

牛全乳中性ステロイドホルモン濃度に及ぼす分娩後日数、 受胎の有無、飼養環境の影響の調査

鹿児島大学農学部獣医学科 小島 敏之

研究目的及び内容

平成21年度は、独立行政法人畜産草地研究所と共同研究契約を締結し、同研究に参画している延べ12県計60頭の乳用牛の分娩後2週目から分娩2ヵ月前の乾乳まで週1回（受胎確認までは週3回）の頻度で全乳を採材し、性ステロイドホルモン濃度の測定に供した。その結果、分娩後徐々に卵巣と子宮機能が回復するとともに発情が回帰し、人工授精による受胎が成立後、妊娠前半までの期間の全乳中の性ステロイドホルモン濃度の推移は、血液中の性ステロイドホルモン濃度の推移と非常に近似していることが確認された。また、すべての牛において、全乳中エストラジオール17β（E2）濃度の上昇ピークが先行し、次いで全乳中プロジェステロン（P4）濃度の上昇ピークが続くことは、血液中で知られている動態と同様であることもわかった。また、受胎をしていない牛で発情周期を反復している場合は、全乳中の性ステロイドホルモン濃度は周期的に増減を繰り返すこと、受胎するとP4濃度は持続的に高濃度を示すこと、妊娠継続の有無とP4濃度の推移は正の相関を示すこと、妊娠中期以降、E2濃度も上昇してくるなどの現象がほぼ共通にみられた。さらに、個体差があるものの、牛によっては分娩後かなり早期に卵巣が活動を再開していることがうかがわれる内分泌動態を示すことがわかった。この知見は、非侵襲的に採材可能な乳汁を分析することによる利点と考えられる。今年度の研究目的は、前年度が分娩後から妊娠初期までのデータが中心であったのに対し、妊娠初、中期から乾乳までの乳汁中の性ステロイドホルモンの動態を調査することである。また、飼養環境の性ステロイドホルモン濃度への影響を調査することである。経産牛グループでは、非繊維性炭水化物（NFC）に着目して、中程度給与区と低給与区を比較した。初産牛グループでは、第一胃非分解性蛋白質（CPu）含量を低下させた群と標準給与区を比較した。適正なNFCは、適正なCP給与下において、ルーメン発酵のエネルギー源が確保されていることになる。一方、低NFCは、エネルギー不足を起こし、第一胃内窒素源の効率的な利用に支障が出る危険性がある。低CPuは、適正なCPd（第一胃分解性蛋白質）が確保された条件下では、乳生産性への影響を与えることなく環境への窒素負荷を低減することが期待されている。

研究の方法

本研究遂行のための生乳は、上記共同研究に参画している延べ12県計60頭の乳牛（すべてホルスタイン種）から得た。分娩後2週間経過時から受胎確認までは週3回、受胎確認後から乾乳開始までは週1回採材した後、当研究室に冷凍の宅配便で配送された。実験開始前に、当研究室から各県の担当者に採材用サンプル容器1本当たり約0.12gのアジ化ナトリウムを入れた滅菌済み50mLコニカルチューブ（前半はポリスチレン製、後半はポリプロピレン製）に配送しておいた。採材に当たっては、生乳40mLを上記のアジ化ナトリウム（最終濃度0.3%）入りサンプル容器に取り、軽く攪拌して速やかに凍結した。また、前搾り乳は採材対象としなかった。2011年2月8日現

在で、約6,000サンプルについて両ホルモン濃度の測定が終了した。

<測定系>

本研究では、一昨年度および昨年度と同様、生乳中ならびに血漿中の性ステロイドホルモン濃度を測定する手段として、時間分解蛍光免疫測定法（以下、TR-FIA）を選択した。この方法は、ユーロピウム（以下、Eu）を標識物質としたもので、ランタノイド金属の波長だけを測定するもので、簡便かつ高感度である。従来は、主としてラジオイムノアッセイ（RIA）やエンザイムノアッセイ（EIA）等の免疫測定法が用いられてきた。RIAは、放射性同位元素を標識物質として使用する高感度測定システムであるが、放射性同位元素を使用することから、被爆の危険性や施設管理などの面でデメリットも多い。また、EIAは、酵素を標識物質として用いており、RIAと比較し簡便ではあるが低感度という問題があった。

TR-FIAは非常に高感度であるので、サンプルから脂溶性物質を予め抽出しておく必要がないと推し量られたため、本研究では、すべてのサンプル分析に当たって、抽出操作を経ずに行う直接測定を採用した（測定の実際については、一昨年度の成果報告書に記載してあるので省略）。測定は2重測定を行い、変動係数が15%を越えた場合には、-30℃で保存しておいたサンプルを用いて再測定を行った。

使用した測定キットは、DELFI A Progesterone Reagents (R066-101) と DELFI A Estradiol Reagents (R056-101) であるが、家畜用にカスタマイズして使用した。96 well plateを用いて、マルチラベルリーダー（ARVO）により測定した。

結果および考察

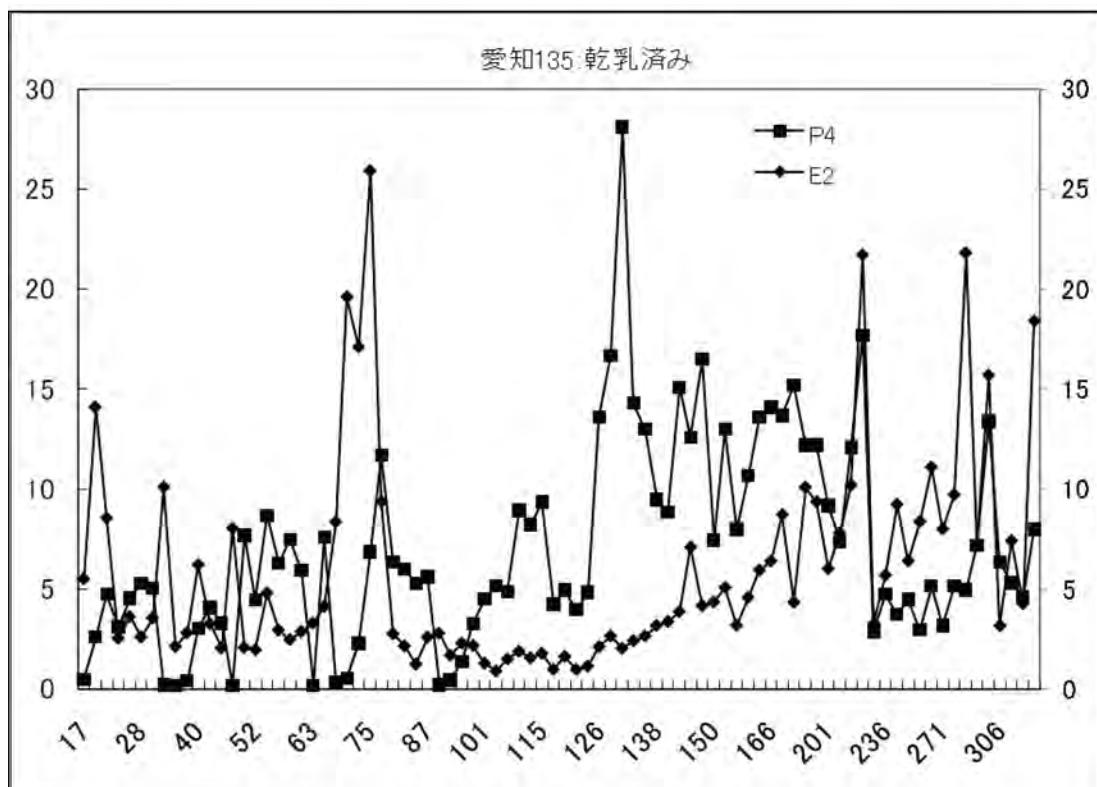
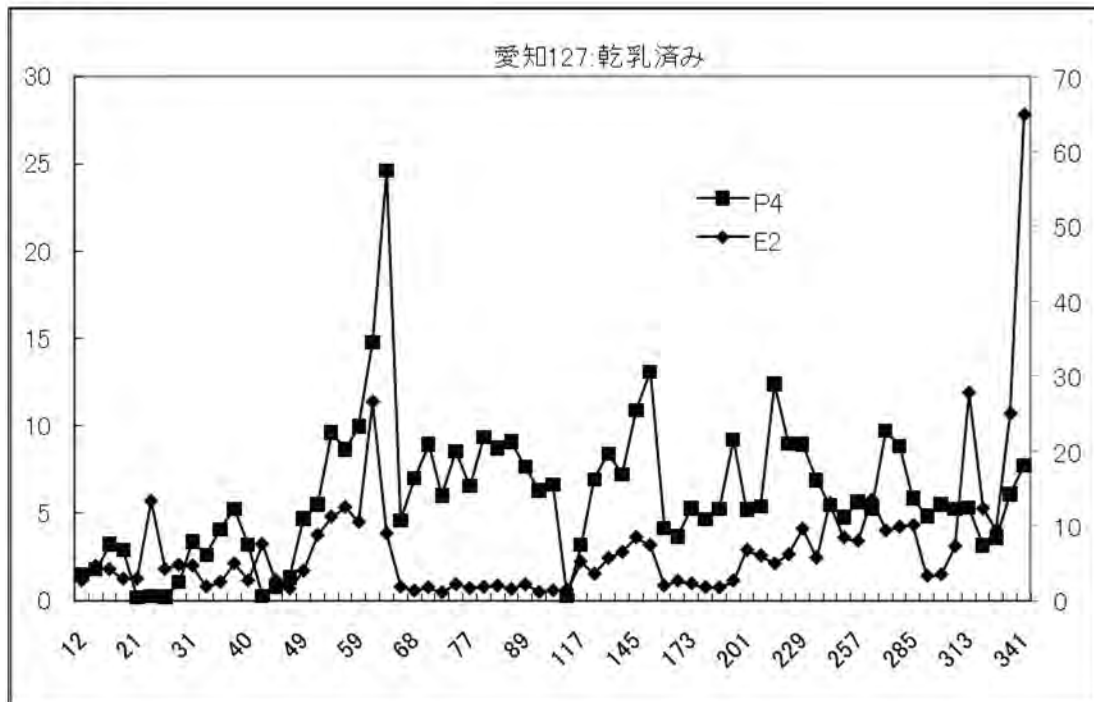
経産牛グループ供試牛（今回、データを採用した牛）26頭

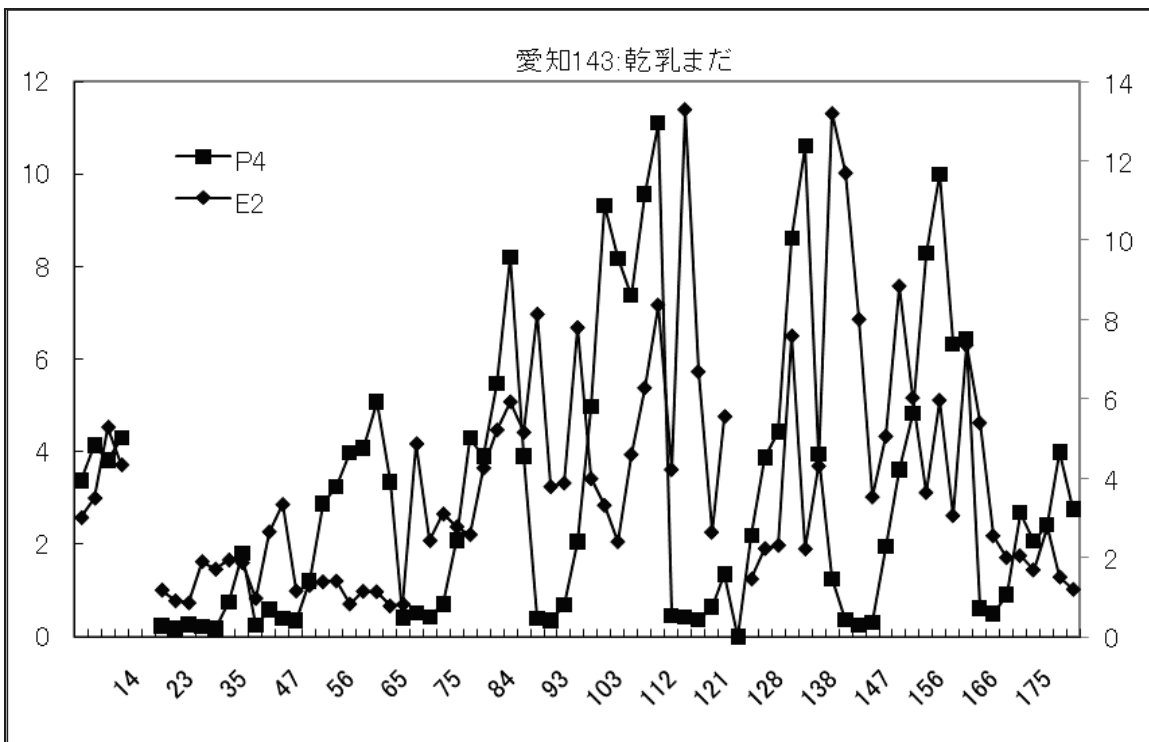
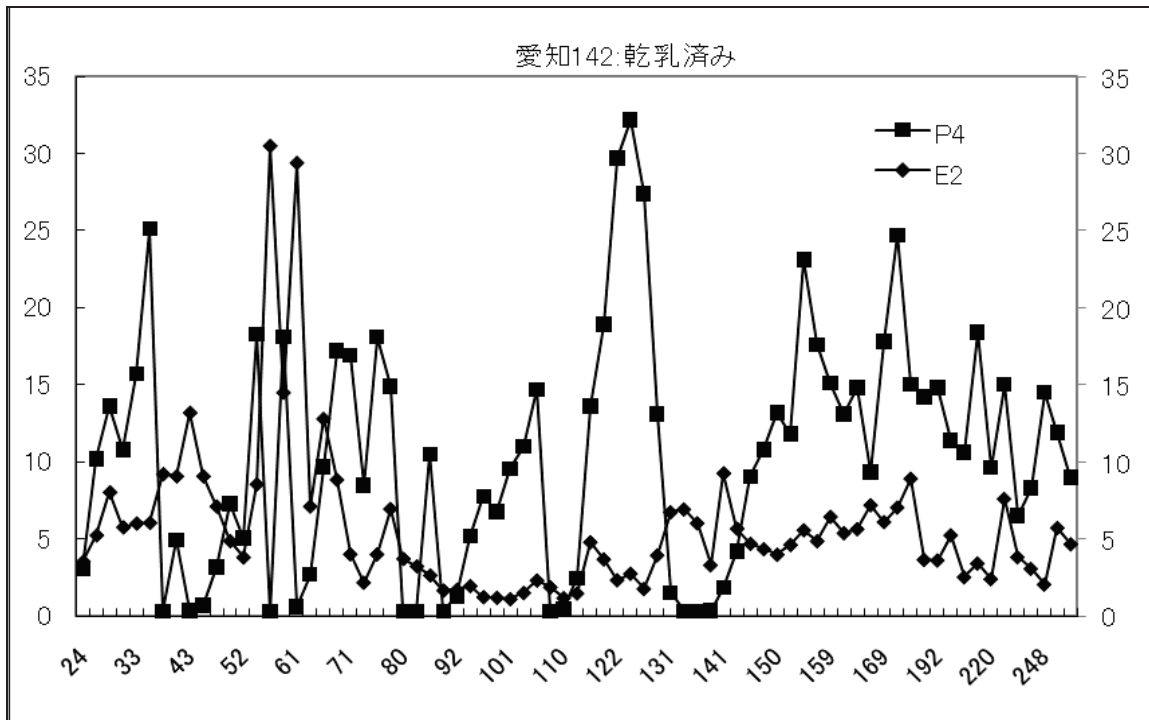
経産牛 G	中 NFC 区	低 NFC 区
愛知県	127, 135, 143	142
石川県	ビバー、ルト	デキスター、ライブリー、セルティック
茨城県	ベルサイ、カ、	ルビー、アソニン、レンソ
神奈川県	141, 143	140, 142
千葉県	42	67
富山県	124, 133, 141	125, 140, 142

