

家畜と繁殖機能

久米新一

京都大学大学院農学研究科

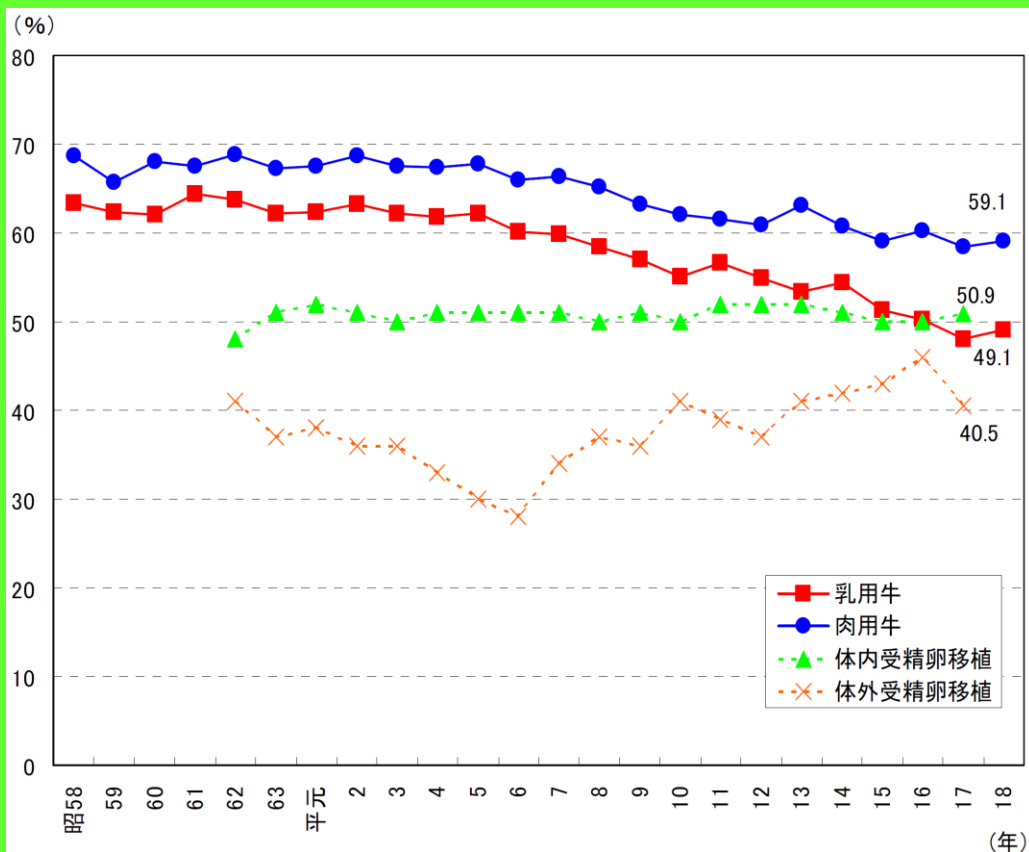
家畜の生産性向上とシグナル伝達

家畜は体内の恒常性維持よりも生産性向上に重点をおいて改良したため、情報伝達などに不備が生じやすくなっている



環境ホルモンと栄養素の不足(タンパク質、カルシウム、リンなど)、生理機能の変化(生産性重視)、免疫能の低下によるシグナル伝達の不備が高まる危険性

研究の背景：肉用牛の受胎率低下



資料：農林水産省畜産部（平成20年）
初回人工受精受胎率

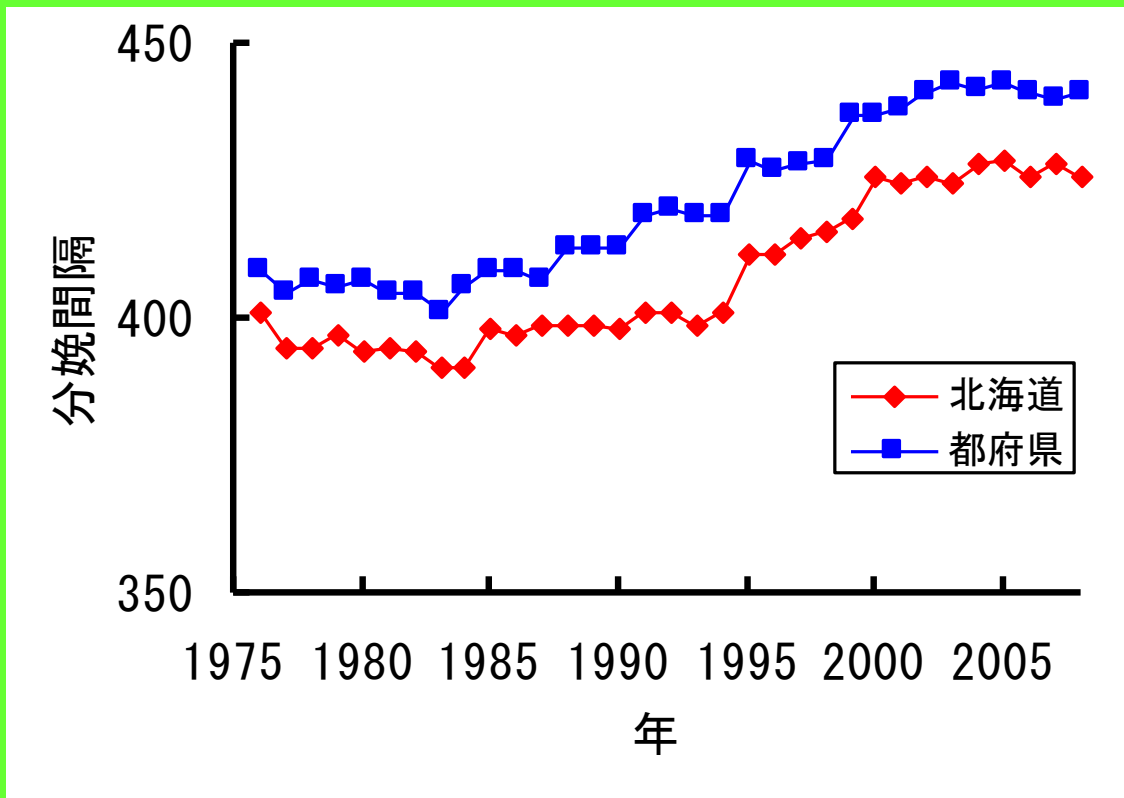
- 肉用牛の人工授精受胎率は59%に低下

- 体外受精卵移植牛の受胎率も40%に低迷



- 繁殖機能の改善と優良な体外受精胚の生産が必要

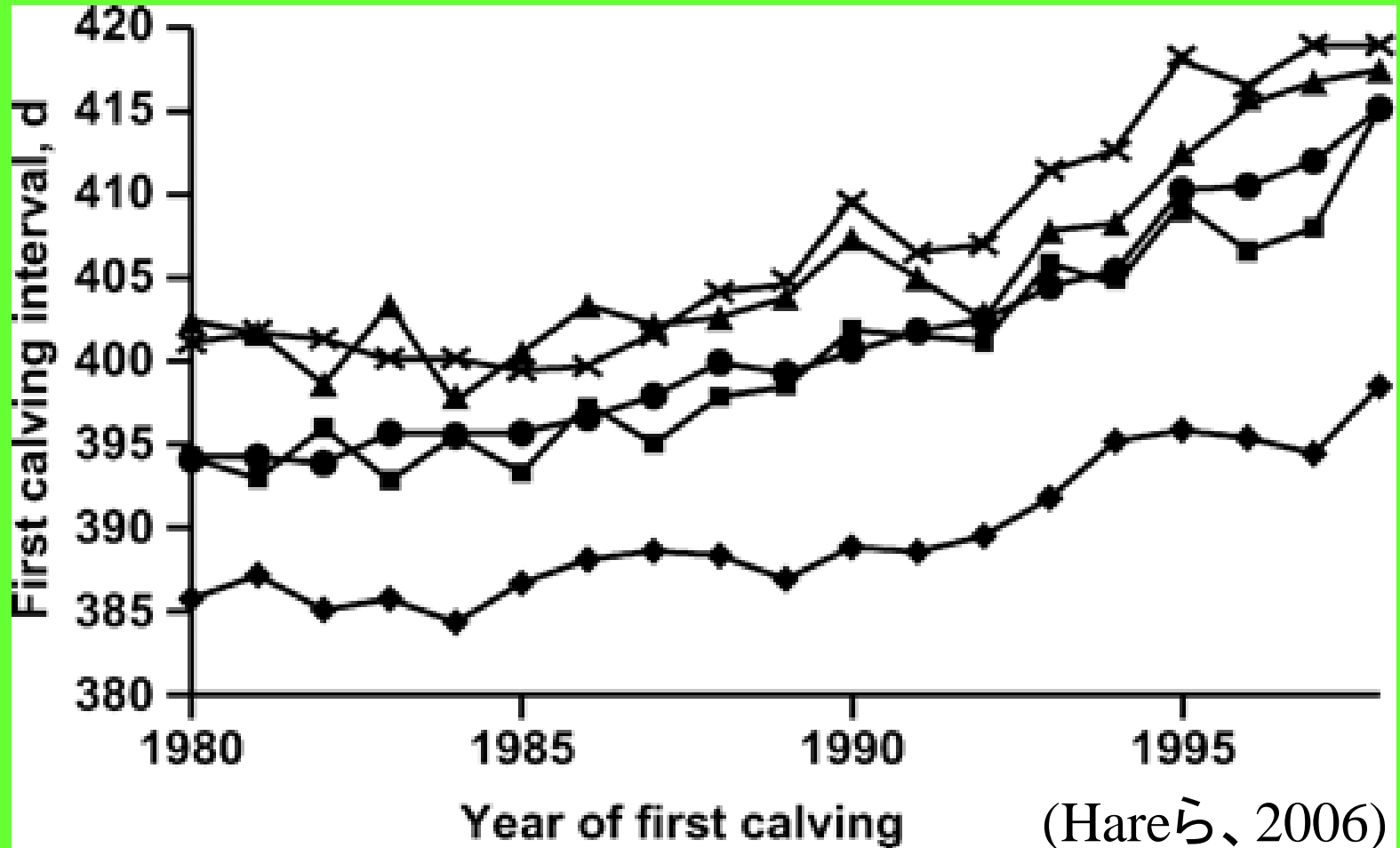
都府県と北海道の乳牛の分娩間隔



- ・分娩間隔:平20年
426日(北海道)
441日(都府県)
- ・分娩間隔は猛暑の年に上昇する
- ・分娩間隔はその後回復しない
(猛暑の1994年:10日以上の上昇)

