化させていることやホルモン濃度の慢性的な低下を引き起こすなど、繁殖成績低下の原因の一つと考えられている。（阪谷ら，2013）

そこで今年度は、繁殖成績改善に向けてホルスタイン種経産牛の状態改善を目的として、酸化ストレスの指標の1つである活性酸素代謝産物濃度（d-ROM 濃度）およびプロゲステロン濃度（P4 濃度）と人工授精における受胎率との関係について分析したので報告する。

## II 材料および方法

試験 1. d-ROMs 濃度と P4 濃度の関係を調査した

### （1）供試牛

福井県奥越高原牧場で繋養されている不受胎のホルスタイン種経産牛 6 頭を用いた。

### （2）方法

平成 26 年 7 月 2 日～8 月 25 日の期間に尾静脈から血漿真空採血管にて定期的に採血を実施（合計 24 回）し、d-ROMs 濃度と P4 濃度の推移を測定した。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・ビオメリュー, 東京）により測定した。

試験 2. d-ROMs 濃度、P4 濃度、受胎率との関係を調査した

(1) 供試牛

管内酪農家 3 戸 (A 農家、B 農家、C 農家) で繋養されているホルスタイン経産牛 70 頭を用いた。

(2) 方法

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、) を 100  $\mu$ g 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 F2  $\alpha$  (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 200  $\mu$ g 投与し、投与後 12 時間~24 時間後に人工授精 (AI) を実施した (うち AI 後 5 日~19 日目まで CIDR を挿入した牛 54 頭)。AI 後 20 日目以降に発情観察を行い、発情の確認できたものには再度 AI を行い、できなかったものに関しては 35 日目に妊娠鑑定を行った。妊娠鑑定は、超音波診断装置 (トリंगा V, MTF 社製、大阪) を用い、胎児、心拍の確認を持って妊娠 (+) と診断した。

AI 日を 0 日として 5 日目に尾静脈から真空採血管 (真空採血管、テルモ) にて採血を行った。採取された血液は、氷水で冷蔵保存後、遠心分離 (3000ppm、15 分、5 $^{\circ}$ C) を行い、血漿分離後 -80 $^{\circ}$ C にて冷凍保存した。その後分析時に融解後、d-ROMs 濃度を測定し黄体ホルモン濃度 (P4 濃度) を酵素免疫測定法により測定した。また胚への影響を確認することを目的に AI 後 19 日目のインターフェロン誘導性遺伝子 (ISG15) の発現量を測定した。19 日目に尾静脈から EDTA 真空採血管で採血を実施し、Gifford ら (2007) の方法に準じ PBL を採取し、200  $\mu$ l を 750  $\mu$ l の TRI Reagent と混合し、分析まで -80 $^{\circ}$ C で冷凍保存した。ISG15mRNA の発現量は、リファレンス遺伝子は CycA を使用

し、Green ら (2010) の方法に準じて Real Time PCR により測定した。

結 果

試験 1

d-ROMs 濃度および P4 濃度の推移を調査したところ、d-ROMs 濃度は、低いものでは 70U.CARR 以下、高いものでは 200U.CARR 以上であった。d-ROMs 濃度が 100U.CARR 以下で推移している個体では、P4 濃度は周期的に変化しており、正常な発情周期を示していた。しかし 100U.CARR 以上に上昇しているものでは、P4 濃度の起伏が小さく、低く推移しその後卵巣静止に移行した牛もみられた。(図 1)