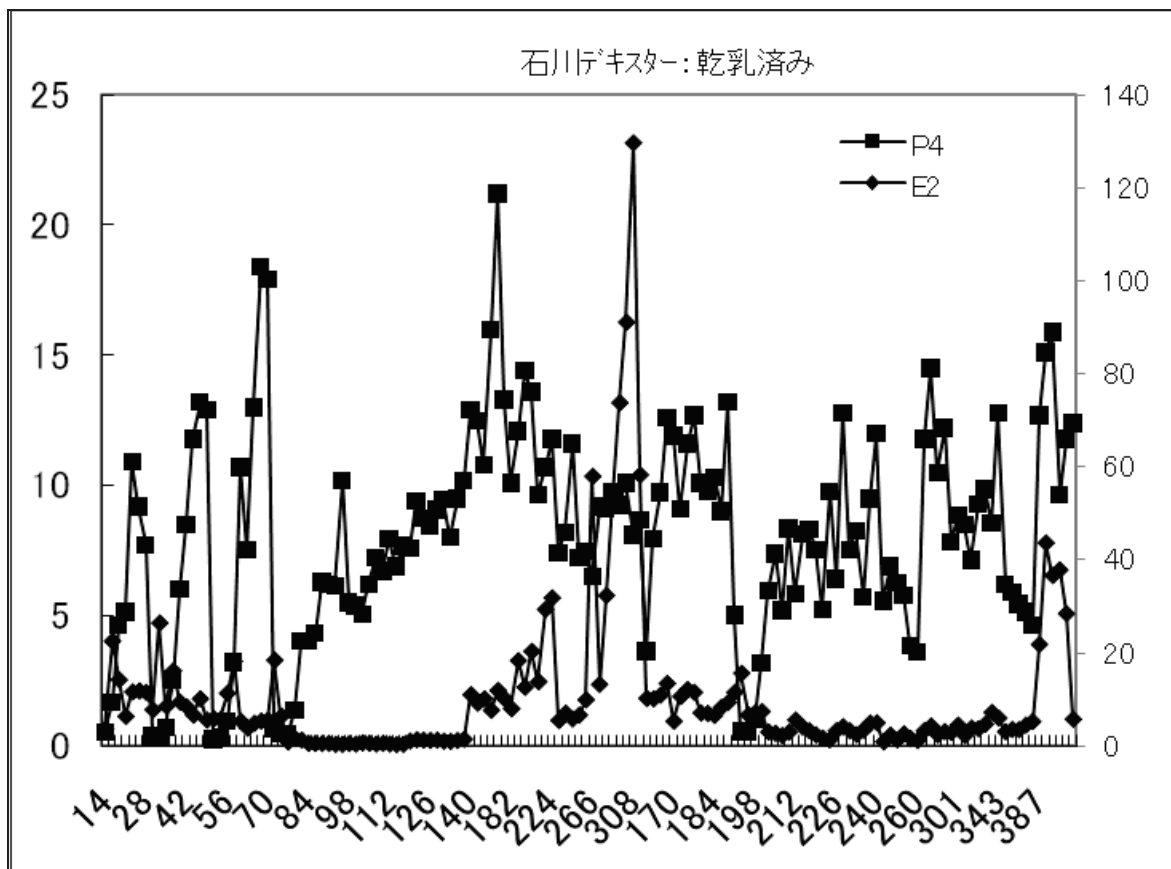
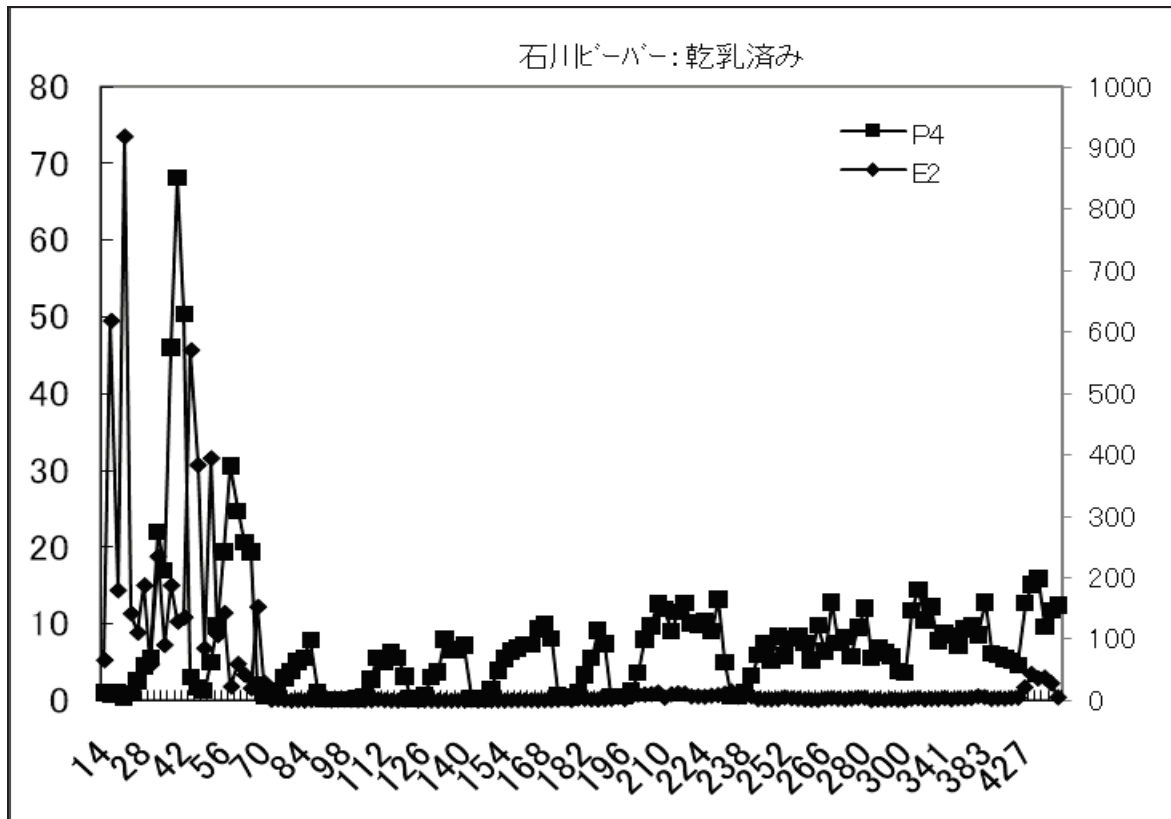
初産牛グループ供試牛（今回、データを採用した牛）24頭

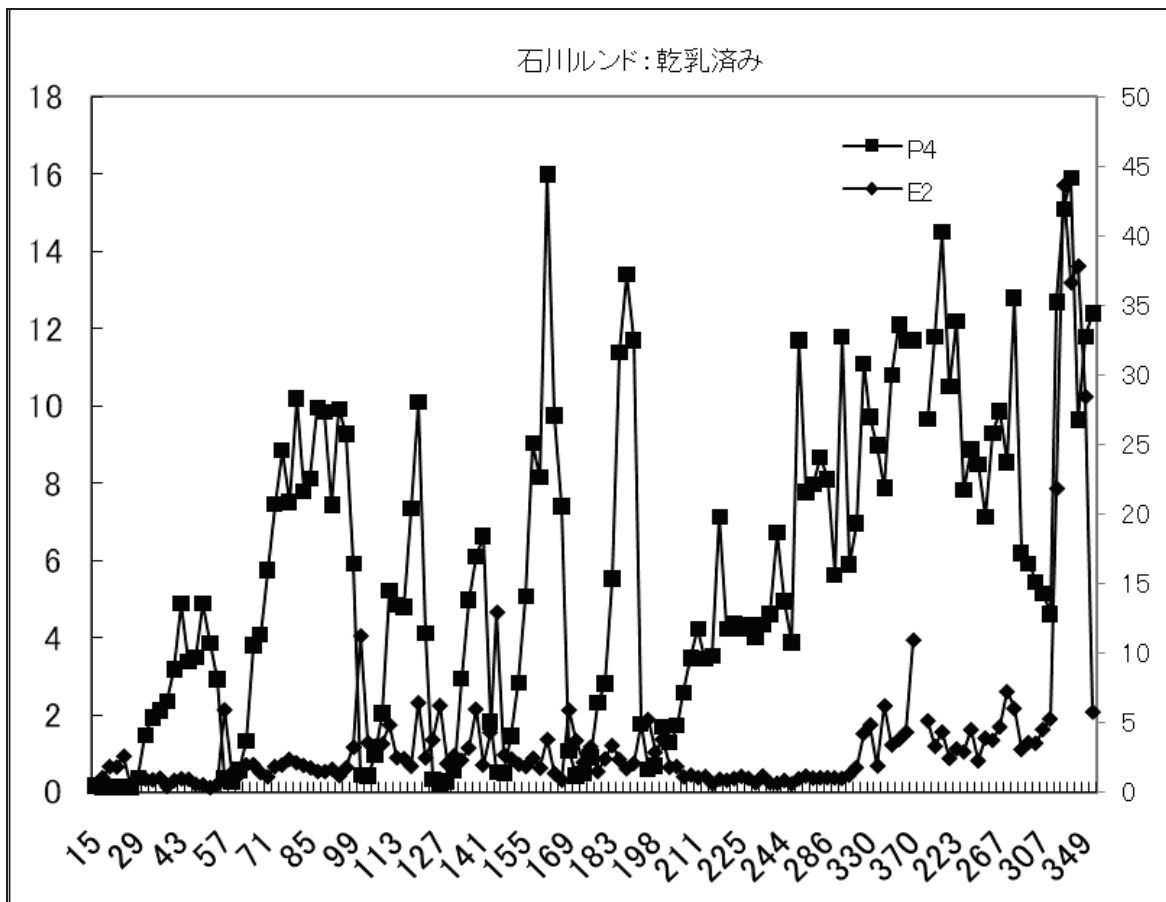
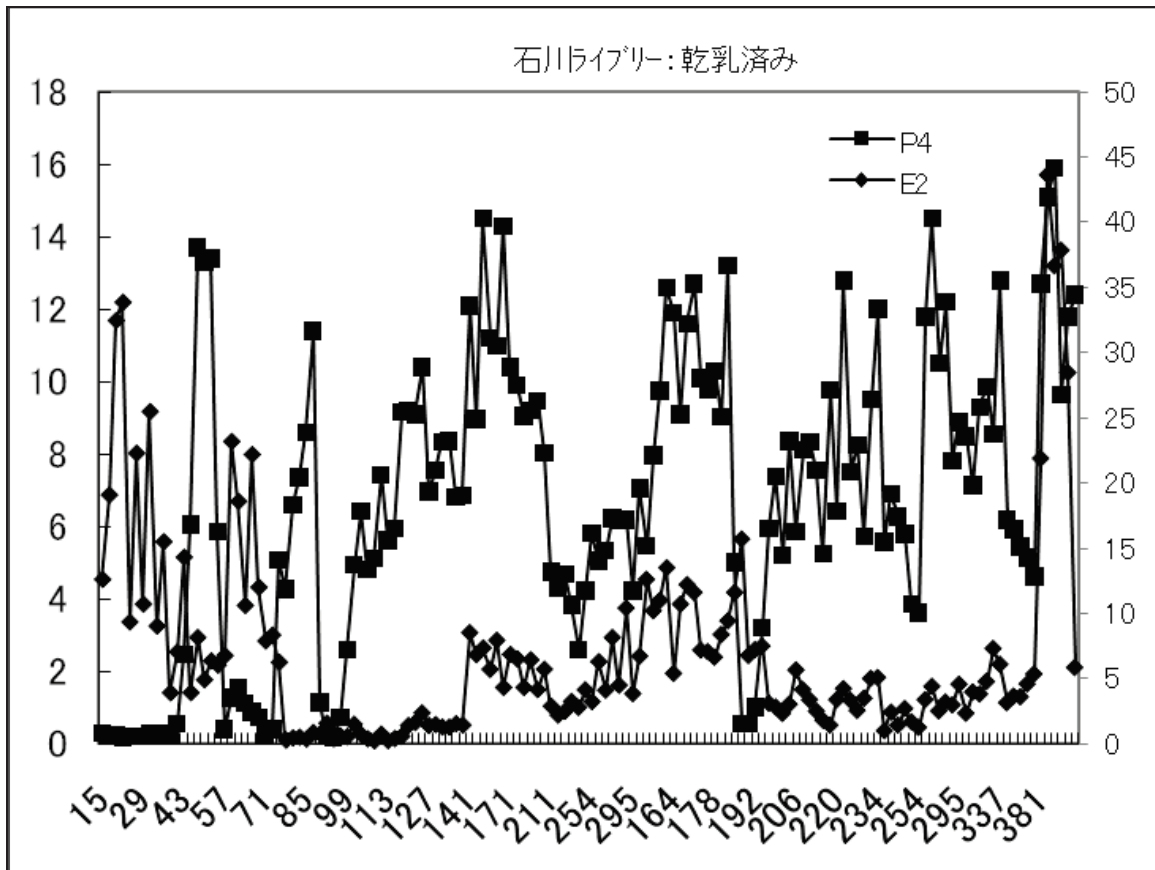
初産牛 G	標準 CPu	低 CPu
宮城県	131, 134	132, 133
福島県	231, 232	233, 234
茨城県	ライフ、モンブラン	リトル、パースワート
埼玉県	431, 432	433, 434
岐阜県	731, 732	733, 734
熊本県	931, 932	933, 934