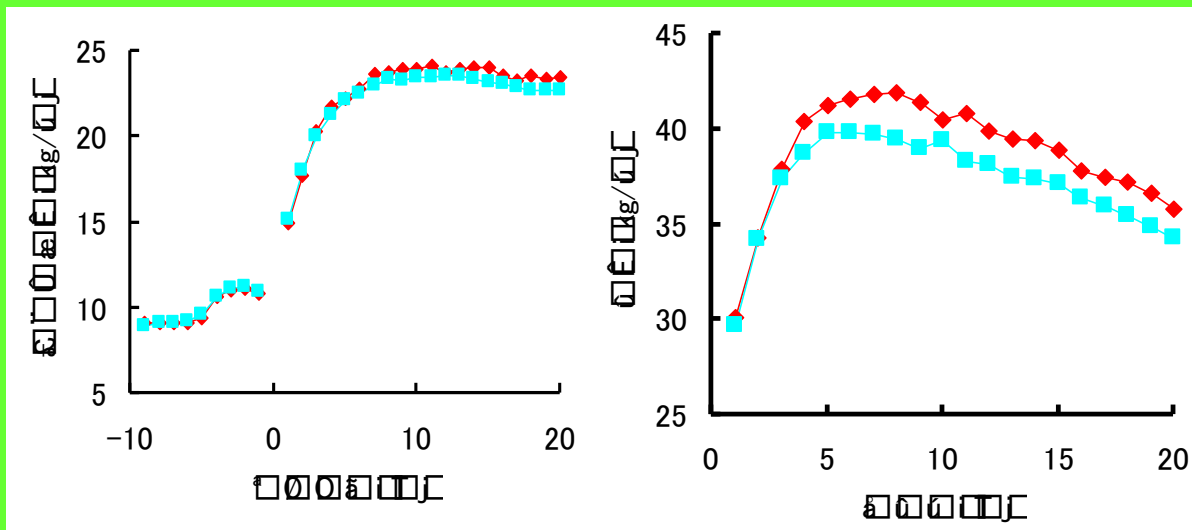
(牛群検定成績)

米国の乳牛(ホルスタイン種:●)の 初産から2産までの分娩間隔



エアシャー(■)、ブラウンスイス(▲)、ガンジー(×)、ジャージー(◆)

図、魚粉(◆)区と大豆粕(■)区の乳牛の 乾物摂取量・乳量・繁殖成績(協定研究)



	魚粉区	大豆粕区
頭数	44	44
発情回帰日数、日	58.8	57.8
初回授精日数、日	80.0	81.3
授精回数、回	1.31	1.27
受胎率、%	54.6	59.1

繁殖成績(受胎率)低下の要因

乳牛の能力向上と農家の規模拡大の影響

- ・ **育種的要因**: 遺伝的能力の急速な向上
- ・ **栄養的要因**: 栄養管理の改善の遅れ
- ・ **管理的要因**: 規模拡大・労働時間増加に伴う発情観察時間不足(発情の見逃し)
- ・ **動物的要因**: 高泌乳化に伴う乳牛の代謝特性の変化
- ・ **飼料的要因**: 自給飼料の栄養価低下



さまざまな要因が相互に絡み合っている

繁殖成績と暑熱ストレス

- 栄養素は維持、成長、泌乳、脂肪蓄積の順に優先的に配分され、繁殖機能や健康維持への配分は最下位に位置
- 栄養管理が適切でないと繁殖機能へ利用される栄養素は少なくなり、高温時に暑熱ストレスの影響で乳生産が低下した場合には、繁殖成績への悪影響は一層厳しいことを意味している
- 暑熱ストレスは酸化ストレス？

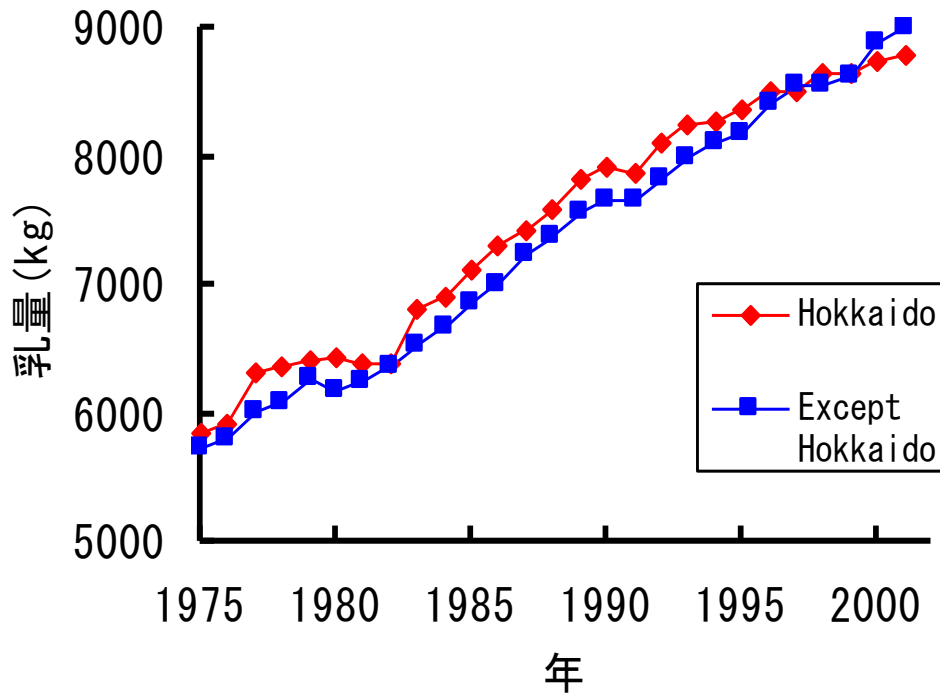
活性酸素の2面性

- 動物は酸素を利用することによって、効率よくATPを生成できる(エネルギーの有効利用)
- **デメリット**: 酸素生成時に発生する活性酸素が遺伝子の損傷など、生体に害を及ぼす(老化、疾病などの発生要因)
- **メリット**: 体内の有害微生物・成分の除去など、生体の感染防御に重要な役割をはたしている
- ミトコンドリアに及ぼす影響が大きい

ミトコンドリア : ATPの生成

- ミトコンドリアで代謝産物からATPを生成する過程で、酸素はスーパーオキシド→過酸化水素→ヒドロキシラジカルを経て水になるが、この時発生した活性酸素が酸化によって細胞、遺伝子等を傷害する
- 活性酸素のメリット: 外部から侵入した異物(有害微生物など)を排除する

乳量増加と生体機能



- 乳量増加とともに体内代謝が活発になり、酸素消費量が増加したが、活性酸素活性量も増加しているのではないか？

・スーパーカウ：2万ー3万kg/年の生産

表、乳牛のO₂、CO₂、CH₄ 産生量

	乾乳牛	泌乳牛
体重 (kg)	618±63	614±47
DMI (kg/日)	7.7±1.0	20.7±2.2
乳量 (kg/日)	--	29.5±6.7
O ₂ 消費量 (l/日)	3361±386	5162±443
CO ₂ 産生量 (l/日)	3747±423	6354±472
CH ₄ 産生量 (l/日)	304±41	646±58
熱発生量 (MJ/日)	74.5±7.2	112.9±9.0

- ・**ライソソーム**：

各種の水解酵素
(約70種)で細胞
内の異物を加水
分解する

- **ペルオキシソーム**：過酸化水素を発生させる酸化酵素と過酸化水素を分解するカタラーゼが含まれるが、過酸化水素は有害なため、発生した過酸化水素はカタラーゼによって安全な水と酸素に分解される(脂質分解)

オキシドール(消毒薬)

- 消毒薬のオキシドールの成分は過酸化水素
- 体の傷口にオキシドールをつけると酸素の泡ができる:細胞に含まれているカタラーゼ(酵素)が触媒となり、過酸化水素を分解する



↑
カタラーゼ

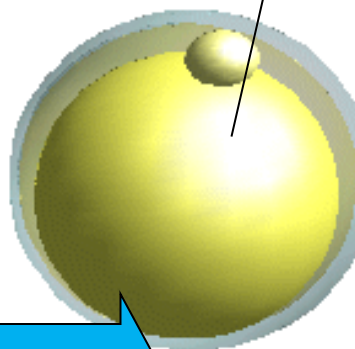
活性酸素の発生源:細胞内の活性酸素の90%以上はミトコンドリアで生成

内因性

- 酸化リン酸化
- NADPHオキシダーゼ
- キサンチンオキシダーゼ
など

外因性

- 外環境の酸素濃度
- 外環境のグルコース濃度
- 金属イオンによる誘導
- 可視光
など



- 細胞膜の脂質酸化
- タンパク質の修飾
- DNAの損傷
- ミトコンドリアの異常
- アポトーシスの誘導
- 酸化還元電位の変化
- 遺伝子の発現量の変化

初期胚発生
の
異常

活性酸素(ROS)

- 親水性ROS

→カタラーゼなどの酵素、ビタミンC、葉酸などのビタミンB群などによる消去

- スーパーオキシドアニオン(O_2^-)
- 過酸化水素(H_2O_2)
- ヒドロキシルラジカル($HO\cdot$) など

- 疎水性ROS

→カロテノイド、ビタミンA・Eなどによる消去

- 過酸化脂質($LOO\cdot$ など)
- 一重項酸素(1O_2)