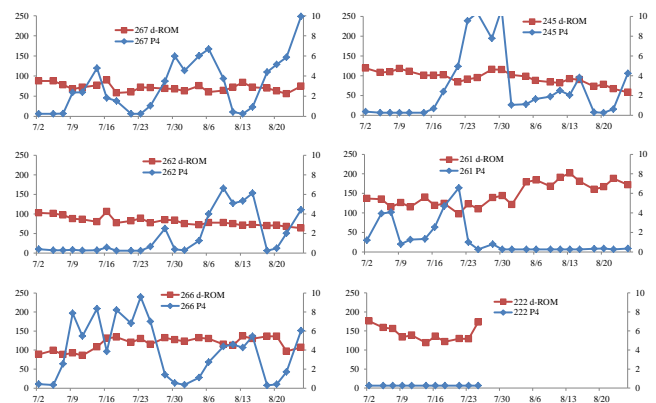


図 1 d-ROMs 濃度と黄体ホルモン濃度の推移

試験 2

d-ROMs 濃度と受胎率の関係を表したグラフを図 1 に示した。d-ROMs 濃度が 100U.CARR 以下の受胎率は 48.0% (12/25 頭)、100U.CARR 以上の受胎率は 33.3% (15/45 頭) であった。

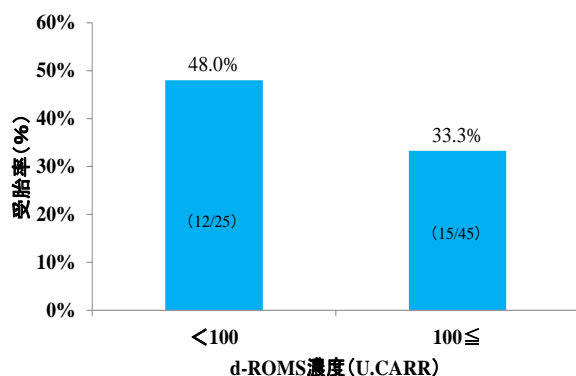


図 1 d-ROMs 濃度と受胎率

農家別の平均 d-ROMS 濃度および受胎率は、A 農家 (d-ROMS 濃度 : 96U.CARR、受胎率 50.0%)、B 農家 (106、35.7%)、C 農家 (130.5、28.6%) であり、d-ROMS 濃度が高くなるにつれ受胎率が低下する傾向にあった。(図 3)

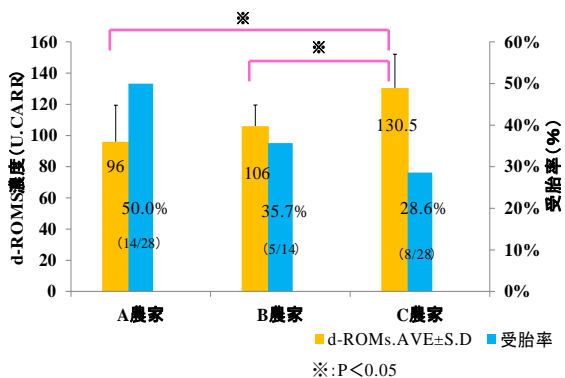


図 3 (農家別) 平均 d-ROMS 濃度と受胎率

供試牛の P4 濃度と受胎率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 42.9% (3/7 頭)、2.5ng/ml 以下で 20.0% (2/10 頭) であった。また AI 後 5 日目に膈内留置型黄体ホルモン製剤 (CIDR) を装着したところ、2.5ng/ml 以上で受胎率 46.7% (14/30 頭)、2.5ng/ml 以下で 34.8% (8/23 頭) であった。(図 4)