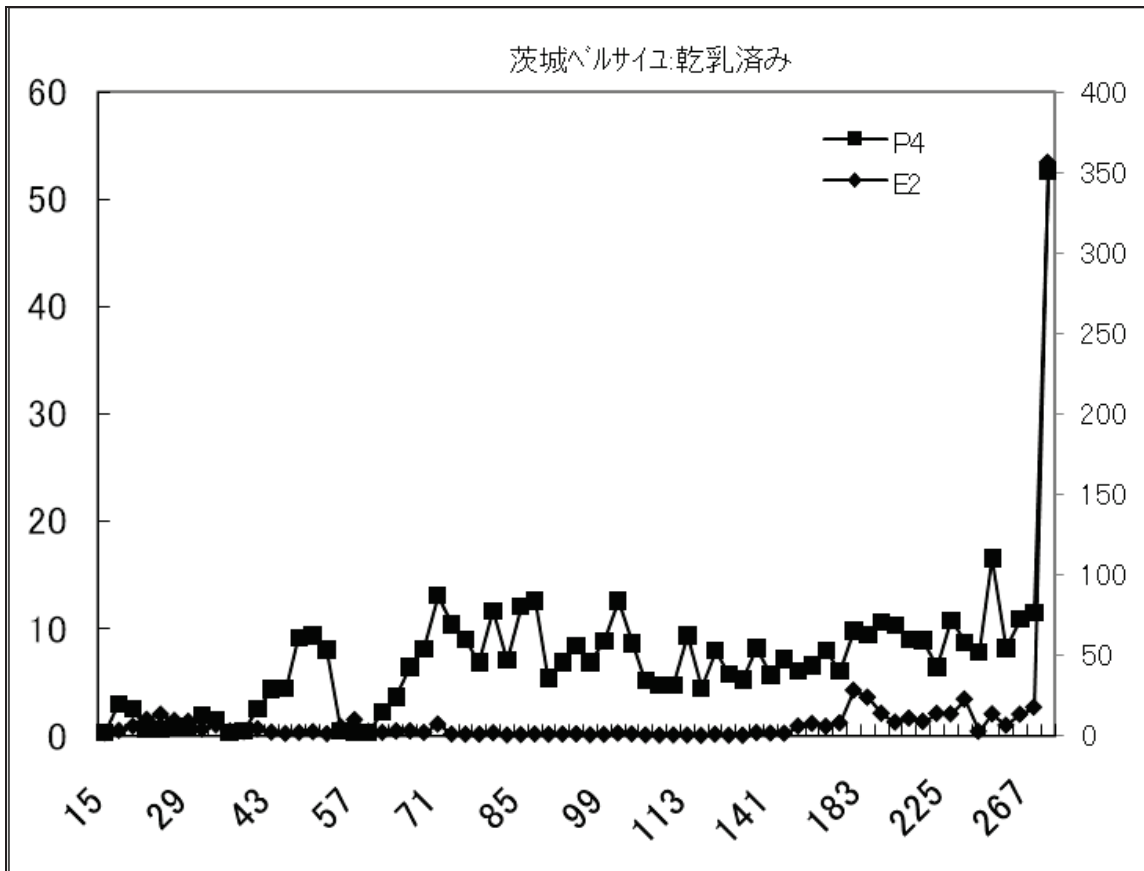
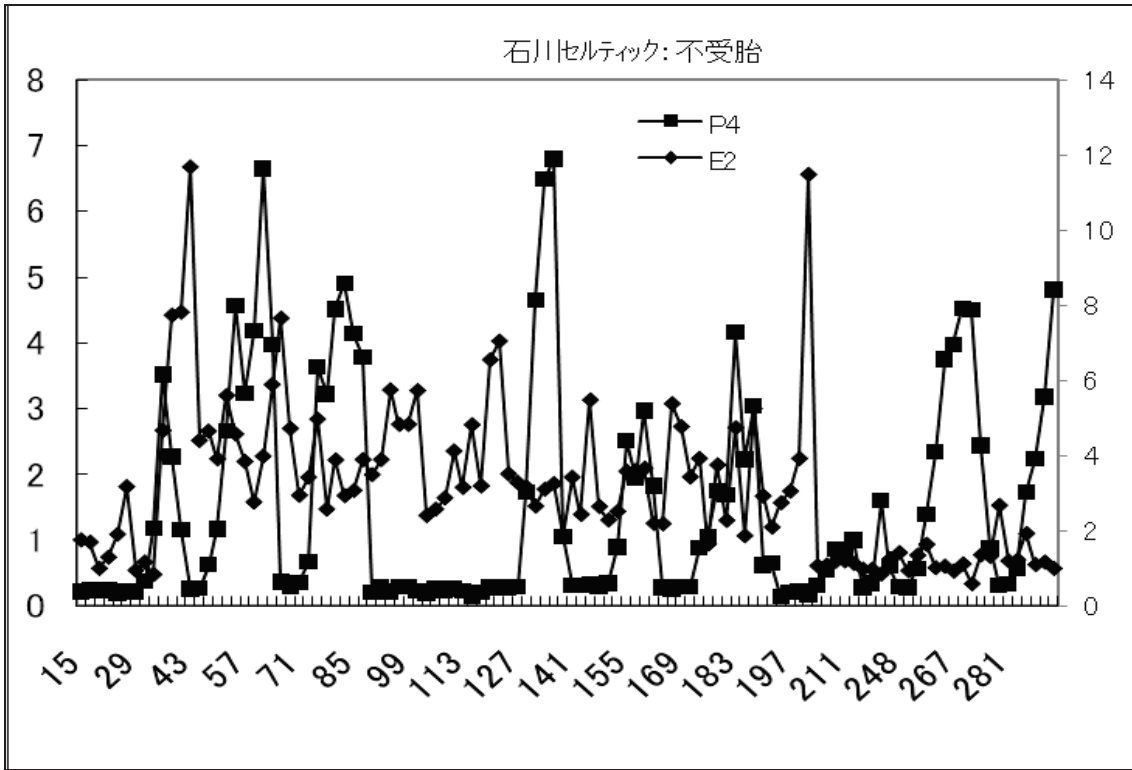
<経産牛>

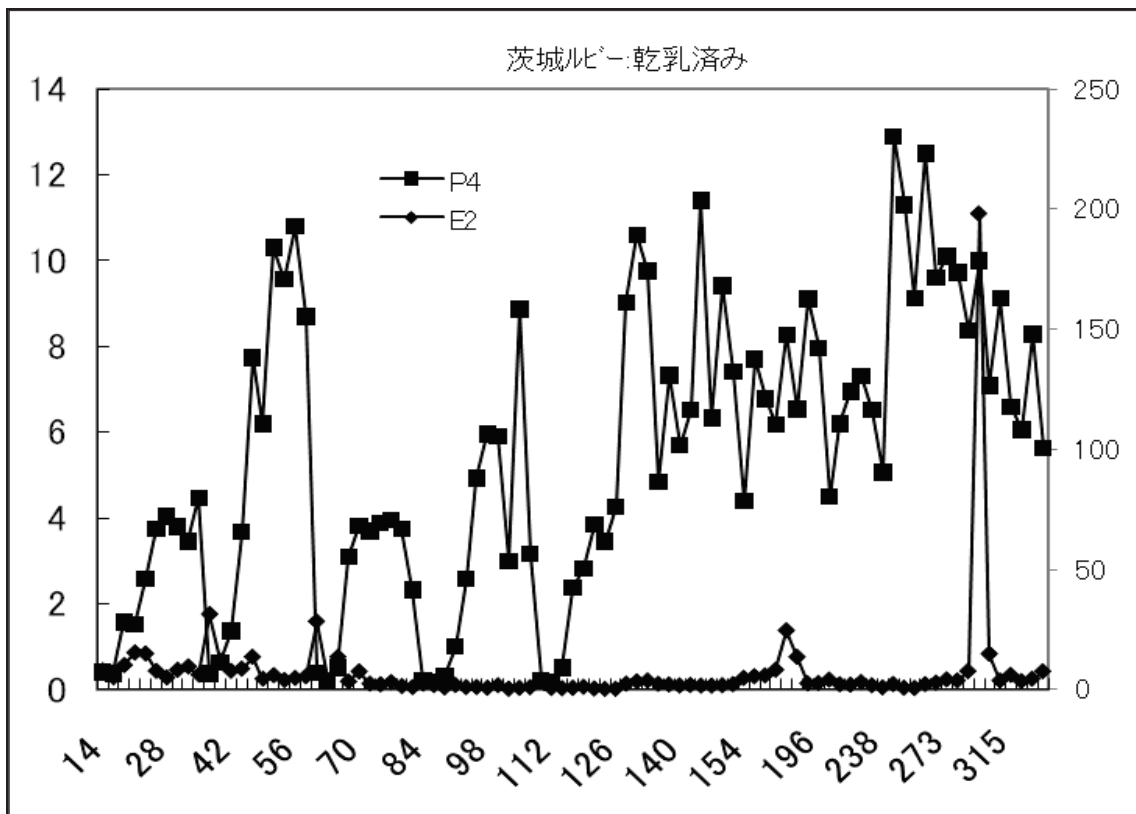
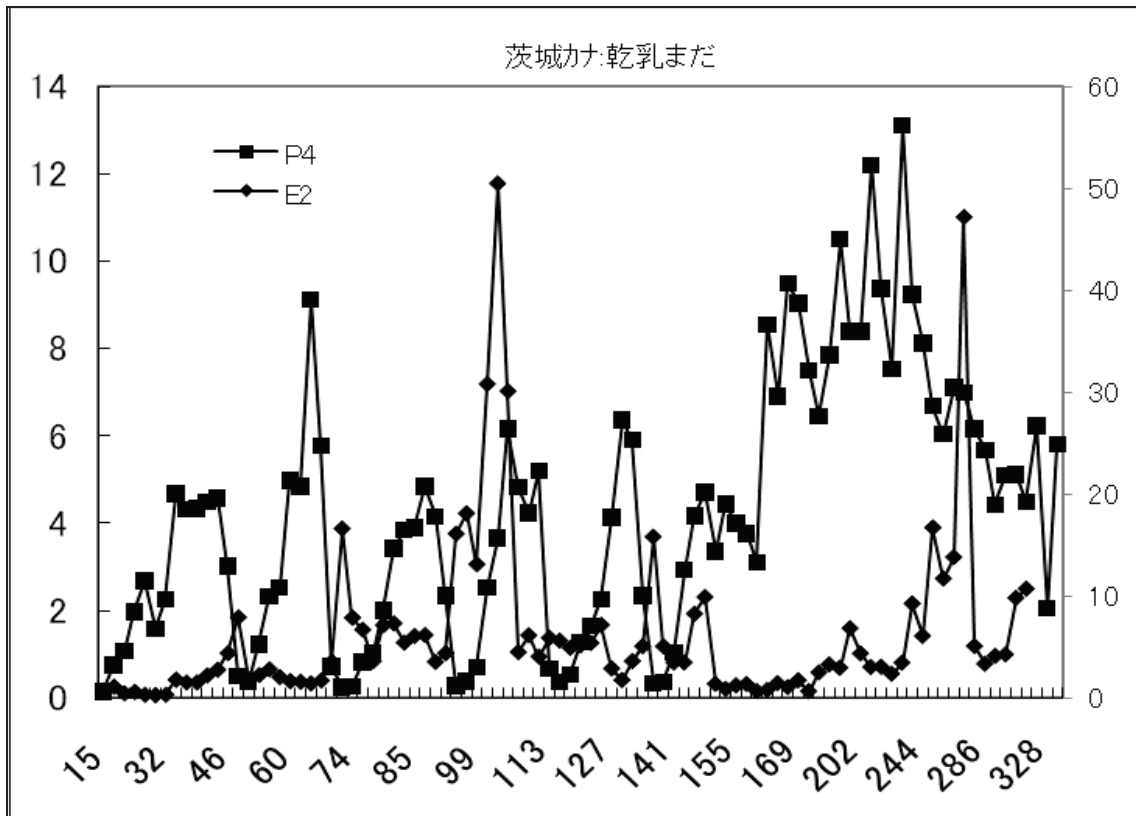


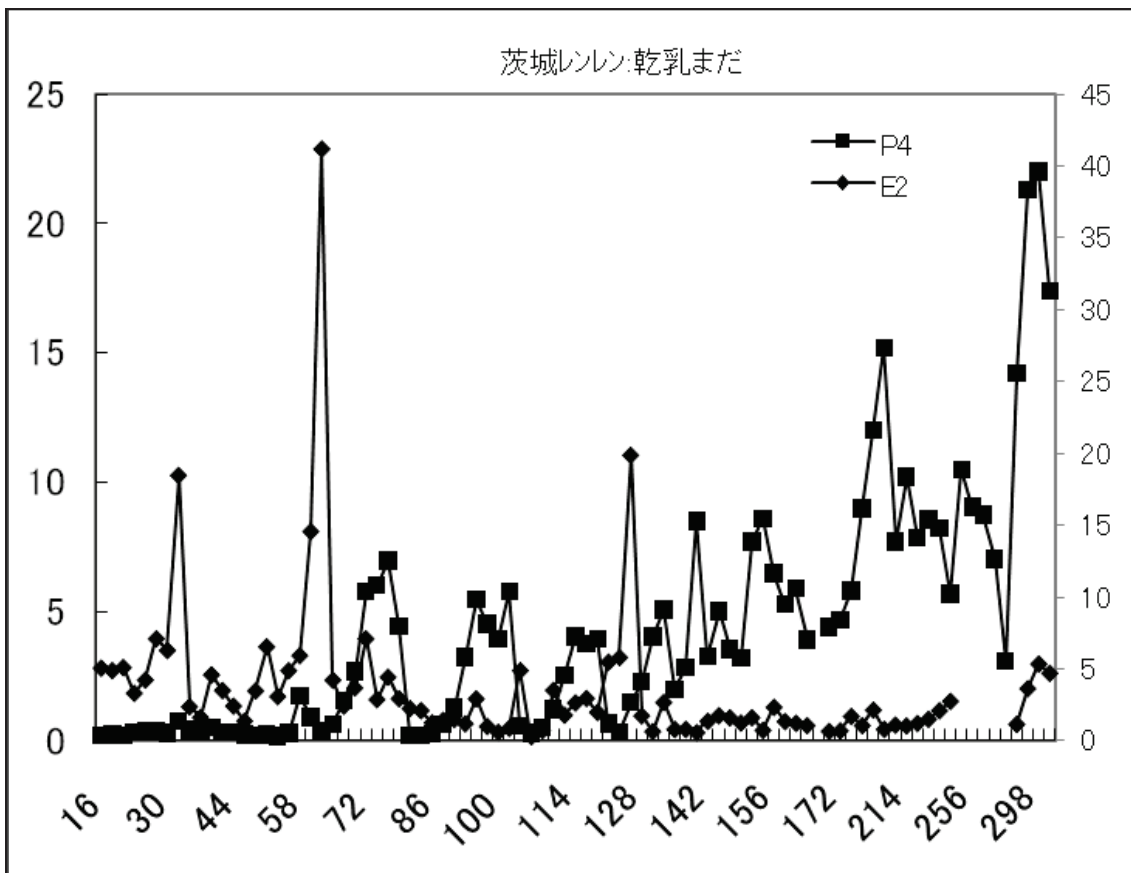
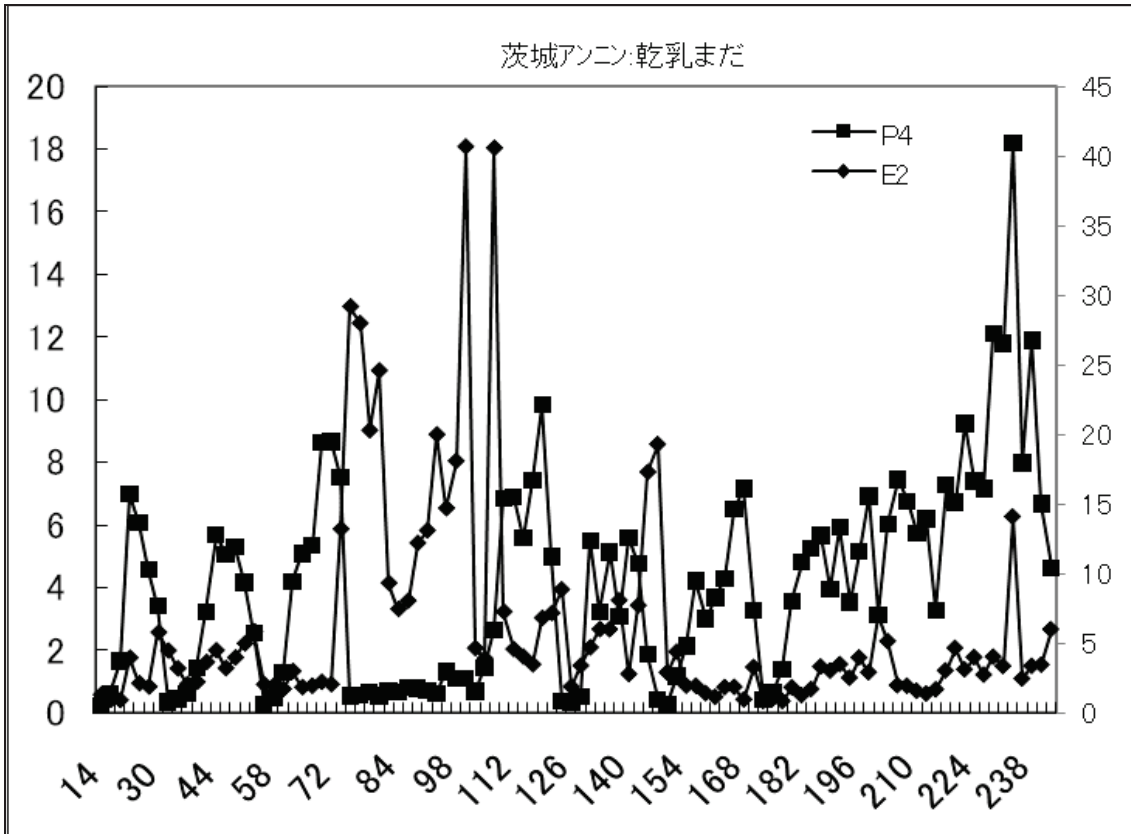