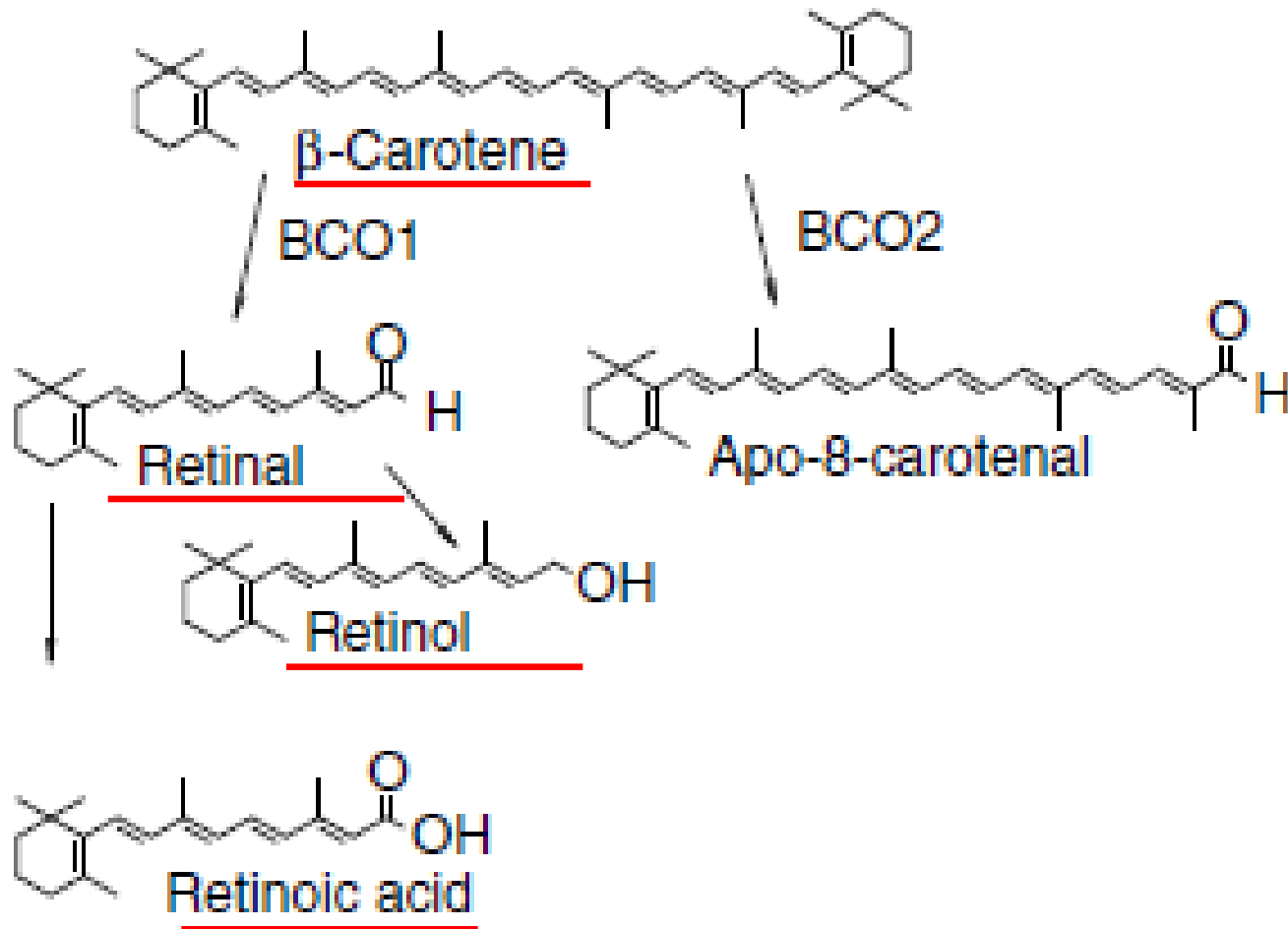
ニンジンサイレージの利用

- ニンジン畑で出来たもののおよそ半分が規格外として捨てられる
- ニンジンサイレージは品質がよく、給与すると血液と牛乳中のベータカロテンが増えた

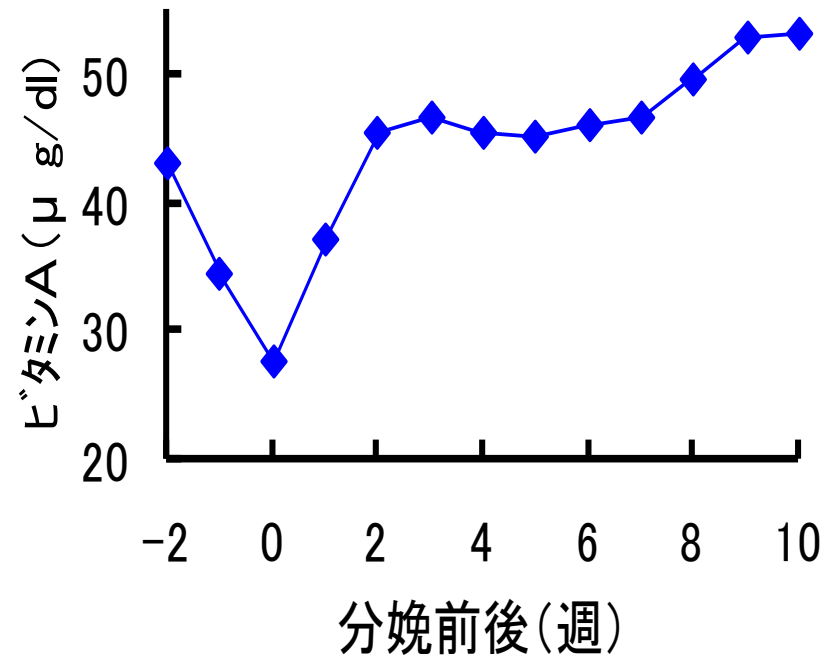
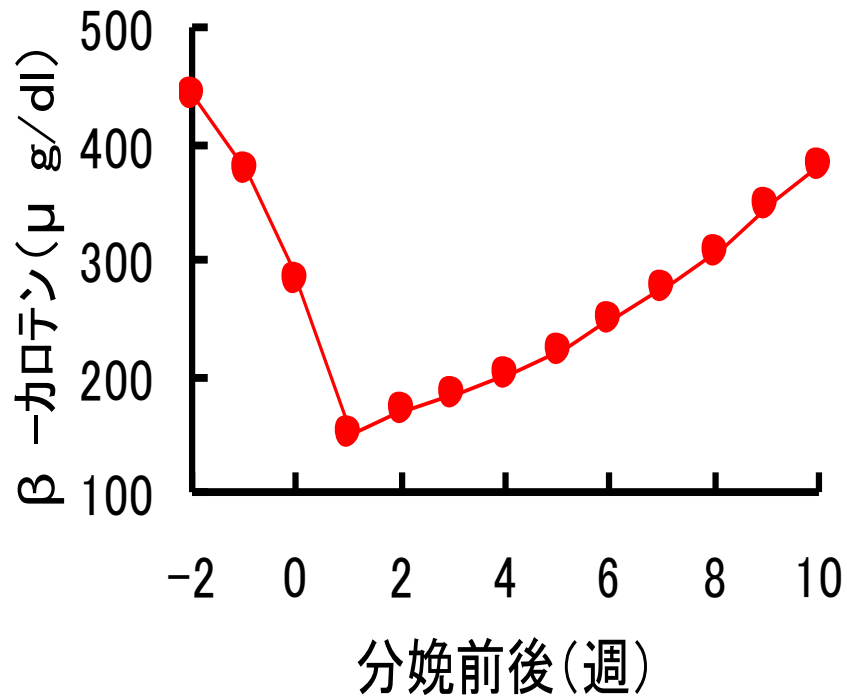


レチノイン酸への変換

(b)