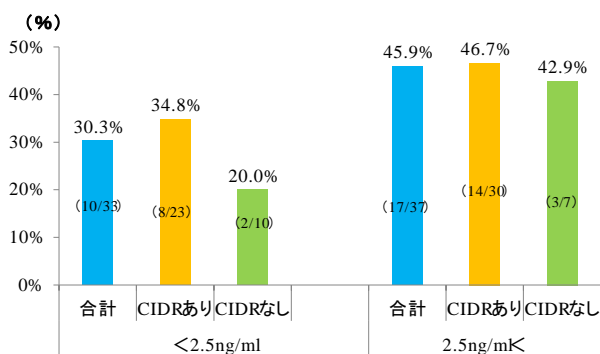


図 4 P4 濃度と受胎率

#### IV 考 察

近年、乳牛の体内で酸化ストレスが過度に高くなってきていること (田中ら, 2014) や暑熱ストレスによる活性酸素の増加が初期胚の発生

低下を引き起こす (高橋ら, 2009) など酸化ストレスの存在が注目されている。今回の試験では、定期的に採血を実施し、d-ROMS 濃度と P4 濃度を測定したところ、例数は少ないものの d-ROMS 濃度が高くなるに従い P4 濃度が低くなる傾向にあり、なかには 0.25ng/ml 以下で推移している卵巣静止様の牛もみられた。Wolfenson ら (2000) は、夏場の乳用牛は暑熱ストレスの影響で P4 濃度が減少すると報告している。今回の試験でも試験期間が 7 月 2 日～8 月 25 日であり、同様に夏場の暑熱ストレスによる活性酸素の増加が卵巣に影響を及ぼし P4 濃度の低下を引き起こした可能性が考えられ、繁殖成績低下の要因として活性酸素が関与している可能性が示唆された。

Nishigai ら(1998)の報告では、受精卵移植前日の血中 P4 濃度が 2.5ng/ml 以上では 2.5ng/ml 未満に比べて受胎率が高いと報告している。試験 2 において、AI 後 5 日目の P4 濃度と受胎率の関係を調査したところ 2.5ng/ml 未満の牛に比べて 2.5ng/ml 以上の牛は受胎率が高い傾向にあった。Mann ら (2006) は、AI 後 4～6 日目の血中 P4 濃度とその後の胚の大きさには相関があると報告している。今回も 5 日目の P4 濃度が高い牛で受胎率が高い傾向にあったことから、AI 後 5 日目の P4 濃度が 2.5ng/ml 以上であれば胚が順調に発育し受胎につながりやすいと考えられた。

また AI 後 5 日目の P4 濃度が 2.5ng/ml 未満の牛に CIDR を装着したところ、受胎率が向上する傾向にあった。Mehni ら (2012) の報告では、AI 後 5～19 日目の黄体ホルモン製剤の装着で受胎率が改善したと報告しておりこれらの結果と一致する。また、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。今回の試験でも CIDR 装着により AI 後 5 日目以降の P4 濃度が上昇したことが胚の発育を促し、その後の受胎に影響を与えたと考えられたことから、近年問題になっている乳用牛の低受胎の改善対策の 1 つとして活用できると考えられる。

d-ROMS 濃度と受胎率の関係を調査した結果では、d-ROMS 濃度が 100U.CARR 未満で受胎率が高い傾向にあった。高橋ら (2009) は、

## 文 献

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。今回の試験でも、AI 後 5 日目の d-ROMS 濃度が高い牛で受胎率が低い傾向にあったことから、活性酸素の存在が初期胚の発育に影響したと考えられ、活性酸素の低減が受胎率改善につながると考えられる。また、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している。当初、活性酸素の増加が卵巣に作用し P4 濃度が低下することで受胎率の低下が起こっていると考えていたものの、今回の試験では AI 後 5 日目の d-ROMS 濃度と P4 濃度の間に相関は認められなかったことから、増加した活性酸素が子宮や胚に直接なんらかの影響を与えていると考えられた。

農家別の平均 d-ROMS 濃度は農家間で差がみられ、平均 d-ROMS 濃度が高くなるほど受胎率が低くなった。これまで活性酸素の増加する要因として泌乳量の増加 (平子ら, 2011)、高温時のストレス (高橋ら, 2009) などが報告されており、今回の試験でも農家間で差がみられたことから飼養管理や牛舎環境によりストレスが上昇したものと推察されるが、その要因については明らかでない。田中ら (2014) の報告によると脂肪酸とビタミン類を給与することで d-ROMs 濃度が有意に低下するとしている。また大澤ら (2014) の報告では、アスタキサンチンの給与により繁殖性の改善が期待できるとある。今後は、農家ごとの活性酸素増加の要因を分析し、抗酸化物質投与による改善方法を検討していく必要があると考えられる。