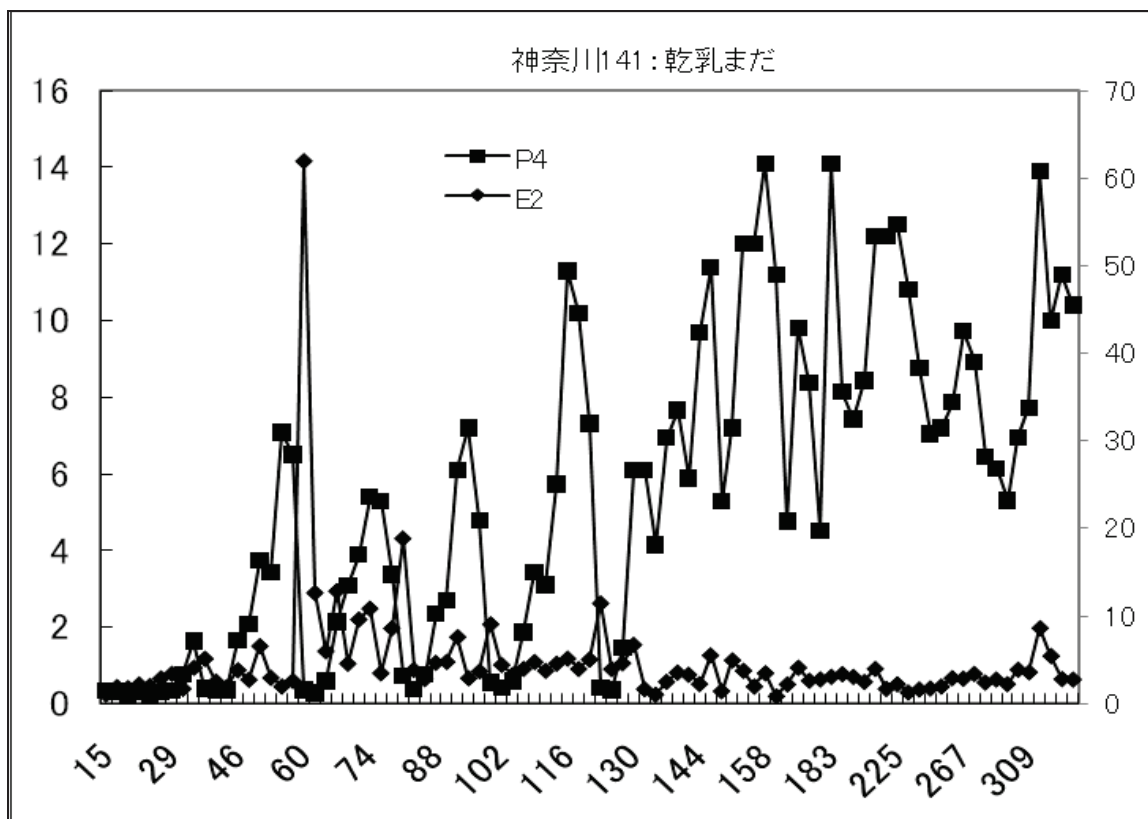
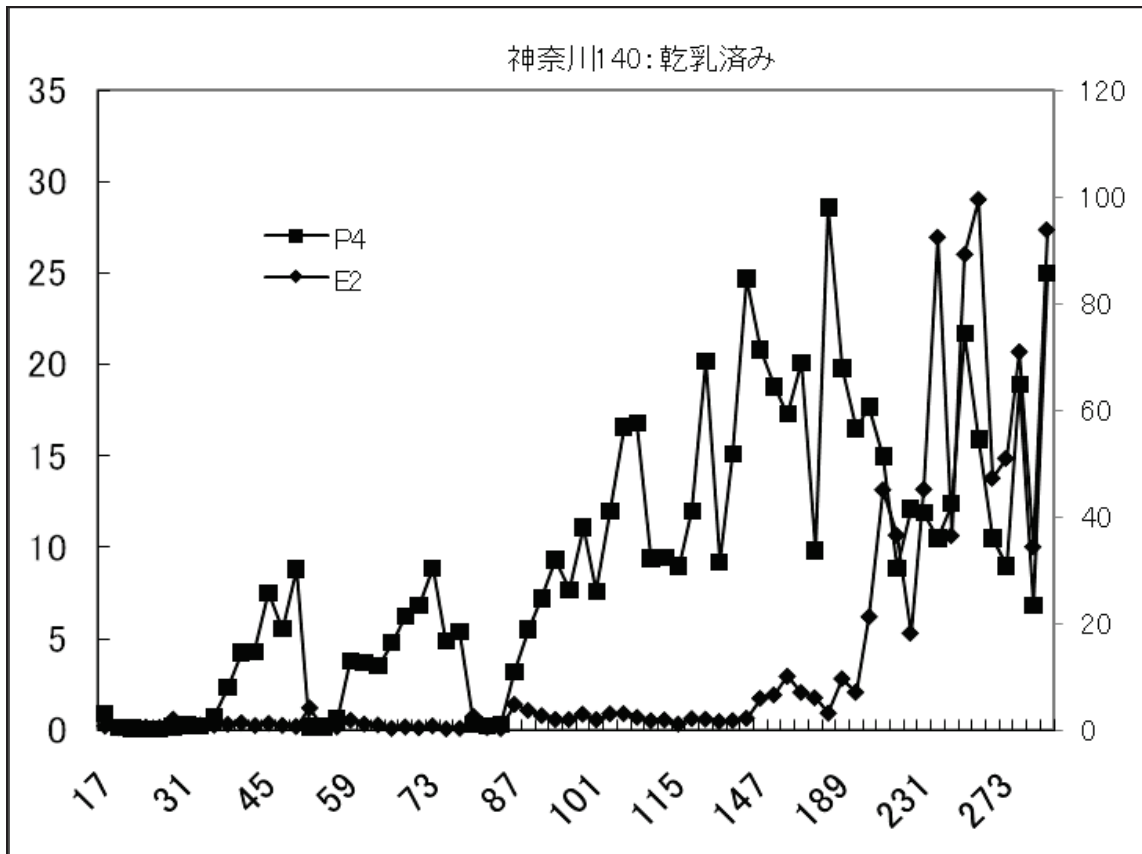


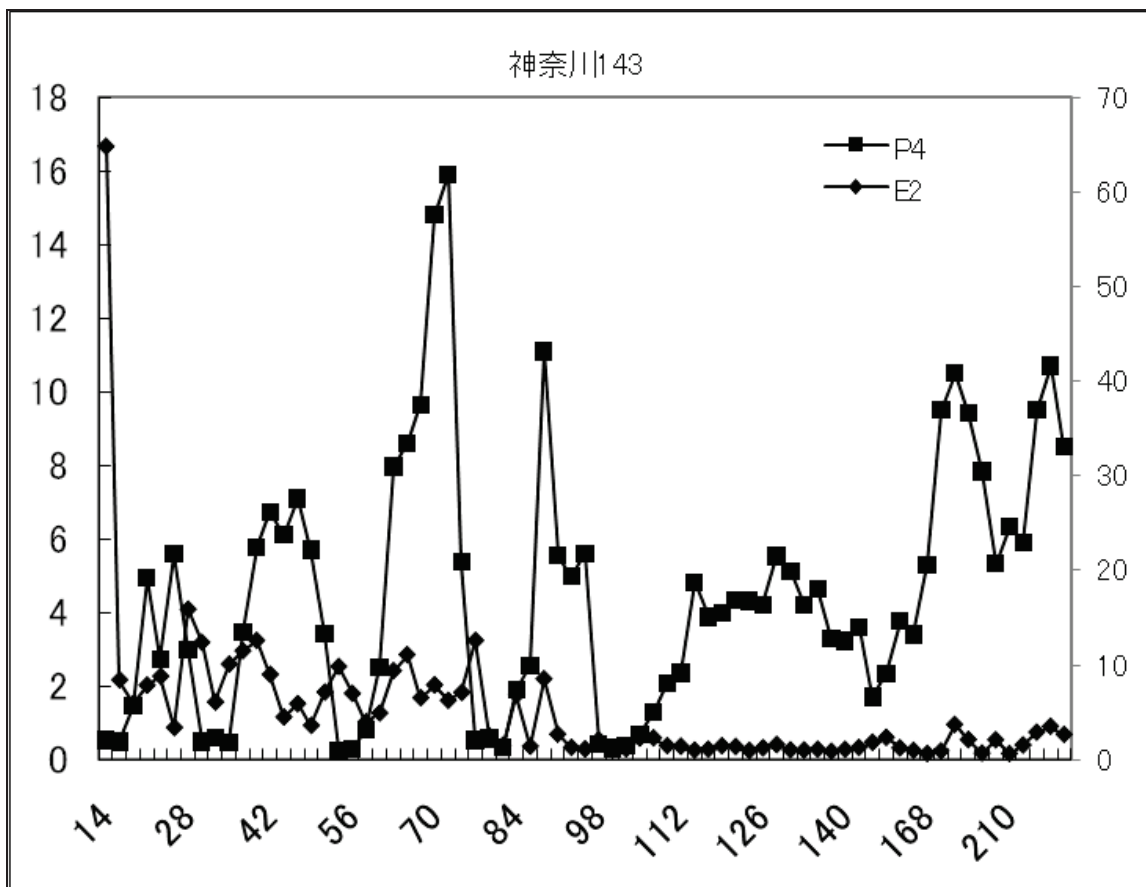
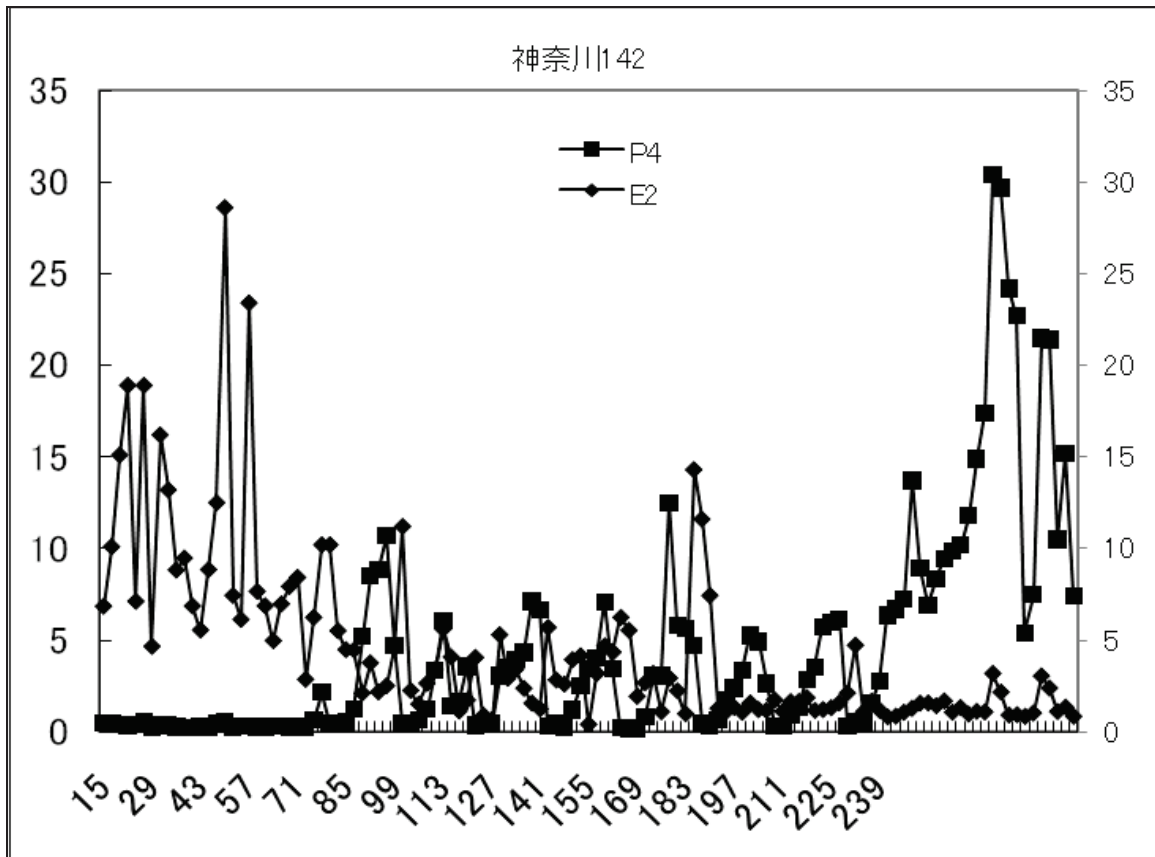


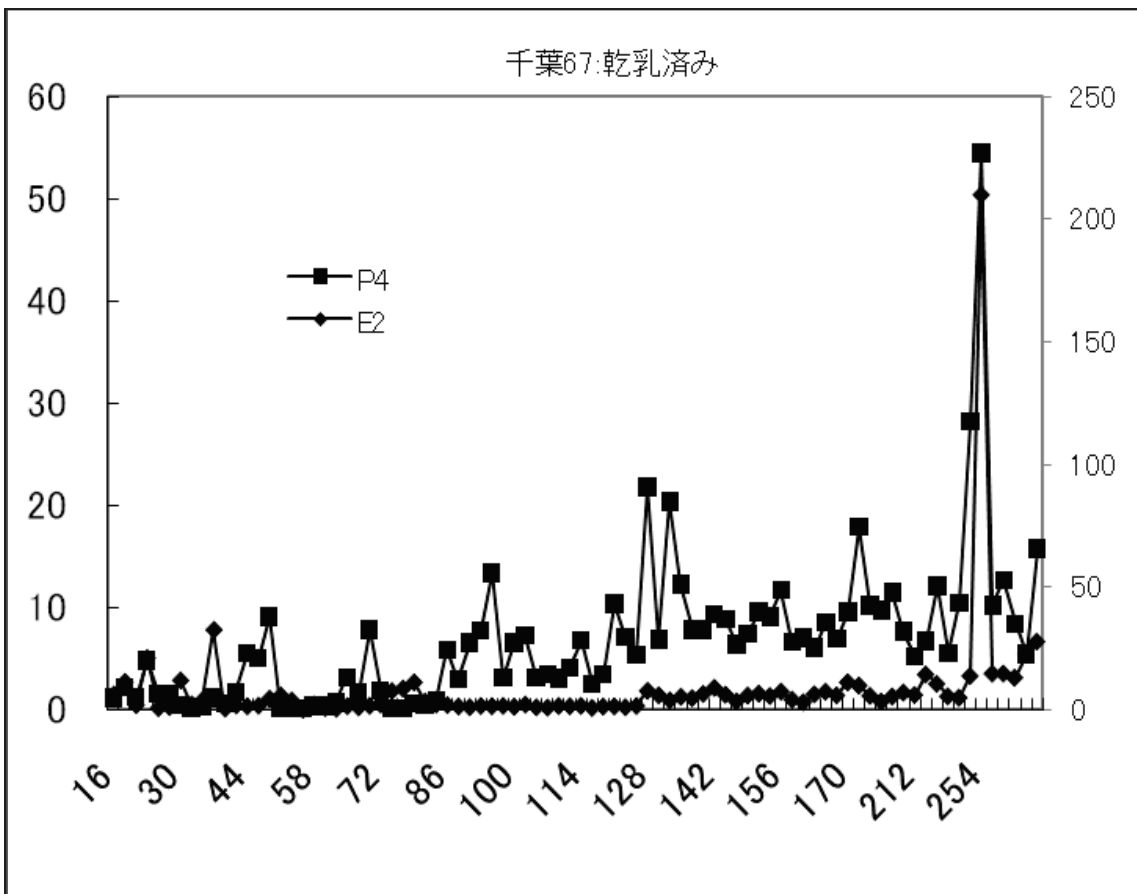
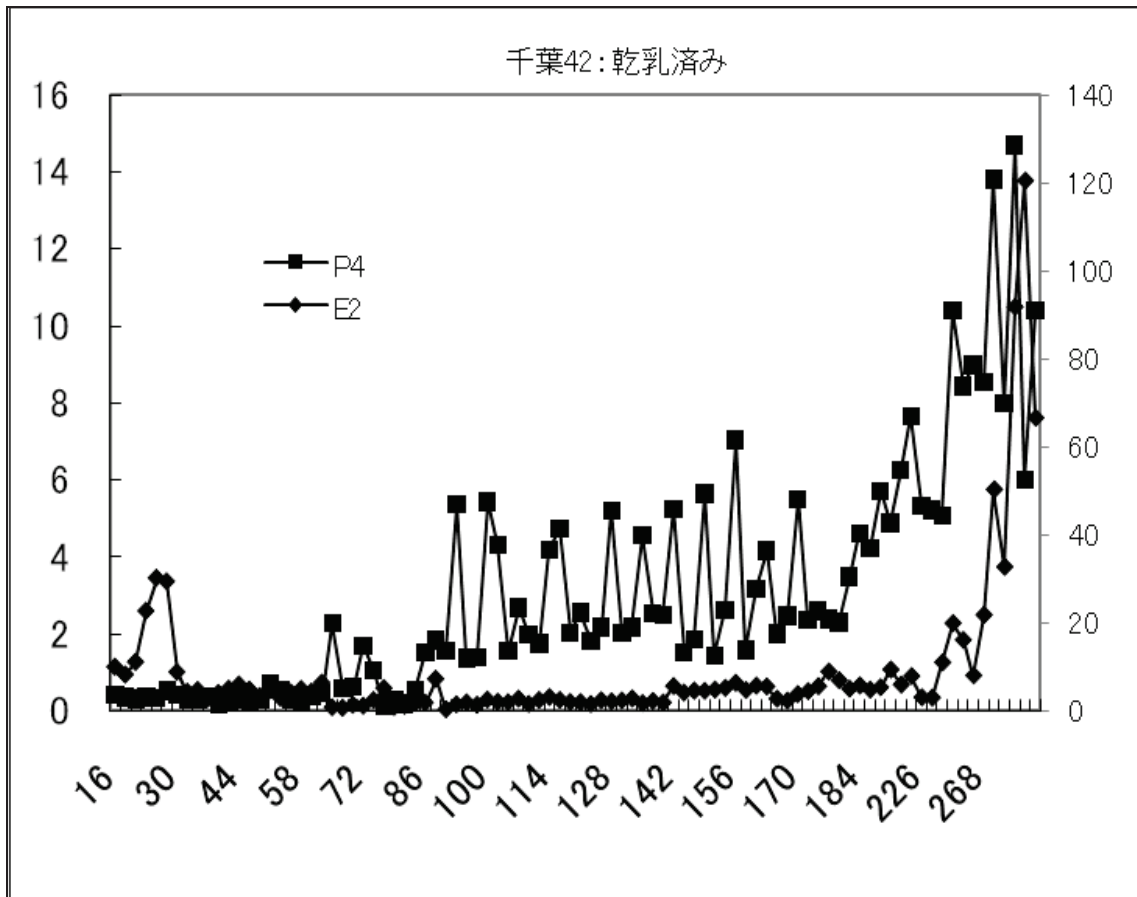