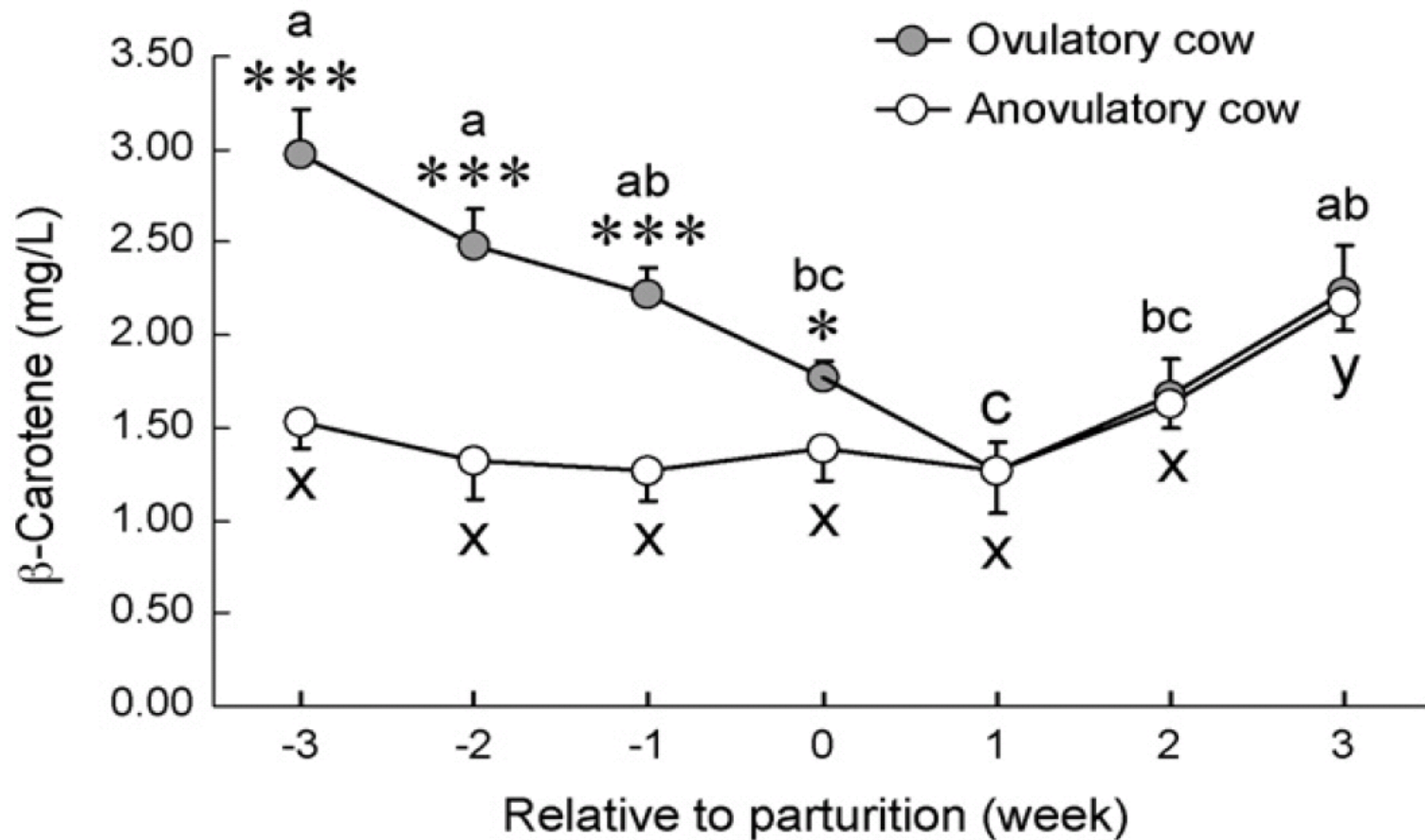


図、乳牛の血漿中ビタミン濃度



・分娩直後は活性酸素の働きを高めることが効果的？

乳牛の排卵と血漿中β-カロテン



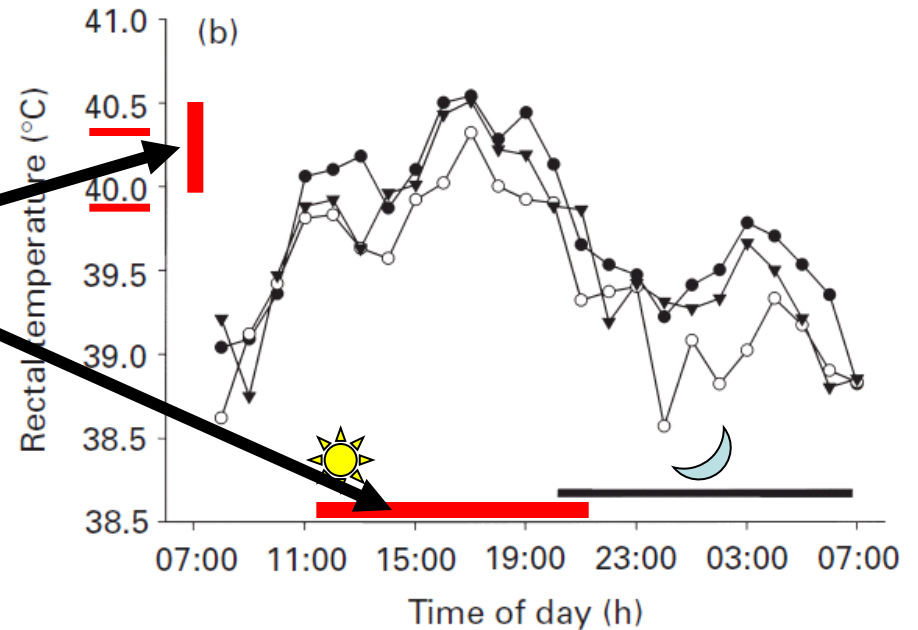
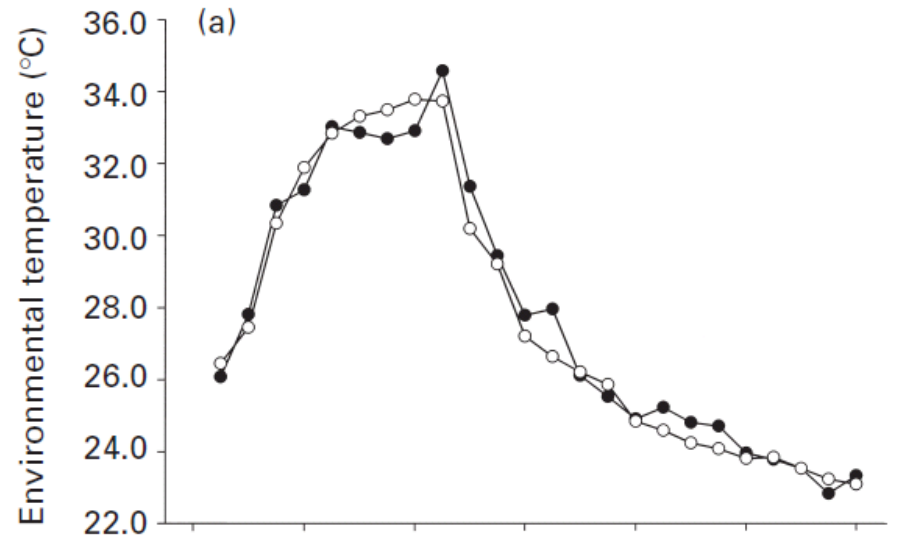
Kawashimaら(2009)

背景および目的①

•環境温度と乳牛の直腸温



40~40.5°C
10時間程度

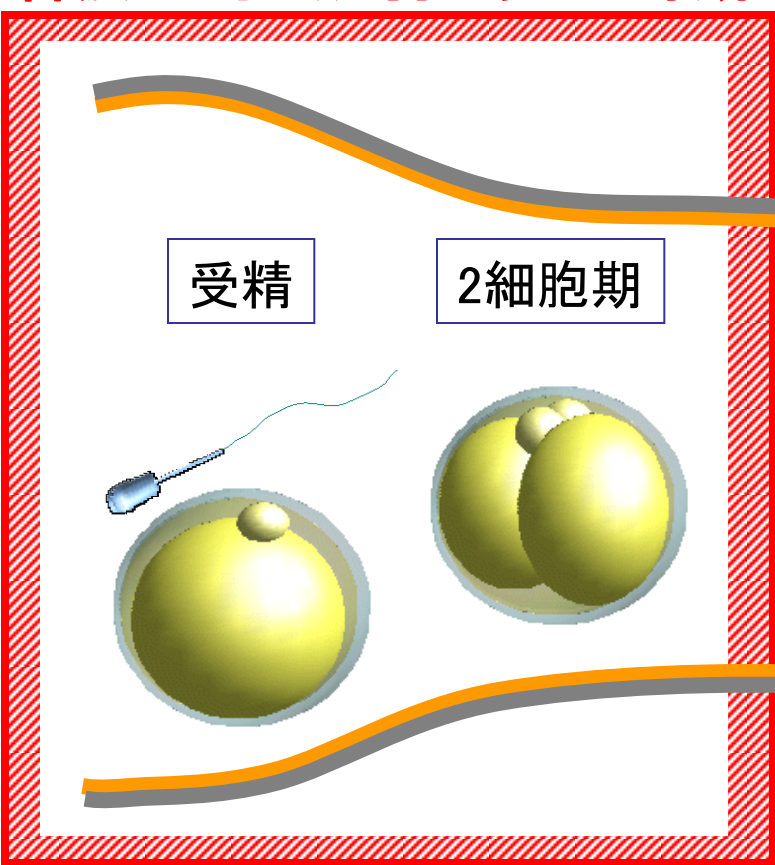


Rivera and Hansen (2001)
Reproduction 121, 107-115

哺乳類の着床前発生と暑熱への感受性

子宮

暑熱に対し脆弱な発生時期



卵管

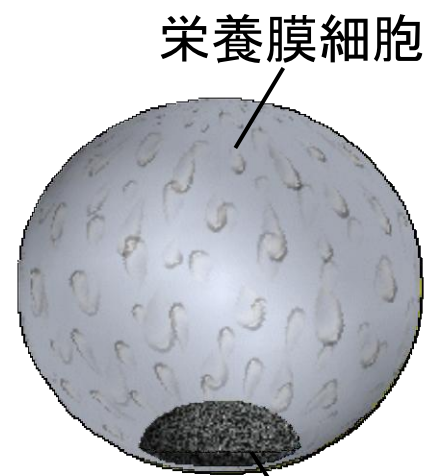
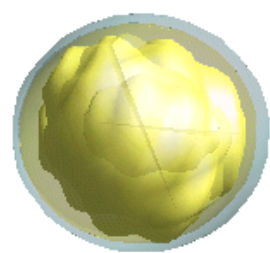
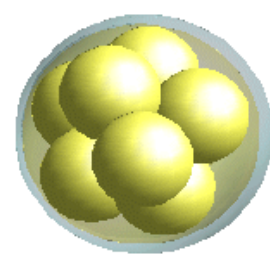
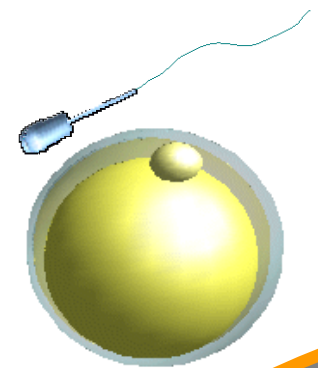
受精

2細胞期

8細胞期

桑実胚

胚盤胞



栄養膜細胞

内部細胞塊

ウシ(受精後)

Day1-2

Day2-3

Day5-6

Day6-8

背景および目的③

•実験1

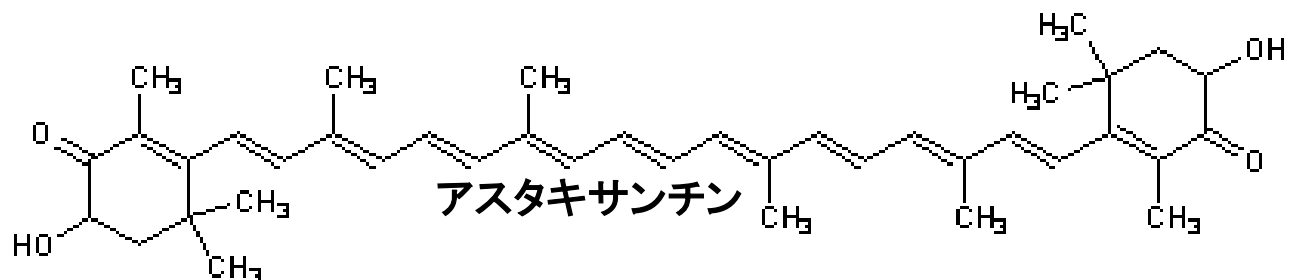
ウシ初期胚発生に対する暑熱ストレスの直接的な影響

•実験2

アスタキサンチンを含む製剤(Ax)の培養液への添加が暑熱ストレス下での胚発生におよぼす影響

ウシ初期胚は暑熱ストレスによって活性酸素種による酸化ストレスを受けることが示唆されている(Sakatani *et al.* 2004)