以上のことから、乳用牛の受胎率の改善には発情後 5 日目の P4 濃度向上とともに d-ROMS 濃度の低減が重要であると考えられた。今後は、抗酸化機能物質の投与による d-ROMS 濃度の低減効果を検討し、受胎率改善につなげていく予定である。

- 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
- C.A.Gifford, K.Racicot, D.S.Clark, K.J.Austin, T.R.Hansen, M.C.Lucy. Regulation of interferone-Stimulated Genes in Peripheral Blood Leukocytes in Pregnant and Bred, Nonpregnant Dairy Cows. J. Dairy Sci. 90:274-280.2007
- J.C.Green, C.S.Okamura, S.E.Poock, M.C.Lucy. Measurement of interferone-tau(IFN-t) Stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18-20d after insemination in dairy cattle. Animal reproduction Science 121:24-33.2010
- 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
- D.Wolfenson, Z.Roth, R.Meidan, Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. Animal reproduction science 60, 535-547, 2000
- Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T, Kaneda Y. Pregnancy rate and blood progesterone concentrations on the previous day and the day of frozen embryo transfer in parous recipient cows of Japanese Black. J. Reprod. Dev., 44, 413-419. 1998
- Mann GE, M.D.Fray, G.E.Laming. Effect of time of progesterone supplementation on embryo development and interferone-tau production in the cow. Vet J, 171, 500-503, 2006
- Mehni SB, Shabankareh HK, Kazemi-Bonchenari M, Eghbali M. The Comparison of Treating Holstein Dairy Cows with Progesterone, CIDR and GnRH After Insemination on Serum Progesterone and Pregnancy Rates.

Reproduction in domestic animals Feb. 47.  
131-134.2012

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

平子誠・高橋ひとみ・櫛引史郎. 乳牛の繁殖席  
低下の現状と子宮環境－繁殖性向上に向け  
た取り組み－. 日本家畜臨床感染症研究会  
誌. Vol.6, No.3, 123-130, 2011

大澤玲・傍島英雄・林登・佐藤秀俊・伊藤智・  
伊藤等・鬼澤直樹・深沢芳隆・小林幸恵・  
三角亮太・時田康弘・近藤龍三郎・関根禪・  
林峰之・伊藤稔・小島敏之・下島徹子・藤  
川卓郎・青木真理・野中最子・山中晴道・  
宮本亨・樋口浩二・櫛引史郎・永西修・平  
子誠. 抗酸化機能性サプリメントの給与が  
ホルスタイン種初産牛の繁殖成績に及ぼす  
影響. 日本胚移植学誌 Vol.36, No.03,  
149-156, 2014

Effects of active oxygen metabolite concentration and plasma progesterone concentration on the conception rate of artificial insemination in Holstein cows

Takayuki KOBAYASHI, akihiko HORIKAWA and Kiyotaka SASAKI

The transition of the active oxygen metabolite concentration and plasma progesterone concentration was investigated in Holstein cows, were examined effects on artificial insemination conception rate. As a result, In the cows d-ROMs concentration has remained at less than 100U.CARR, P4 concentration has changed periodically, in the above cows 100U.CARR had remained low P4 concentration of relief is small. Average d-ROMS concentration was higher conception rate compared to the high farmers at low farmers. the P4 concentration of 5 days after artificial insemination tend higher conception rate at 2.5ng / ml or more, it was in the low trend below 2.5ng / ml. But conception rates for P4 concentrations of 2.5ng / ml below of dairy cows tended to be improved by the administration of CIDR. From the above, it is important to increase of P4 concentration and decrease of active oxygen in the conception rate improvement.