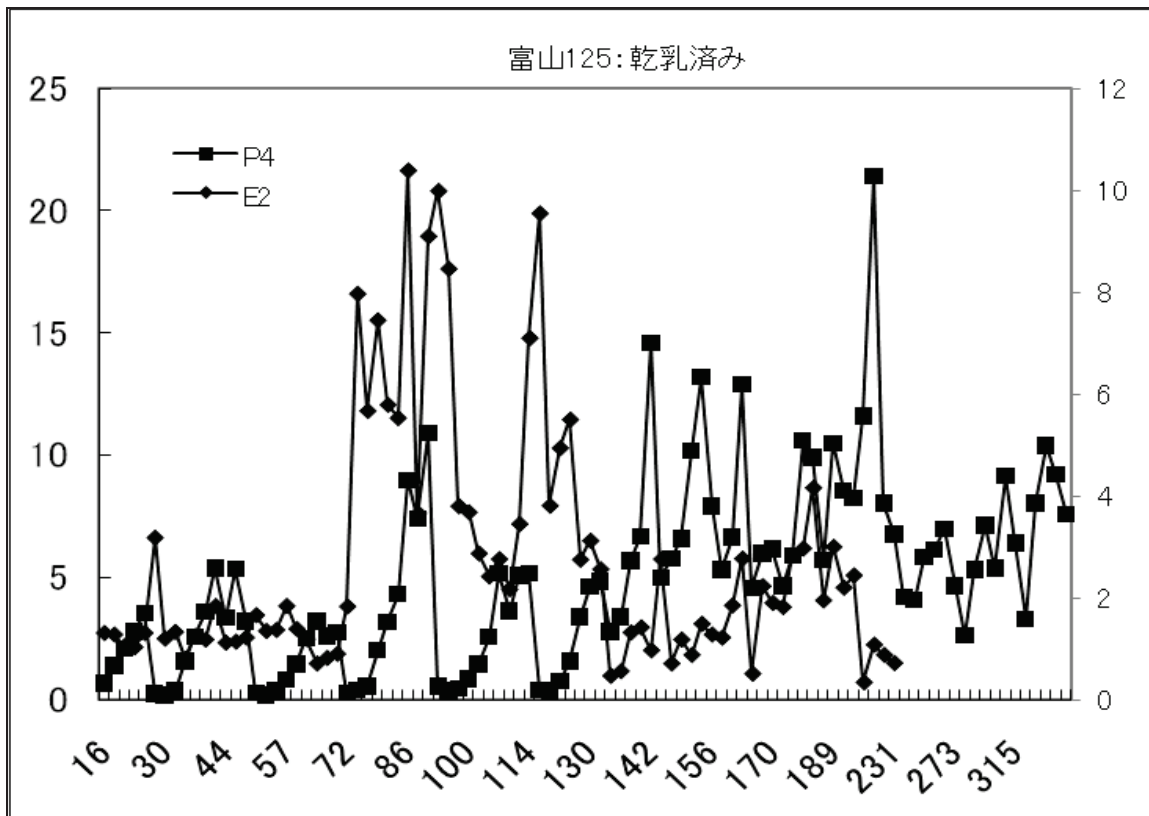
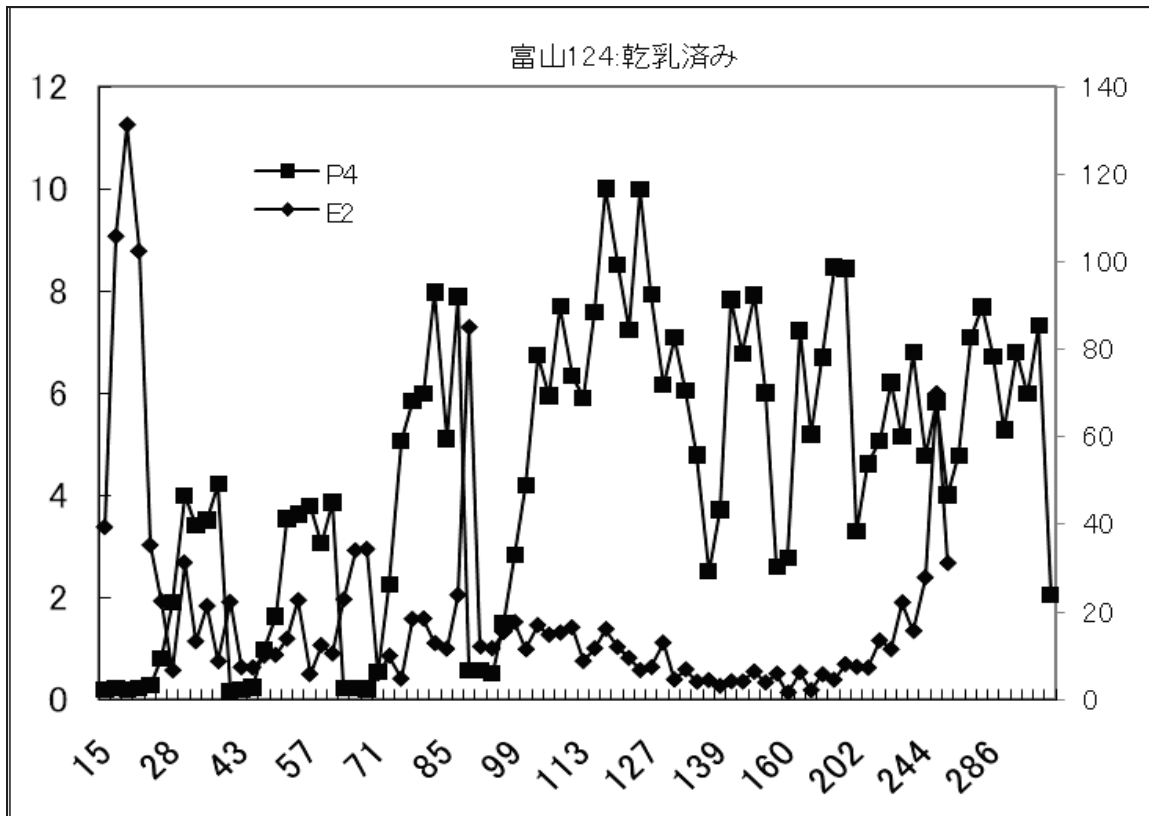


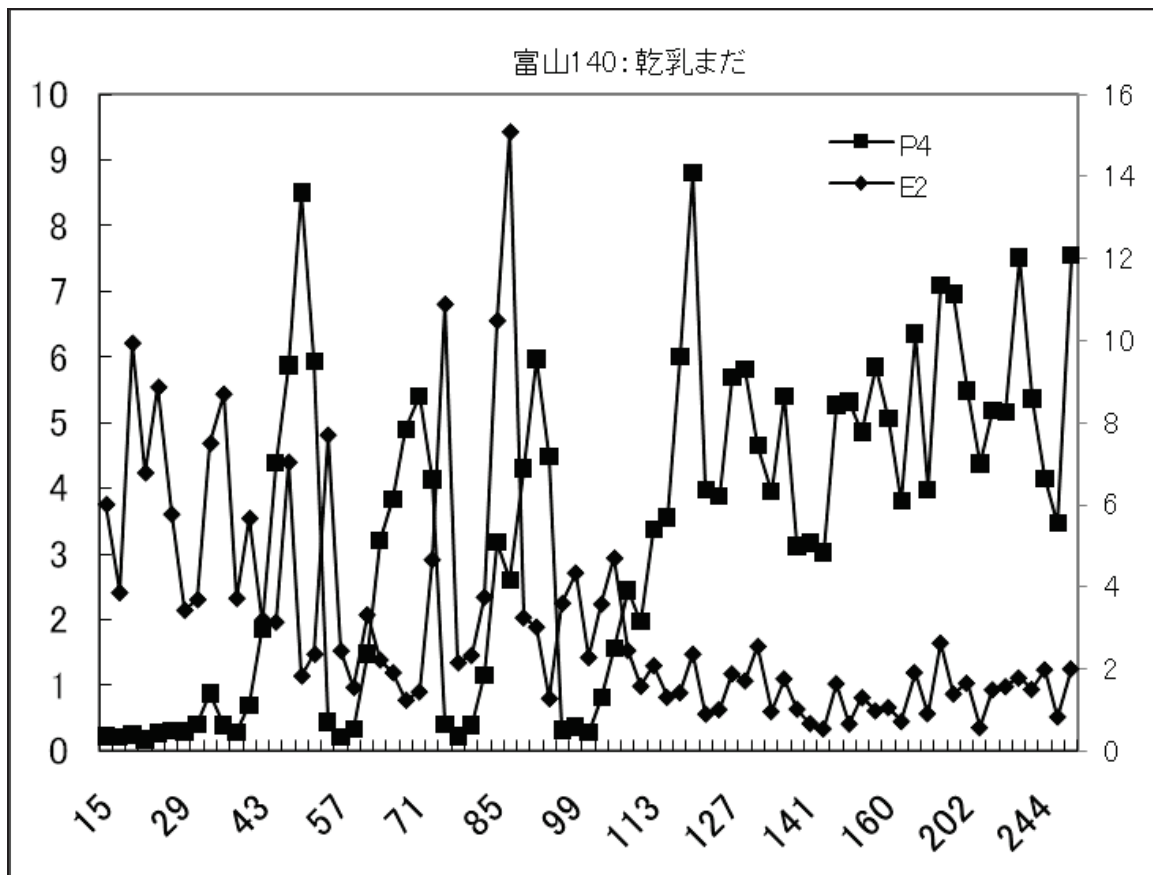
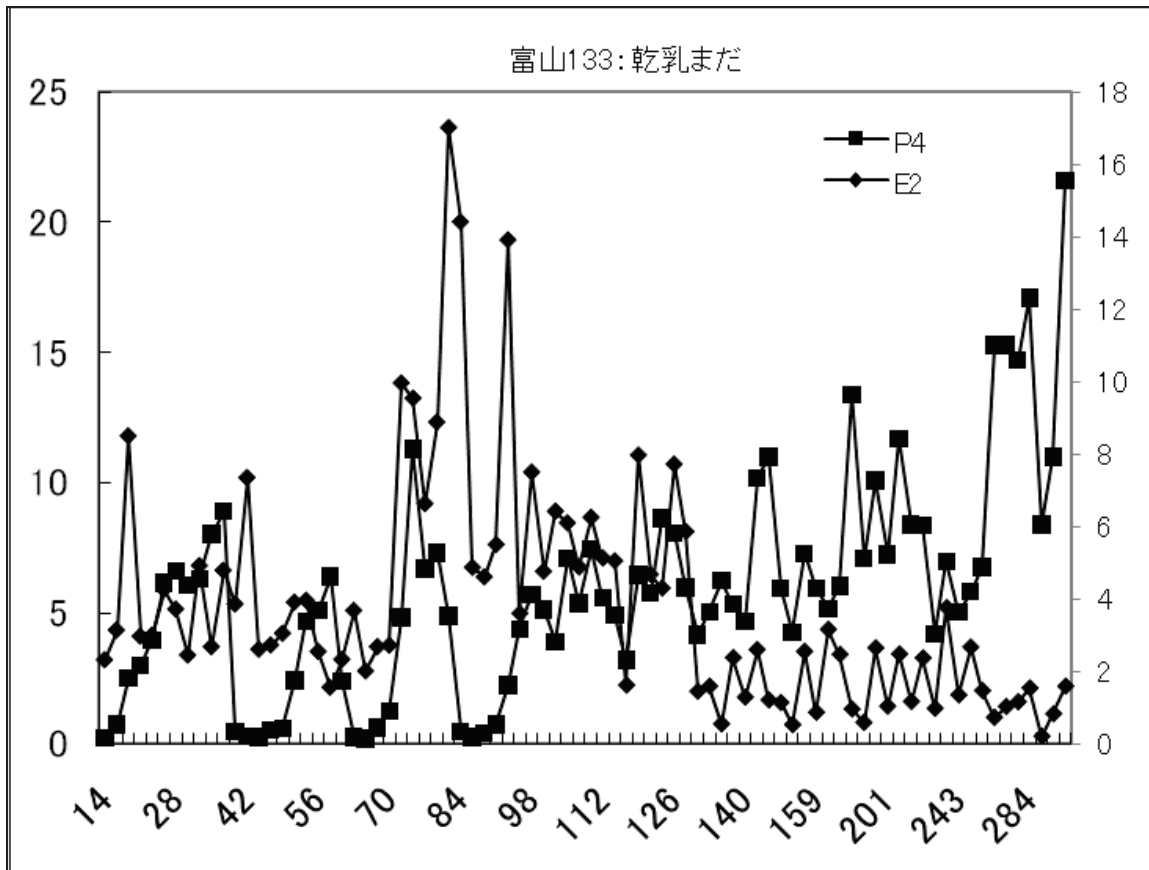