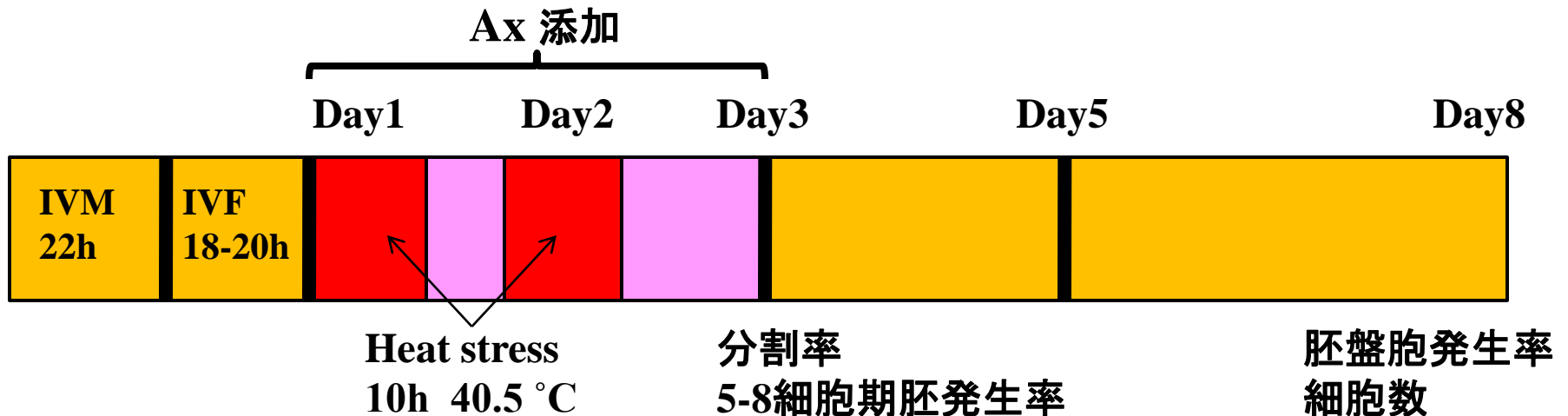
→抗酸化物質を用いた酸化ストレスの除去が、初期胚に対する暑熱ストレスの緩解に有効であると考えられる



材料と方法

・実験2

- ・ アスタキサンチン(Ax)の調製
 - ・ Ax濃度を0, 2.5, 25 ppmとした培地を調製
→Day1~3において使用
- ・ 実験区
 - ・ 暑熱処理の有無 × Ax濃度の計6区で試験



統計学的解析

各処理の効果をt-検定(実験1)、分散分析(実験2)で解析(P< 0.05)

実験2で有意差があった場合、Bonferroni法を用いて各処理の効果を多重比較

結果

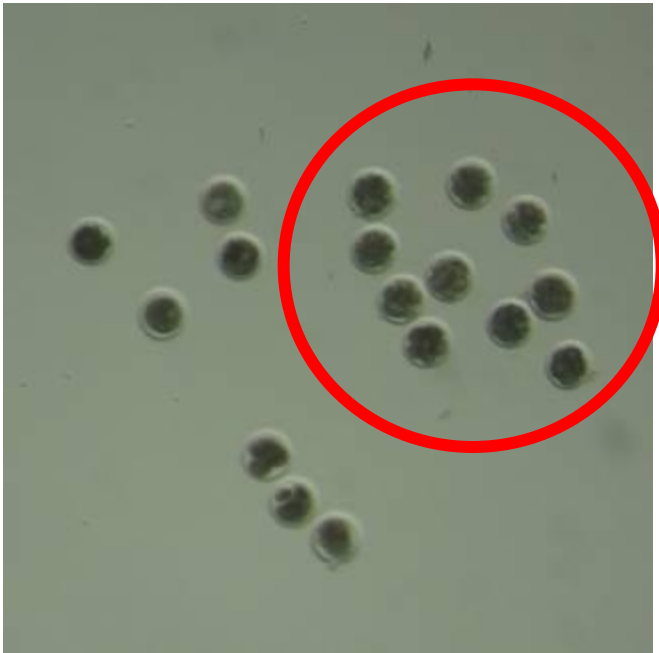
・実験1

Day3: 対照区、暑熱区での分割率、5-8cell発生率

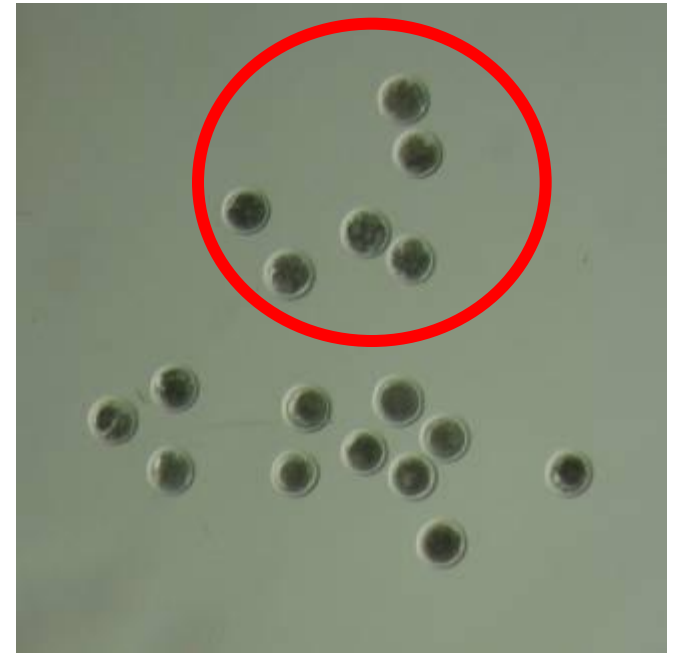
Treatment	No. of oocytes	No. of replicates	% (mean \pm SEM)	
			Cleavage	5-8cell
Control	128	6	66.1 \pm 7.8	48.8 \pm 5.3
Heat	128	6	58.9 \pm 4.5	<u>17.7 \pm 2.0</u> ※

※ denotes significant difference within the same column (P<0.05).

Control



Heat



結果

・実験1

Day8: 対照区、暑熱区での胚盤胞発生率、胚盤胞／分割率

Treatment	No. of oocytes	No. of replicates	% (mean \pm SEM)	
			Blastocyst	Blastocyst /Cleavage
Control	128	6	20.9 \pm 3.3	32.0 \pm 4.4
Heat	128	6	<u>2.2 \pm 1.0</u> ※	<u>3.7 \pm 1.7</u> ※

※ denotes significant difference within the same column (P<0.05).

Control



Heat



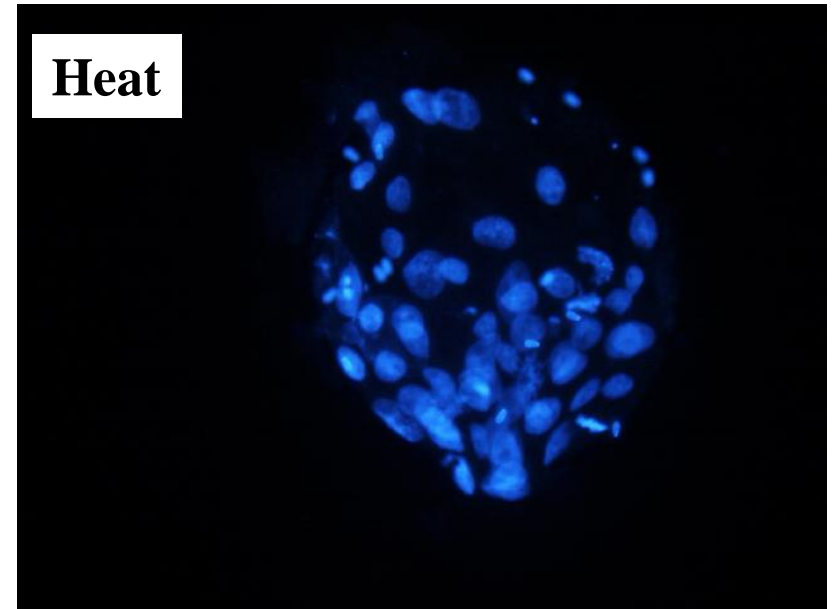
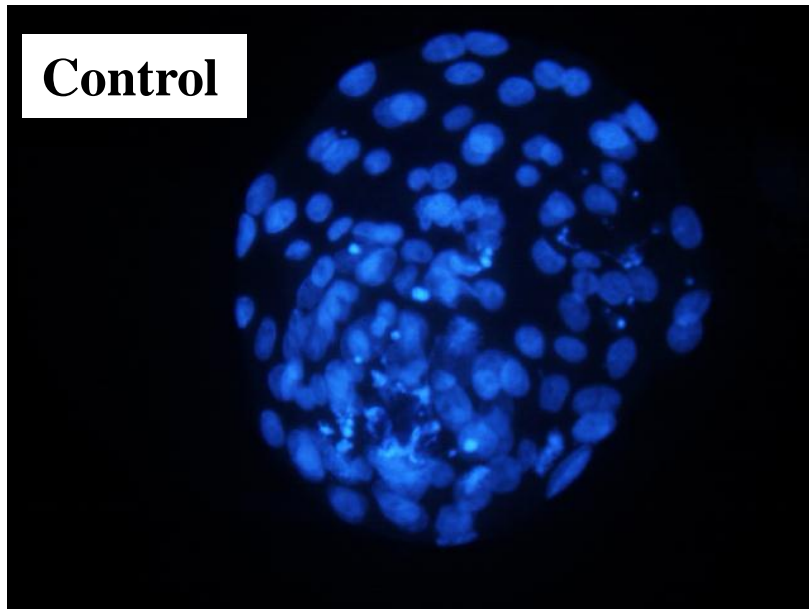
結果

・実験1

胚盤胞の細胞数

Treatment	No. of replicates	No. of blastcysts	No. of cells (mean \pm SEM)
Control	11	36	91.5 \pm 6.7
Heat	5	7	61.9 \pm 10.5 ※

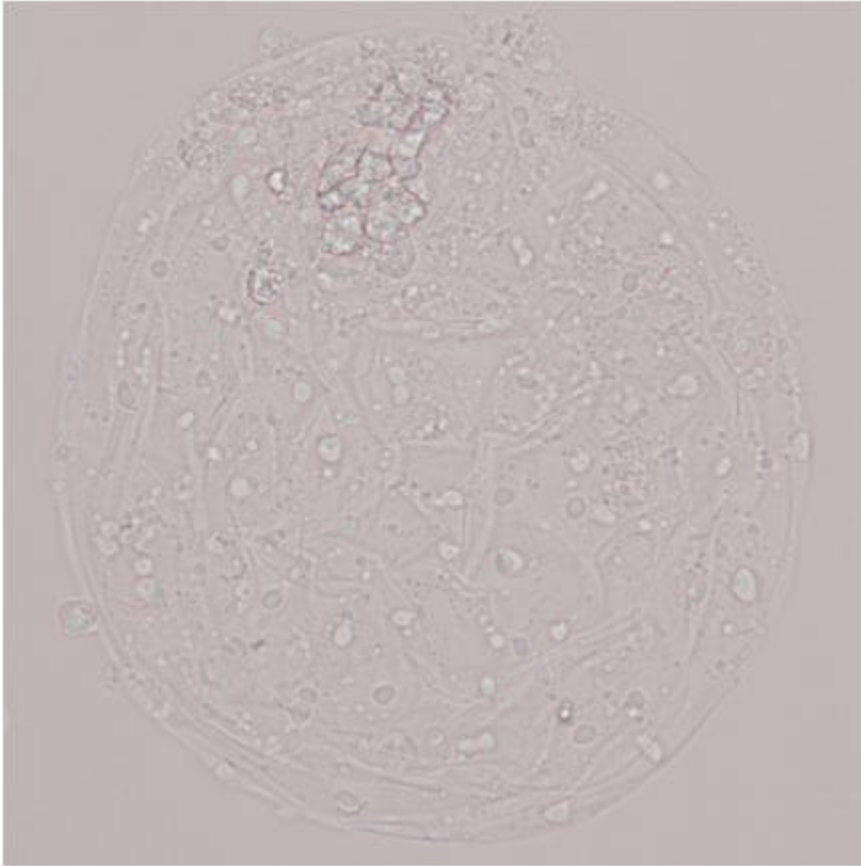
※ denotes significant difference ($P < 0.05$).



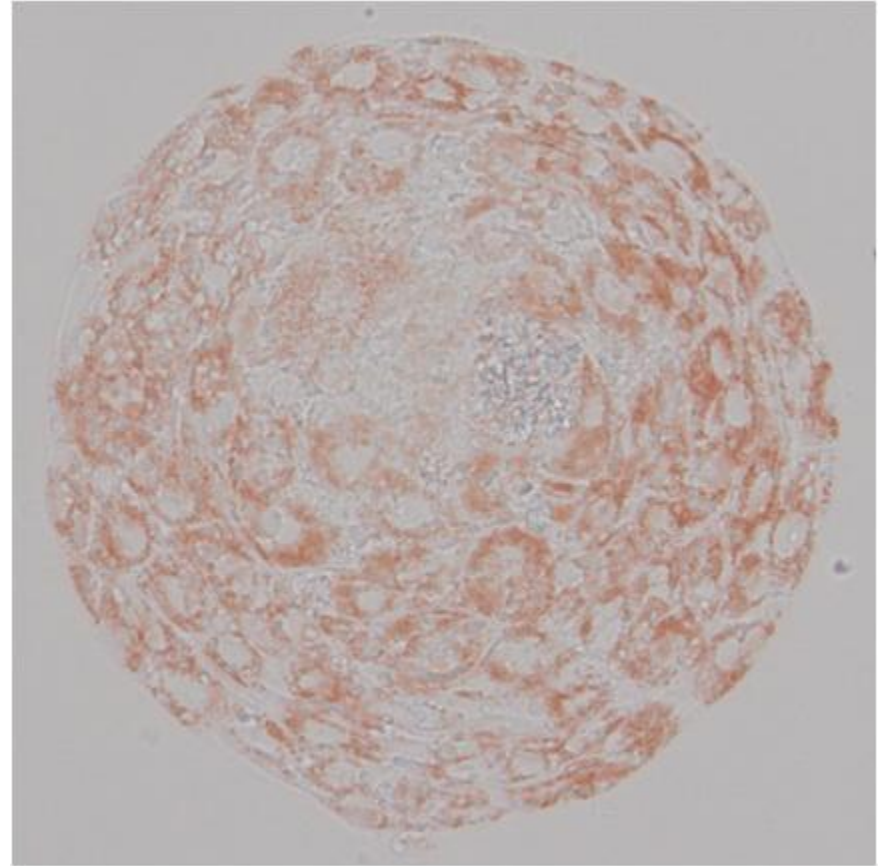
結果②

胚盤胞期におけるアスタキサンチンの取り込み

対照

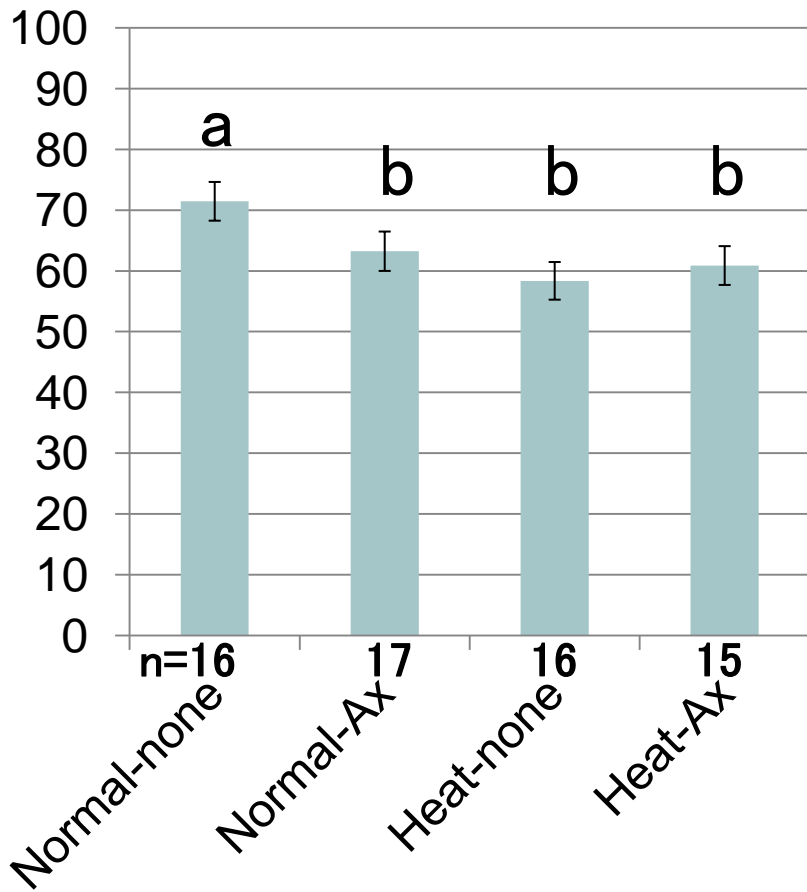


Ax 2.5 ppm

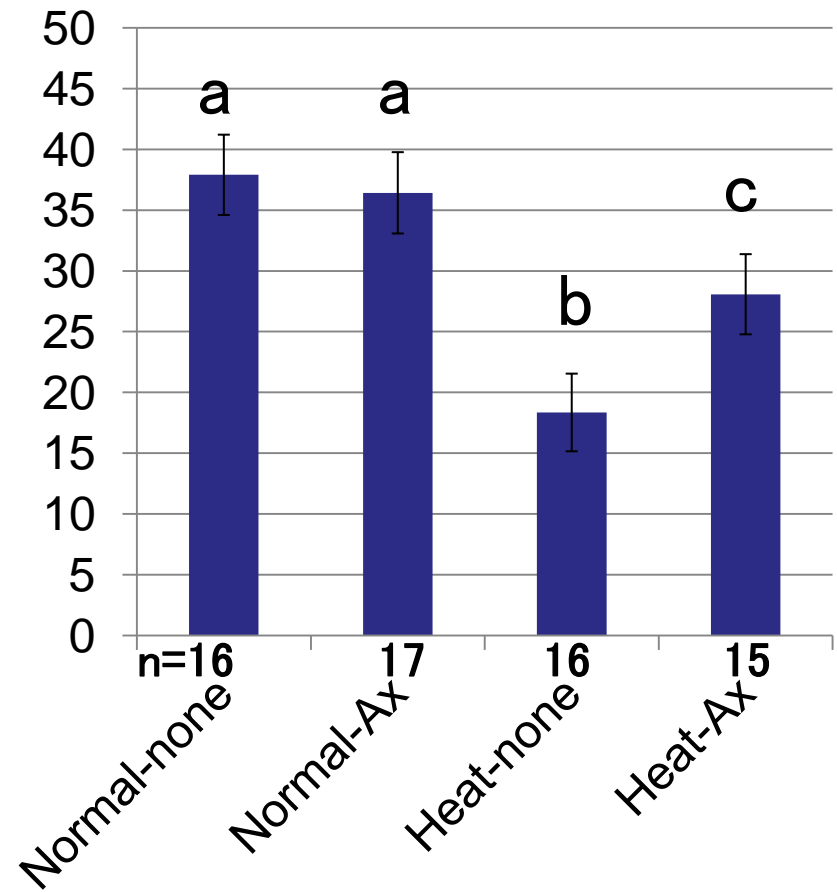


胚発生率(培養3日目)

分割率(%)



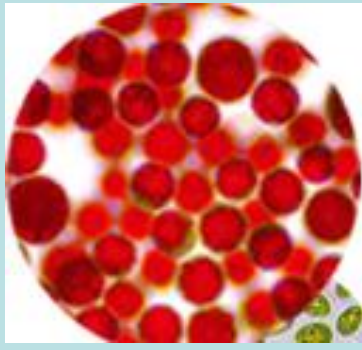
5-8細胞期発生率(%)



今後の課題 家畜へのAx給与

- 家畜へのAx給与が受胎率、耐暑性におよぼす影響

Axを含む水産資源

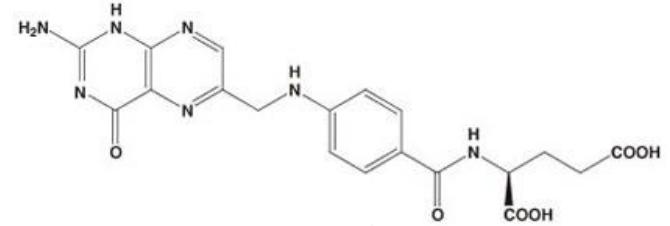


飼料への
Ax添加

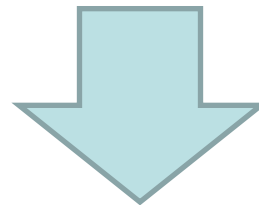


夏季の受胎率の向上
乳量などの生産性の向上
未利用資源の有効利用
飼料自給率の向上

葉酸 (Folic Acid)