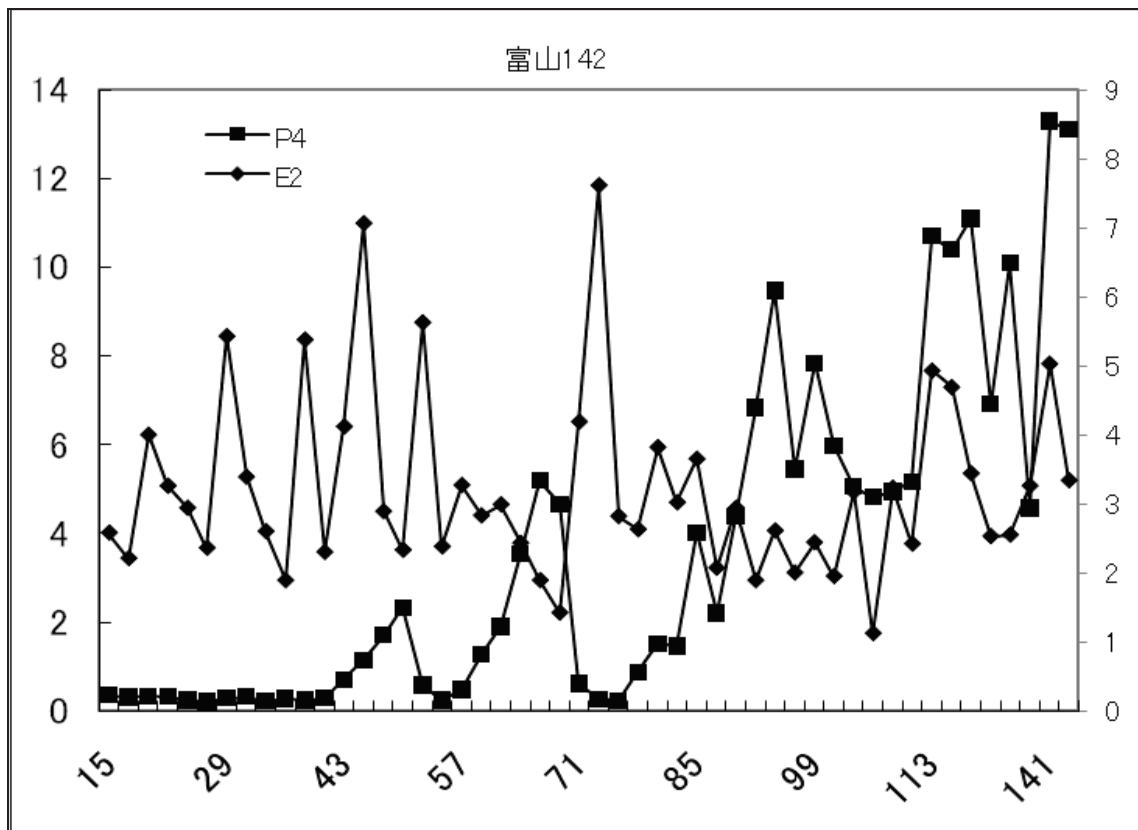
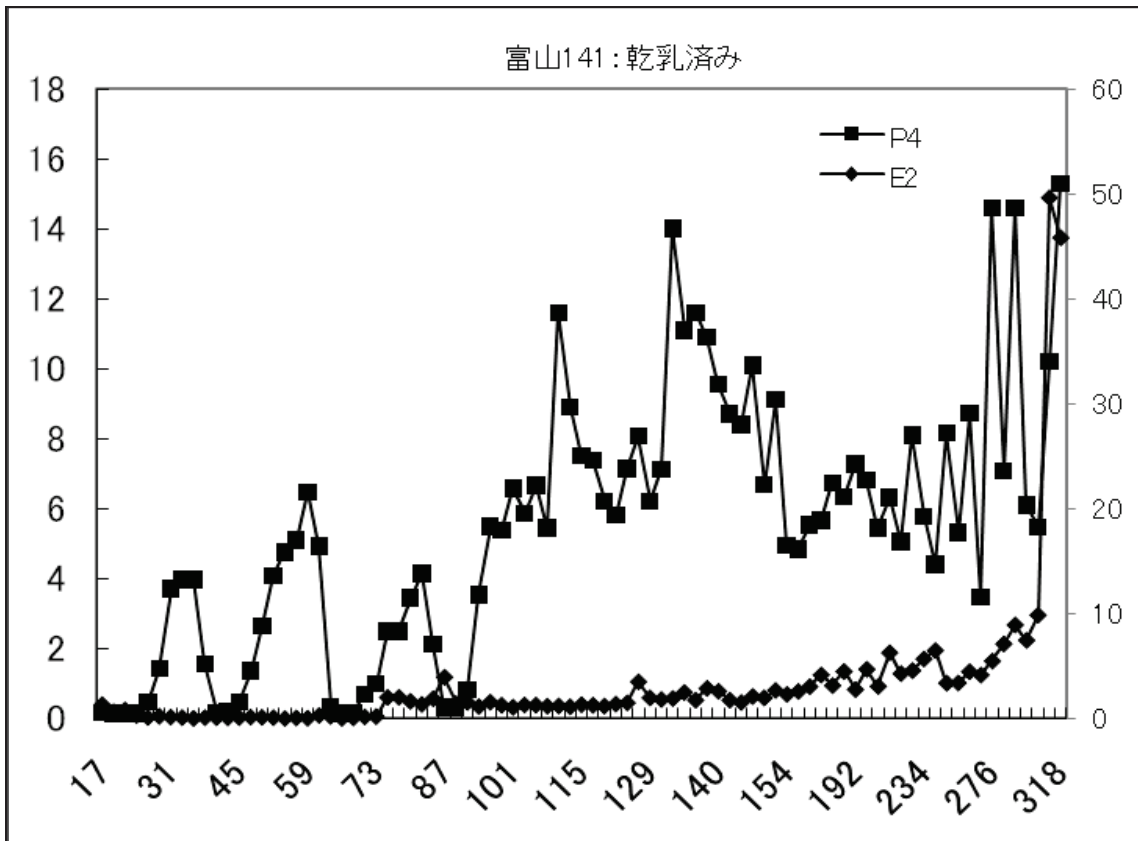




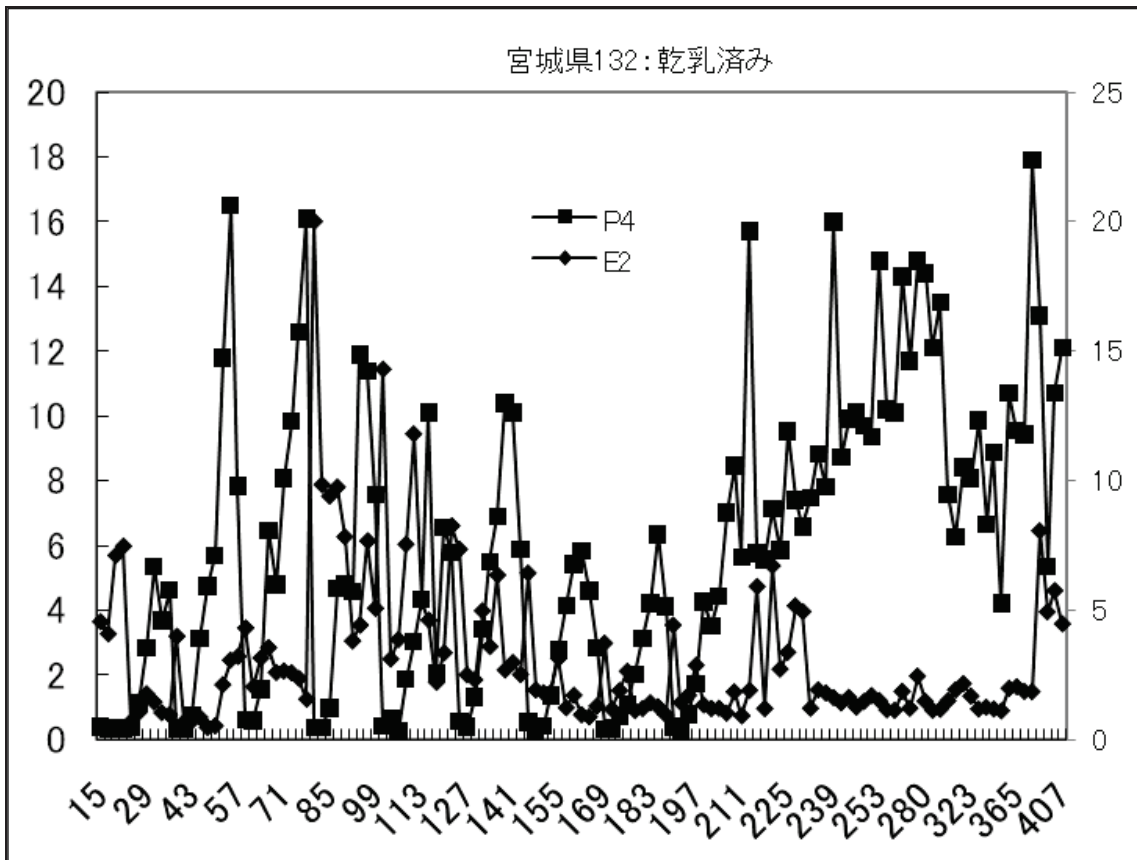
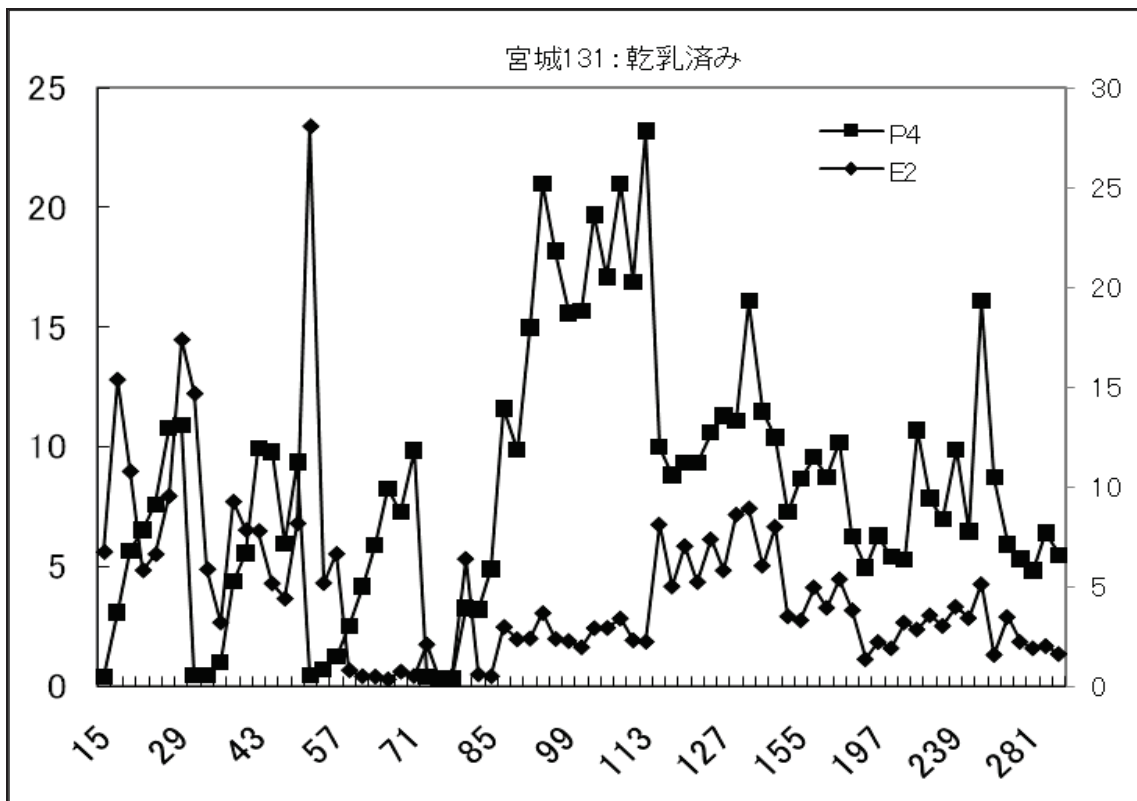


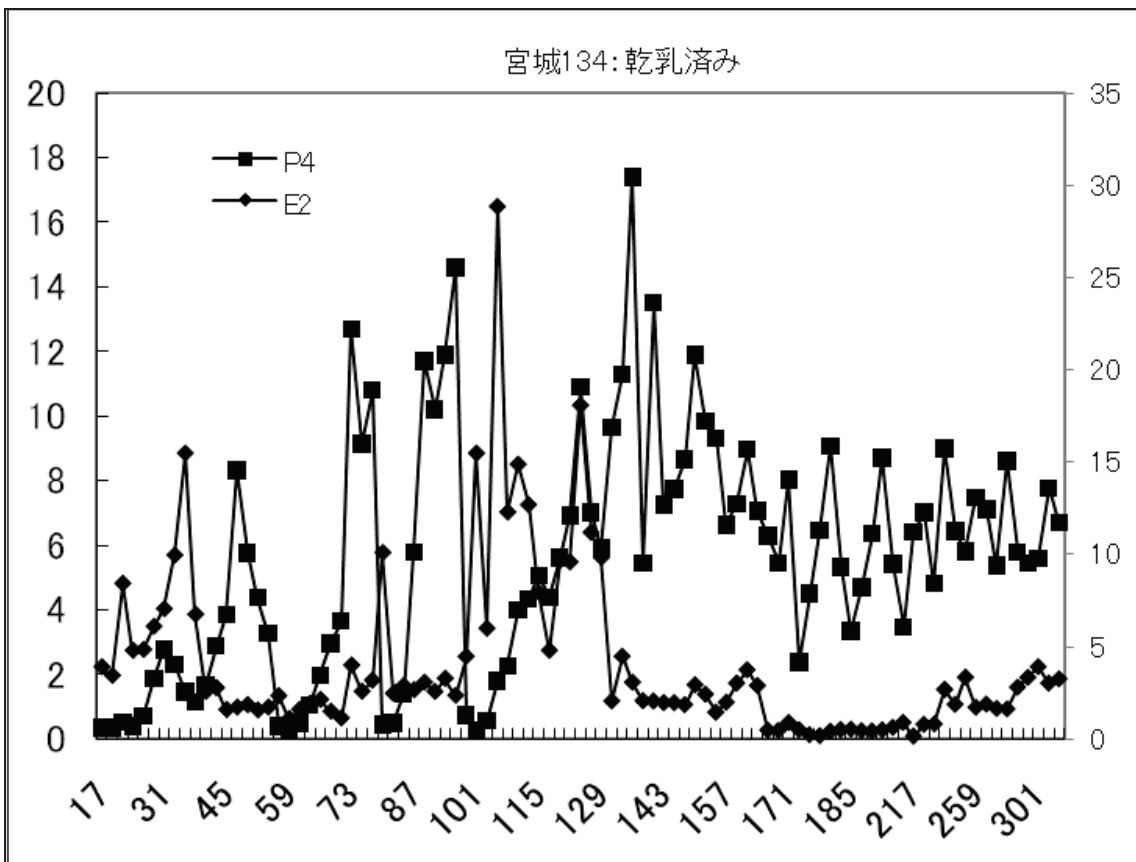
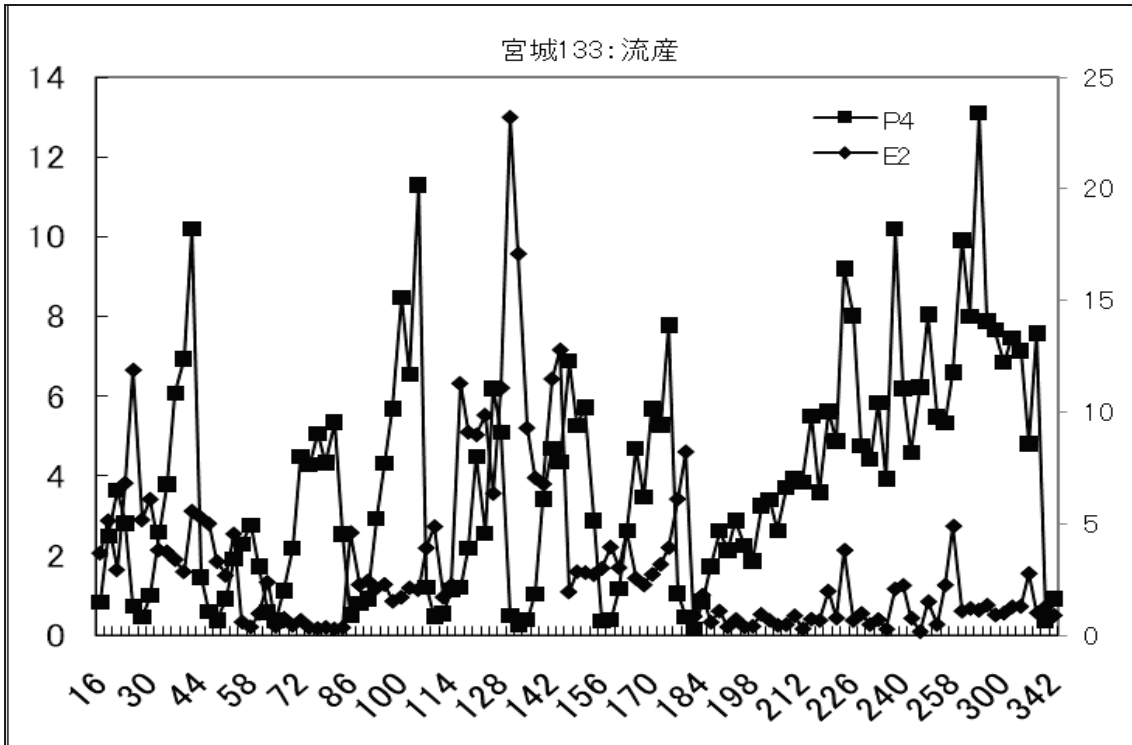


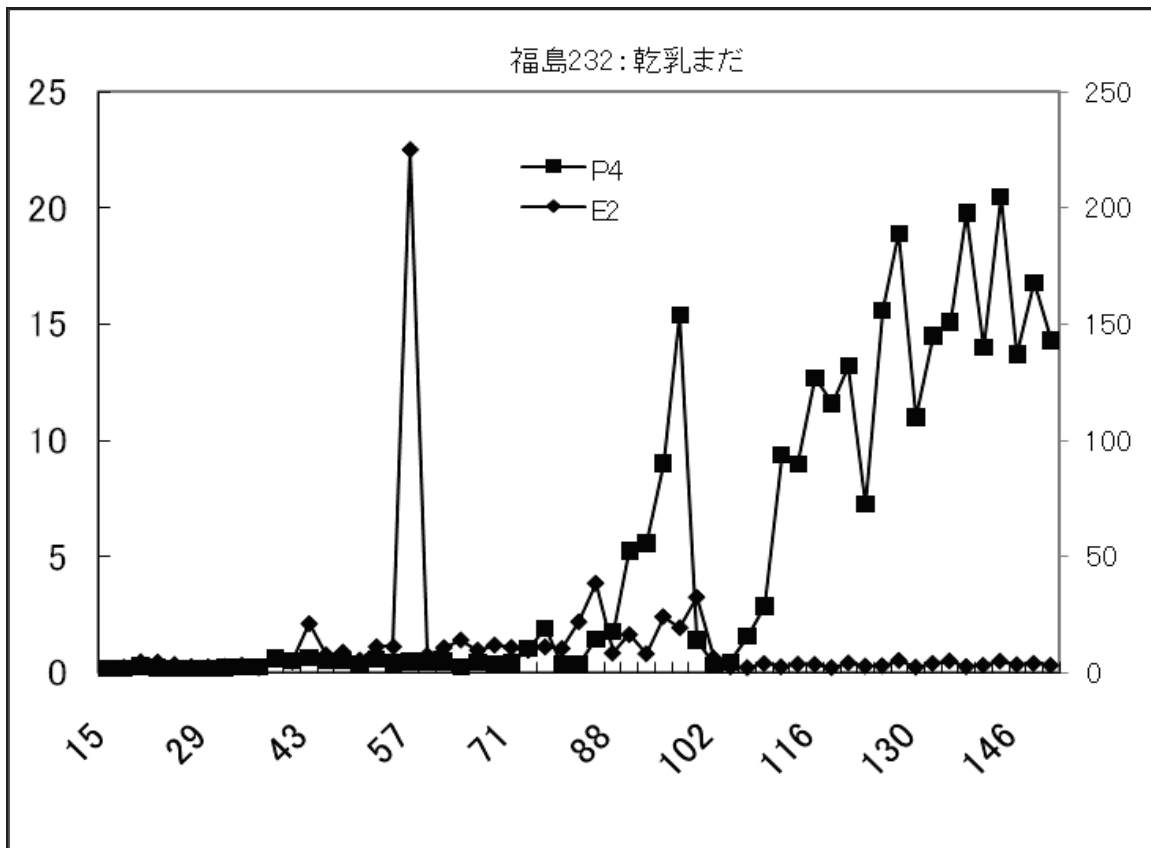
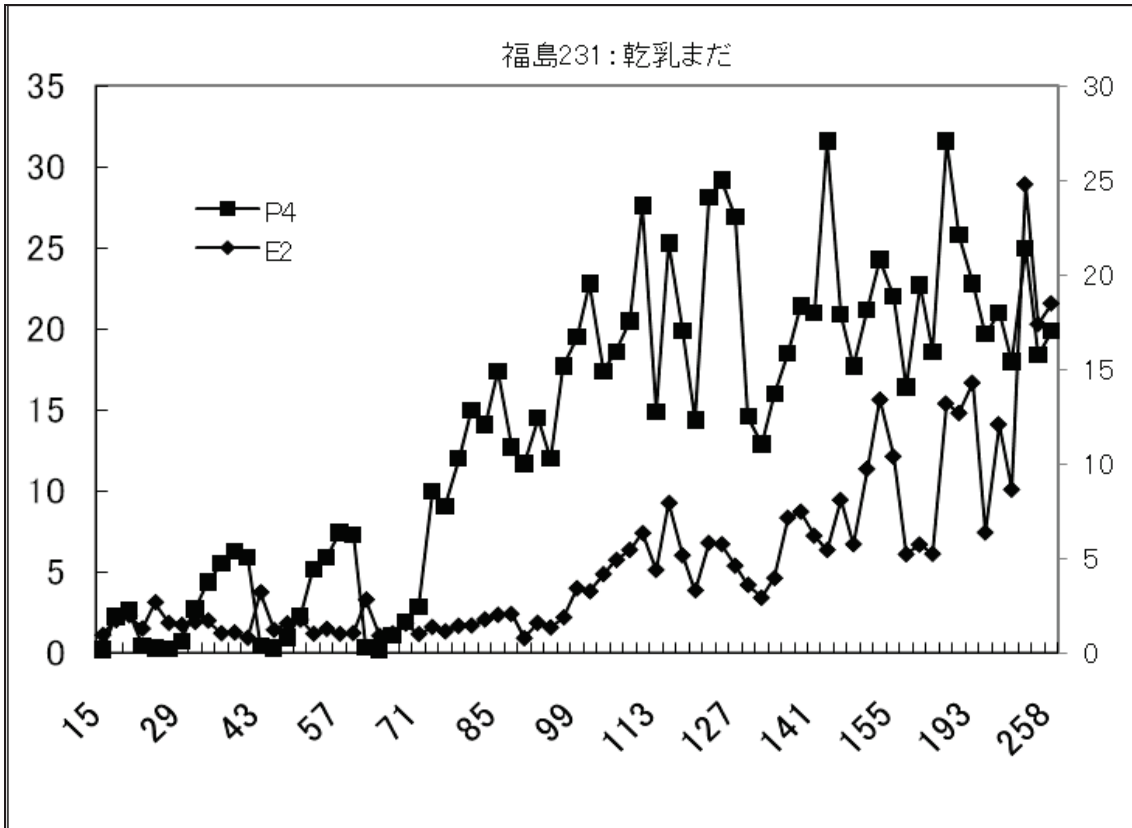


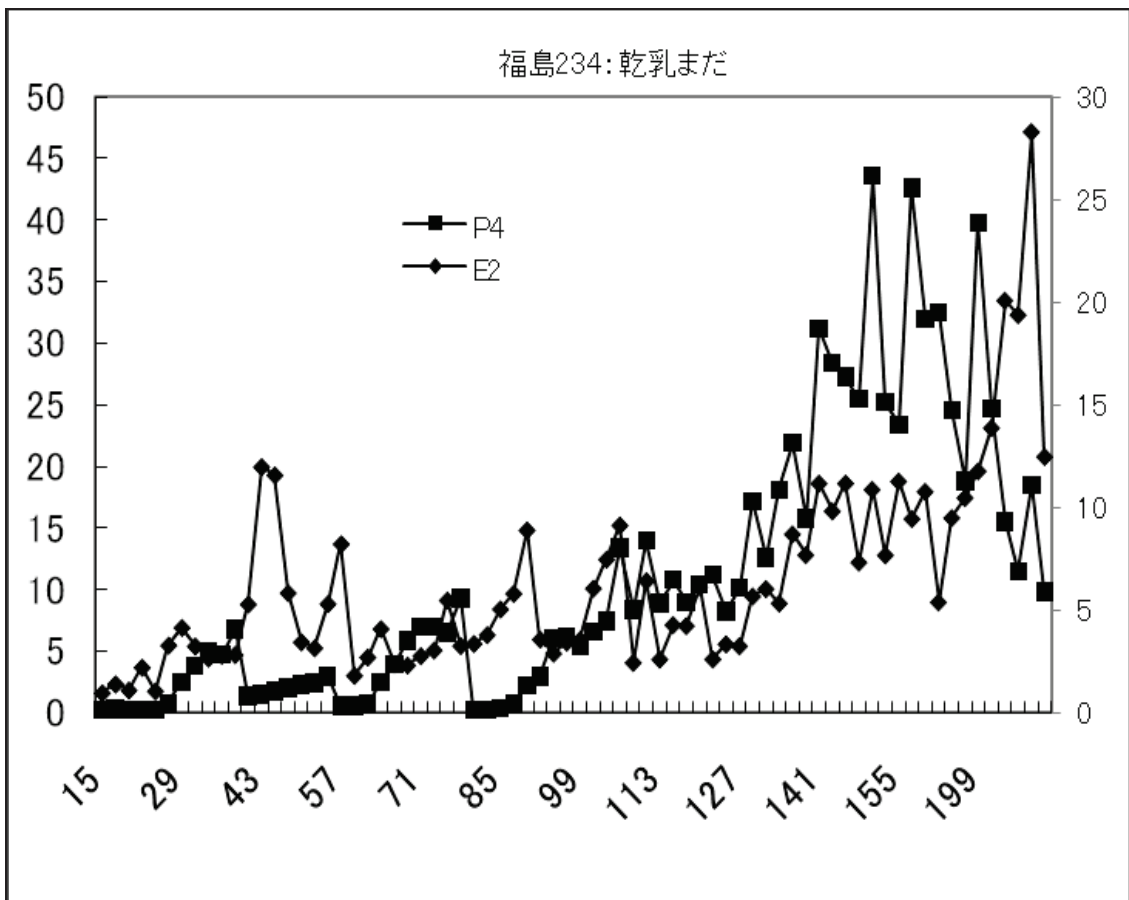
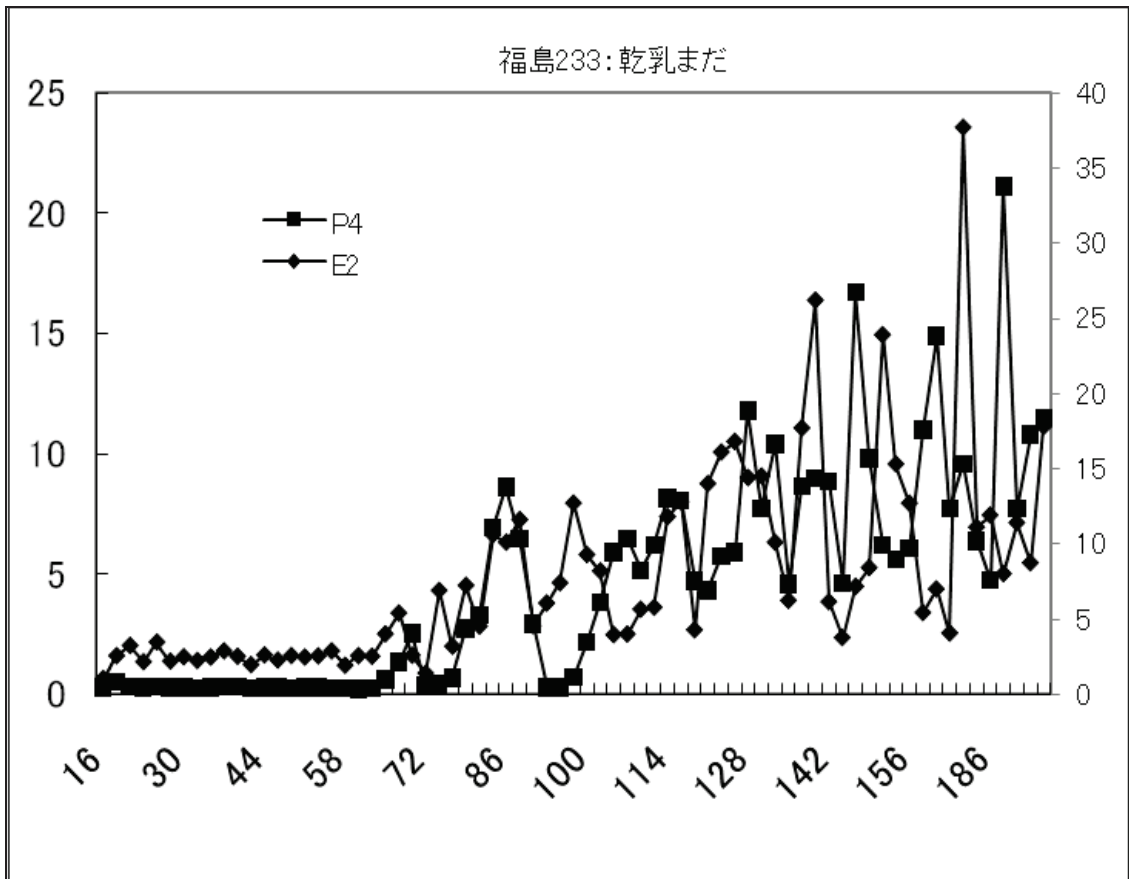