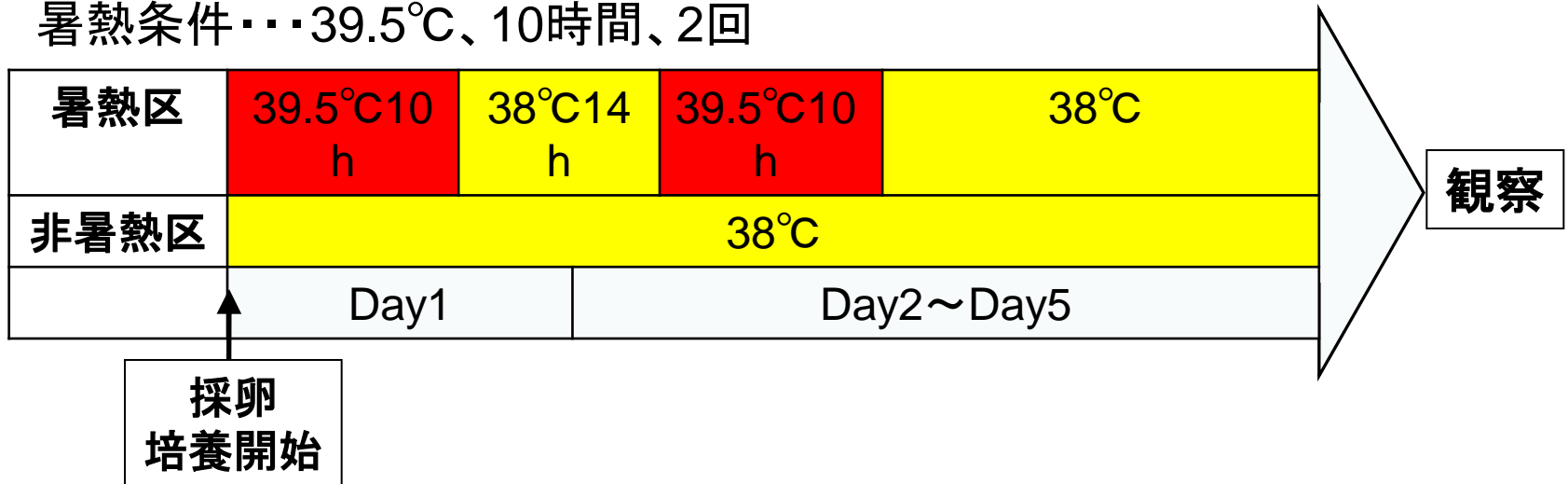
- ビタミンB₉、水溶性
- 葉酸の効果
 - ブタ卵母細胞の体外成熟において、葉酸添加によって卵丘細胞のアポトーシスが減少し、胚盤胞発生率が上昇した (Kim *et al.* 2009)
 - 暑熱ストレスを受けたウズラに葉酸を給与すると、増体低下が回復し、細胞に酸化ストレスを与える血中ホモシステインが減少した (Sahin *et al.* 2003)



暑熱ストレス緩解が期待される

材料と方法：①胚盤胞発生率・細胞数

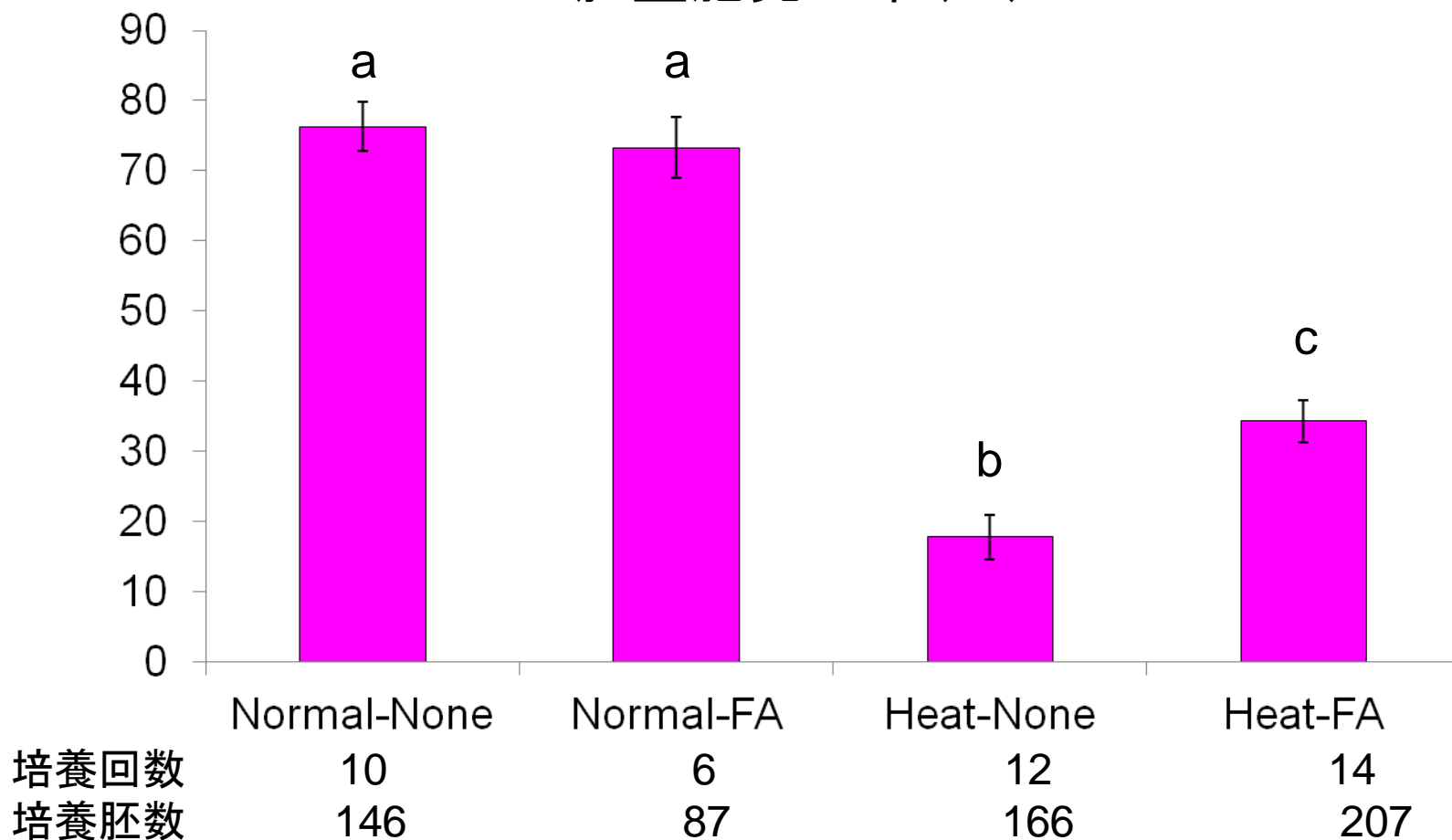
- 初期胚・・・ICR系雌マウス×BDF1系雄マウス
- 過排卵処理・・・PMSG注射、44～48時間後hCG注射、18時間後採卵
- 培地・・・KSOM培地
- 培養条件・・・38°C、5%CO₂
- 暑熱条件・・・39.5°C、10時間、2回



- 葉酸濃度・・・1000 ng/ml
- hCG注射後114h(Day5)で観察、胚盤胞発生率の評価
- PI・ヘキストで染色し、総細胞数、内部細胞塊(ICM)・栄養外胚葉(TE)細胞数の計測

結果：胚盤胞発生率

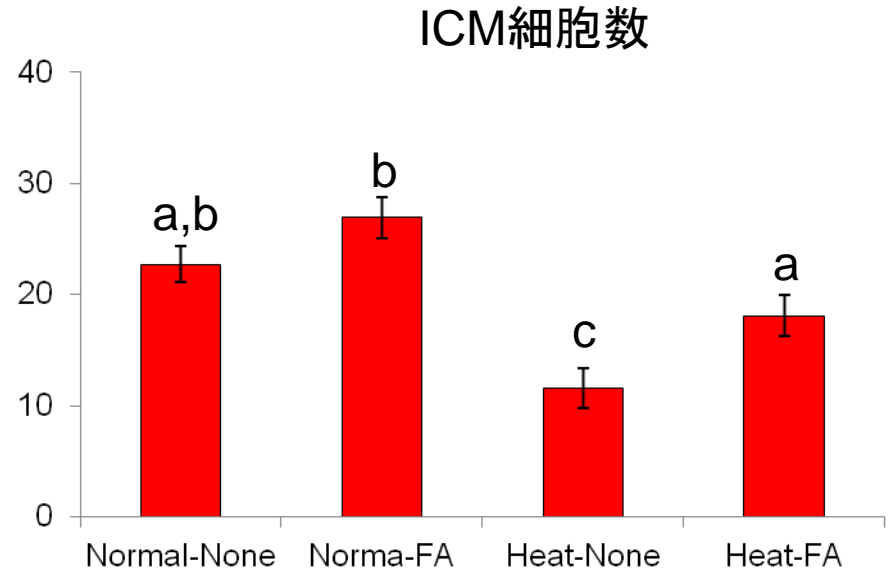
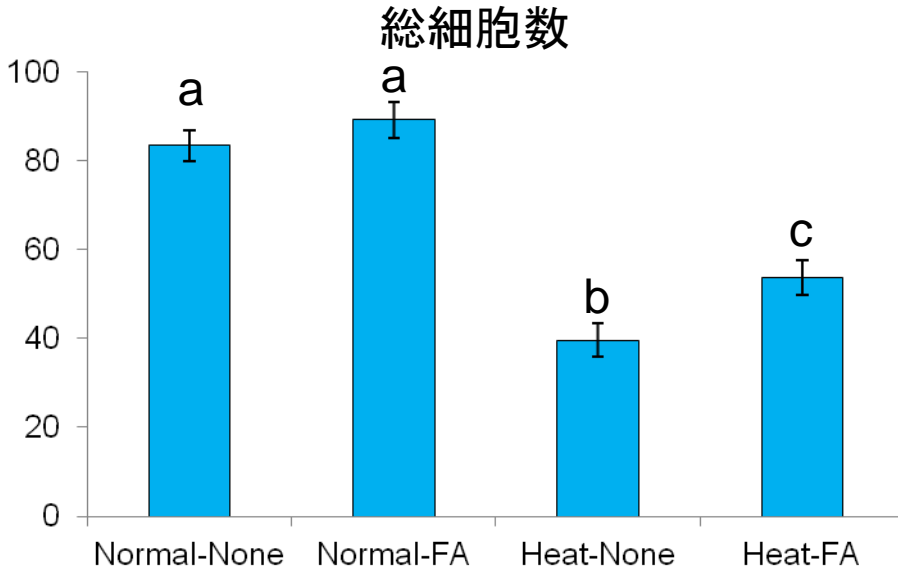
胚盤胞発生率(%)



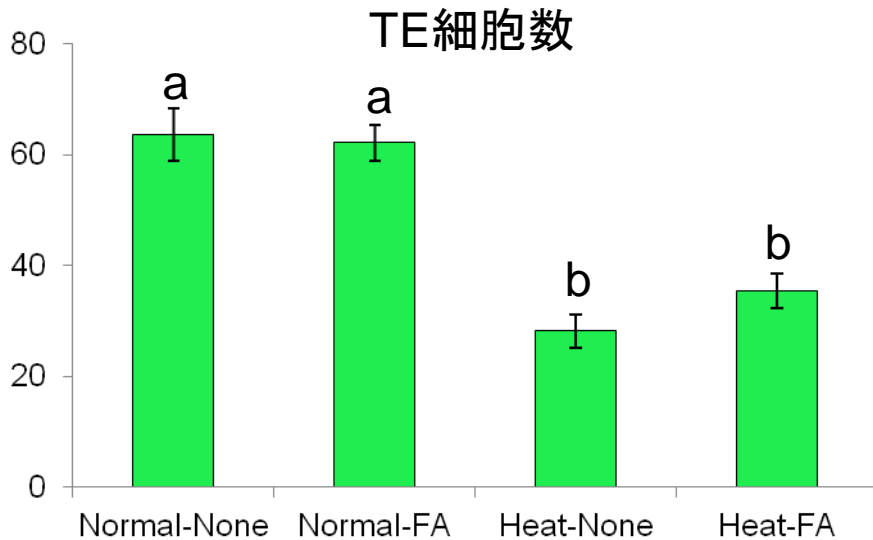
異なる記号間に有意差ありP<0.01

葉酸の添加によって胚盤胞発生率が上昇

結果:細胞数測定



異なる記号間に有意差ありP<0.05



培養胚数

N-N	N-FA	H-N	H-FA
27	21	23	22

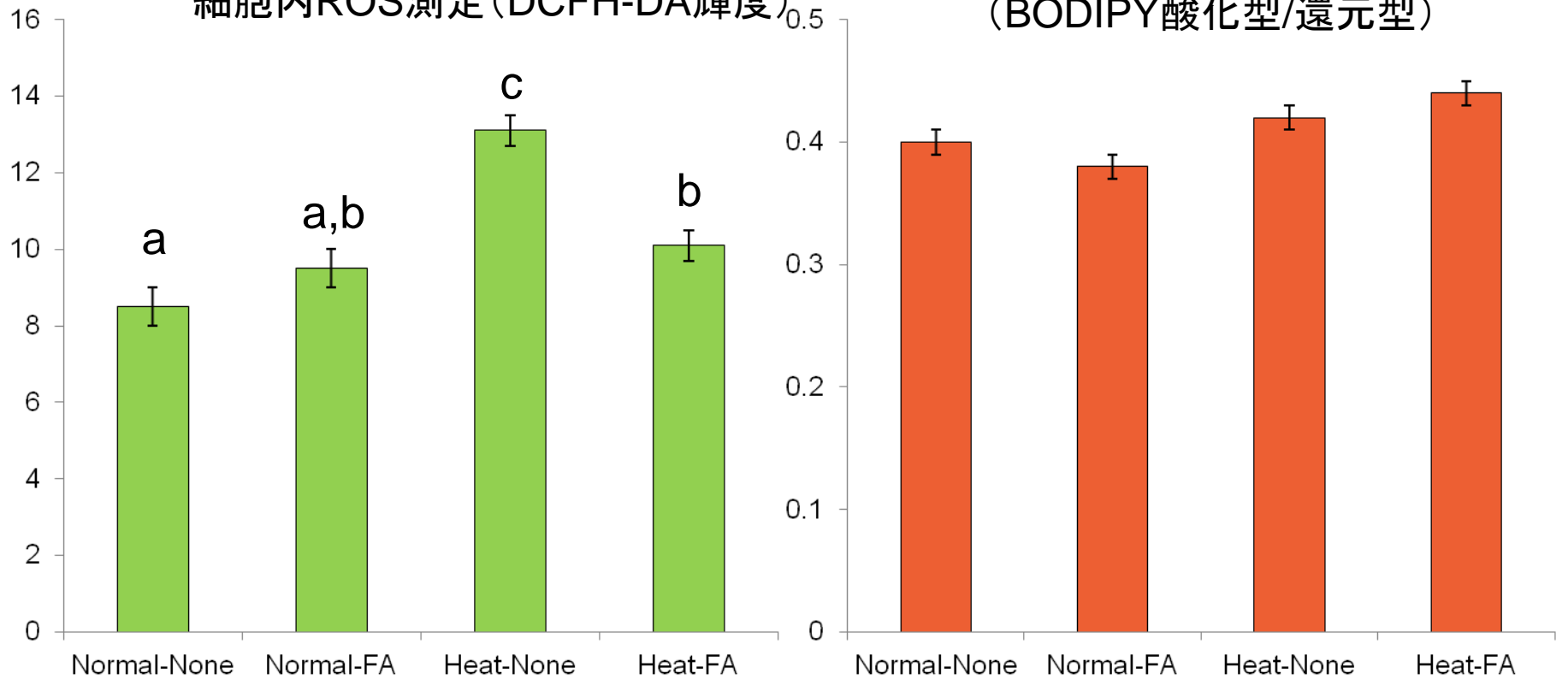
葉酸の添加によって細胞数が増加



葉酸は暑熱ストレス緩解作用を持つ

結果：酸化ストレス測定

細胞内ROS測定 (DCFH-DA輝度) 脂質過酸化測定 (BODIPY酸化型/還元型)



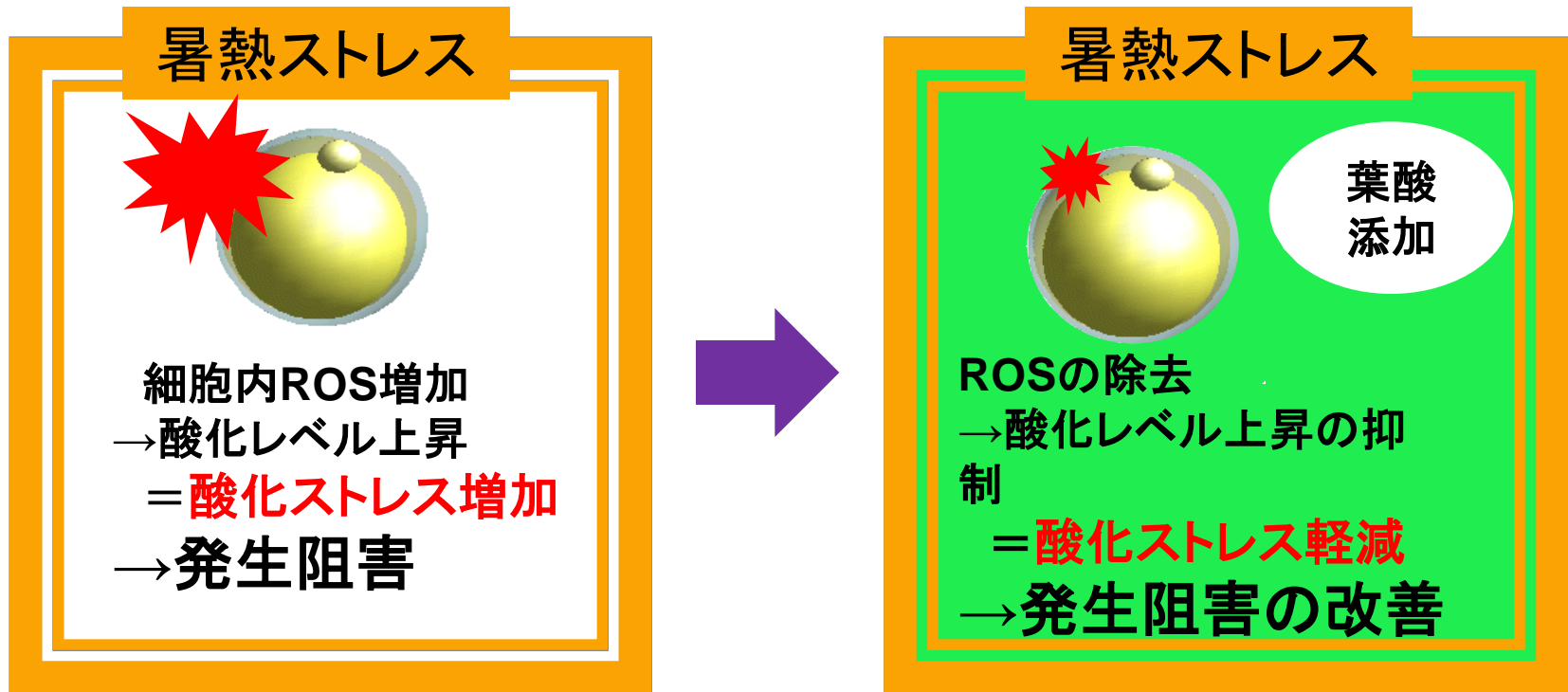
培養回数	3	3	3	3	2	2	2
培養胚数	20	17	18	18	13	15	12

異なる記号間に有意差ありP<0.05

葉酸添加によって細胞内ROSレベルが低下

考察

葉酸による酸化ストレス軽減作用



葉酸によりROSの直接的な消去
→ 暑熱ストレス緩解効果の主たる作用