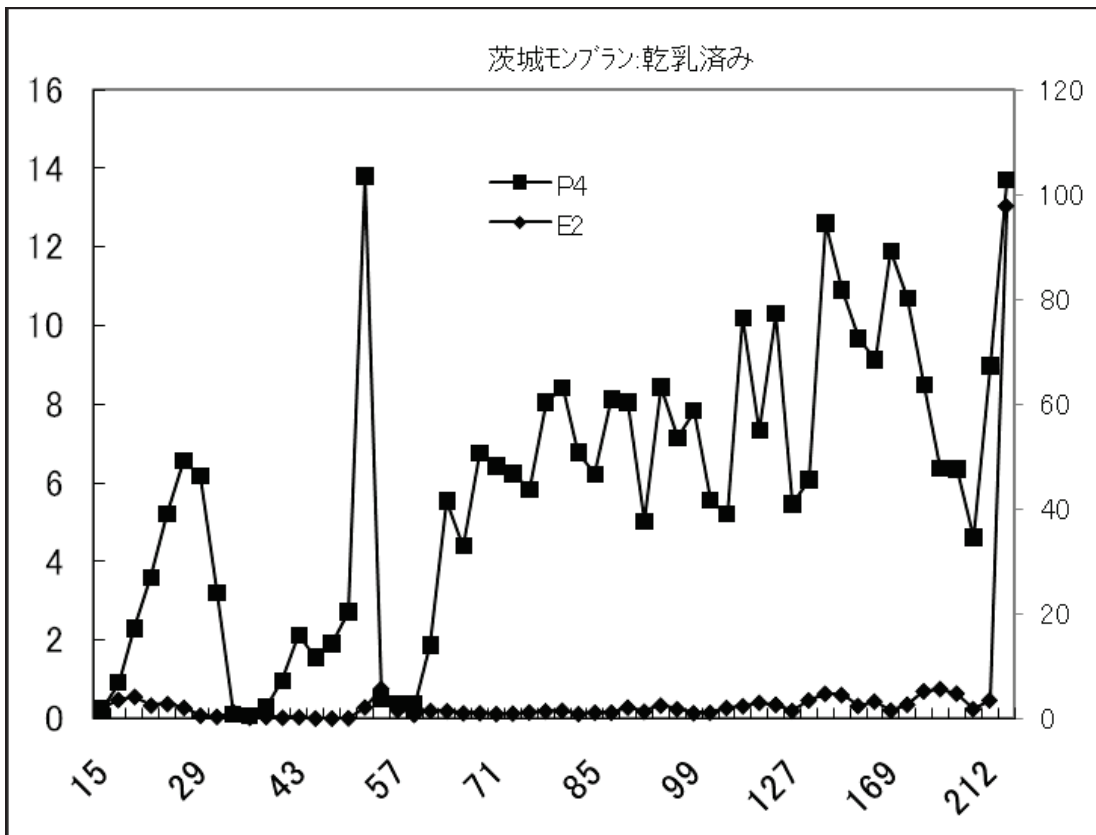
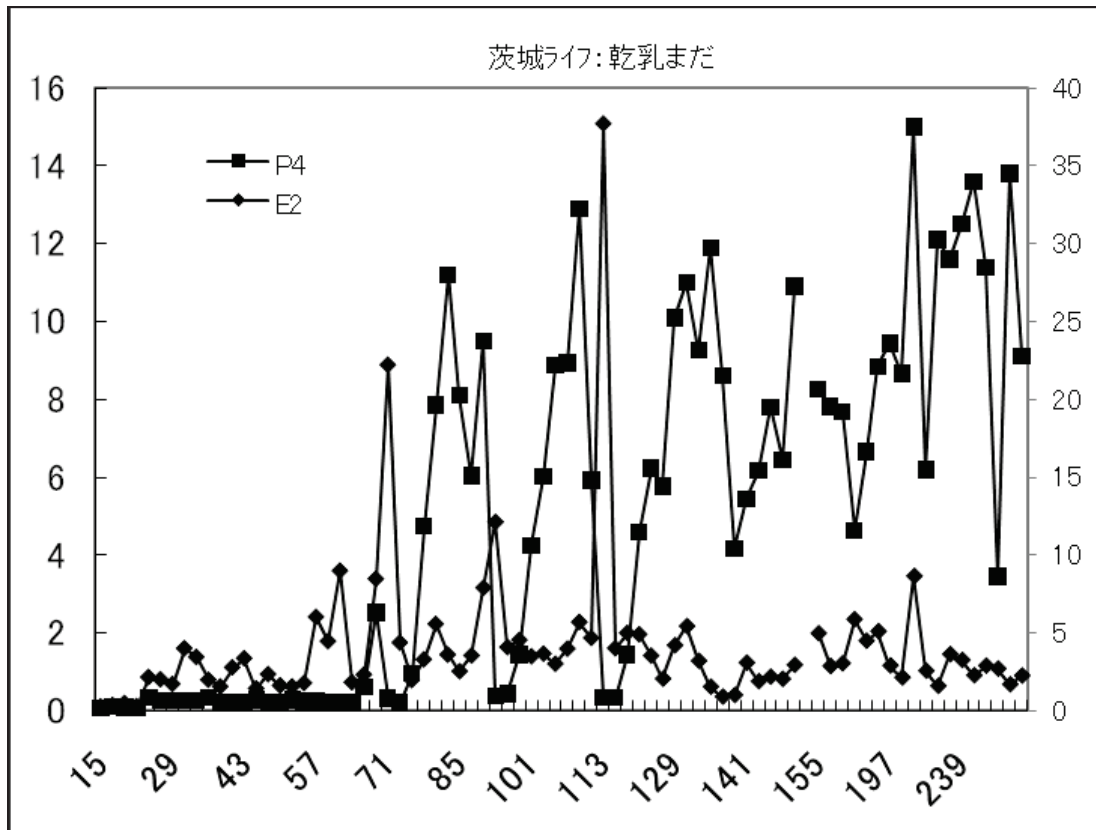
<初産牛>

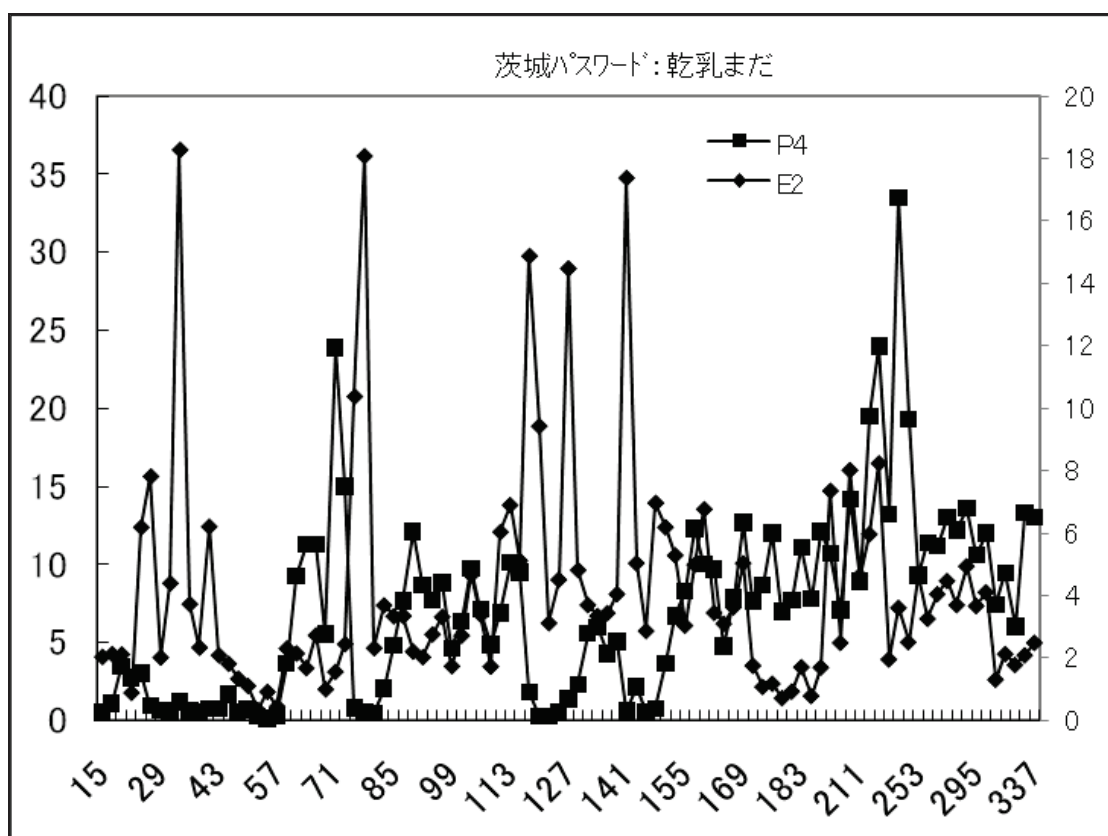
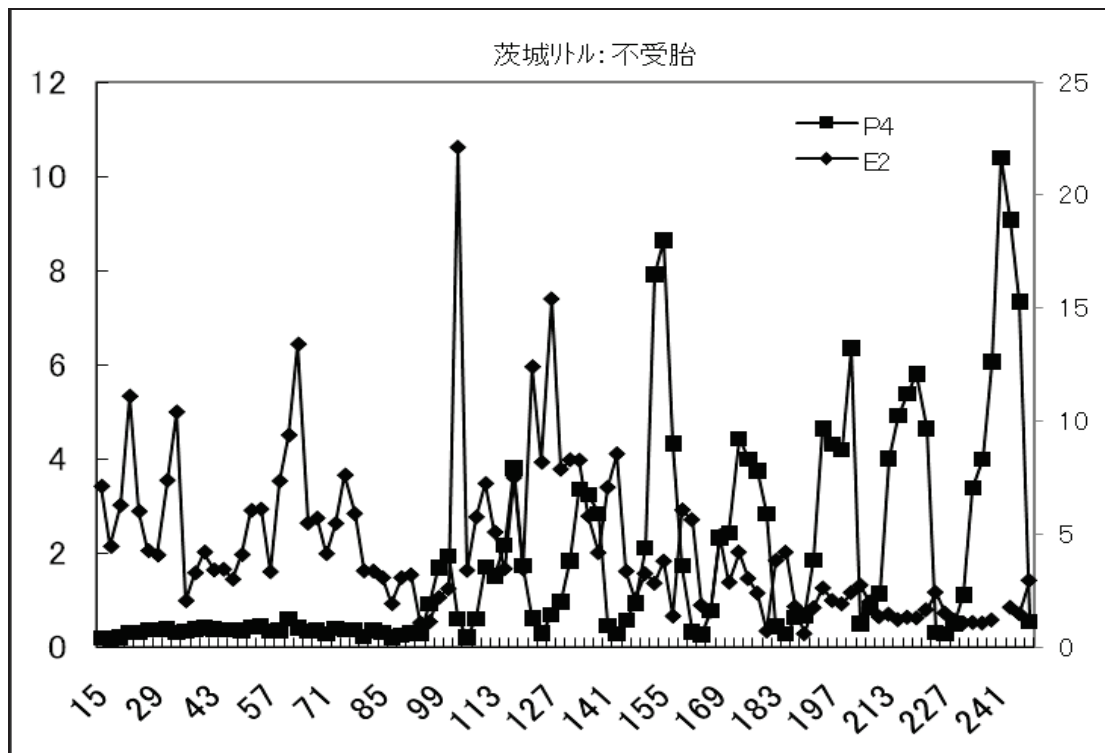


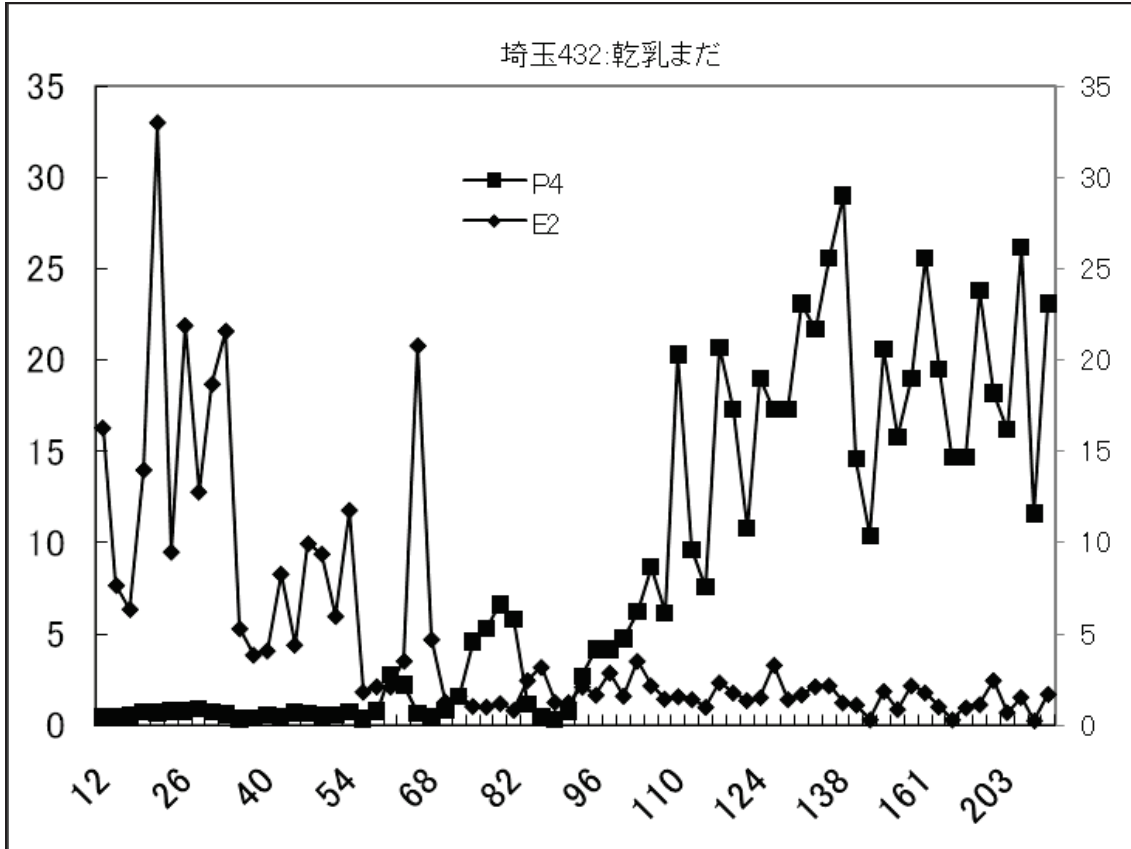
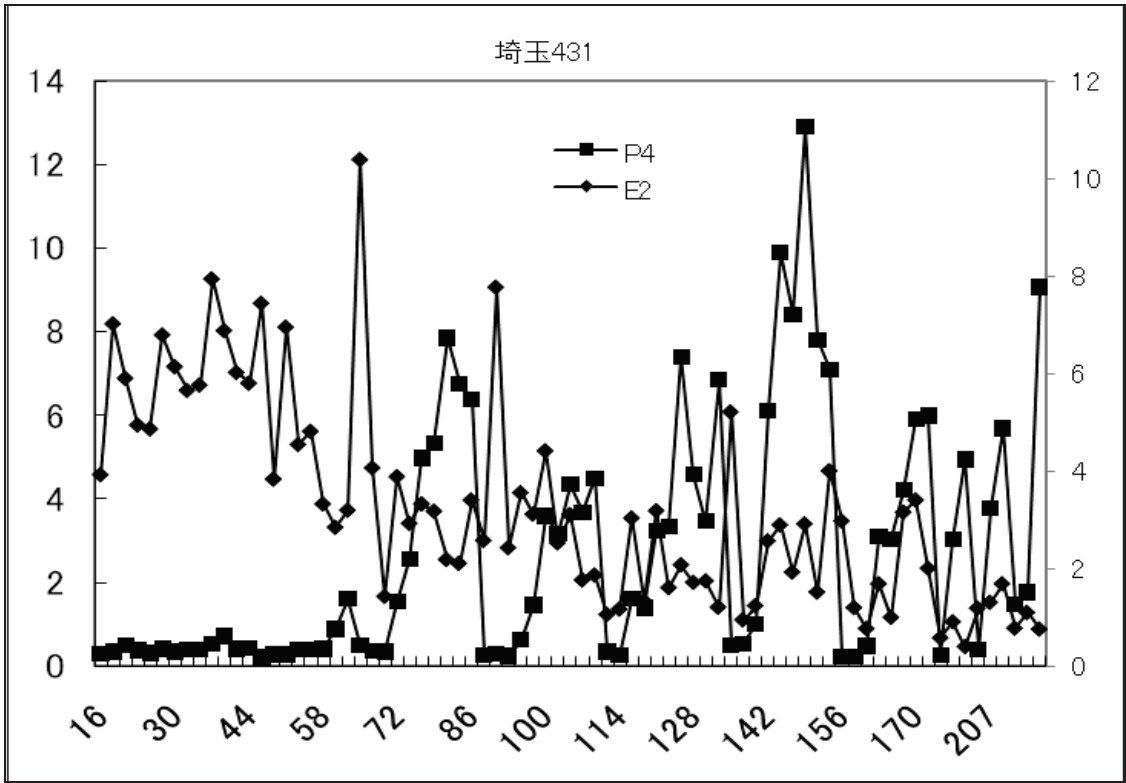


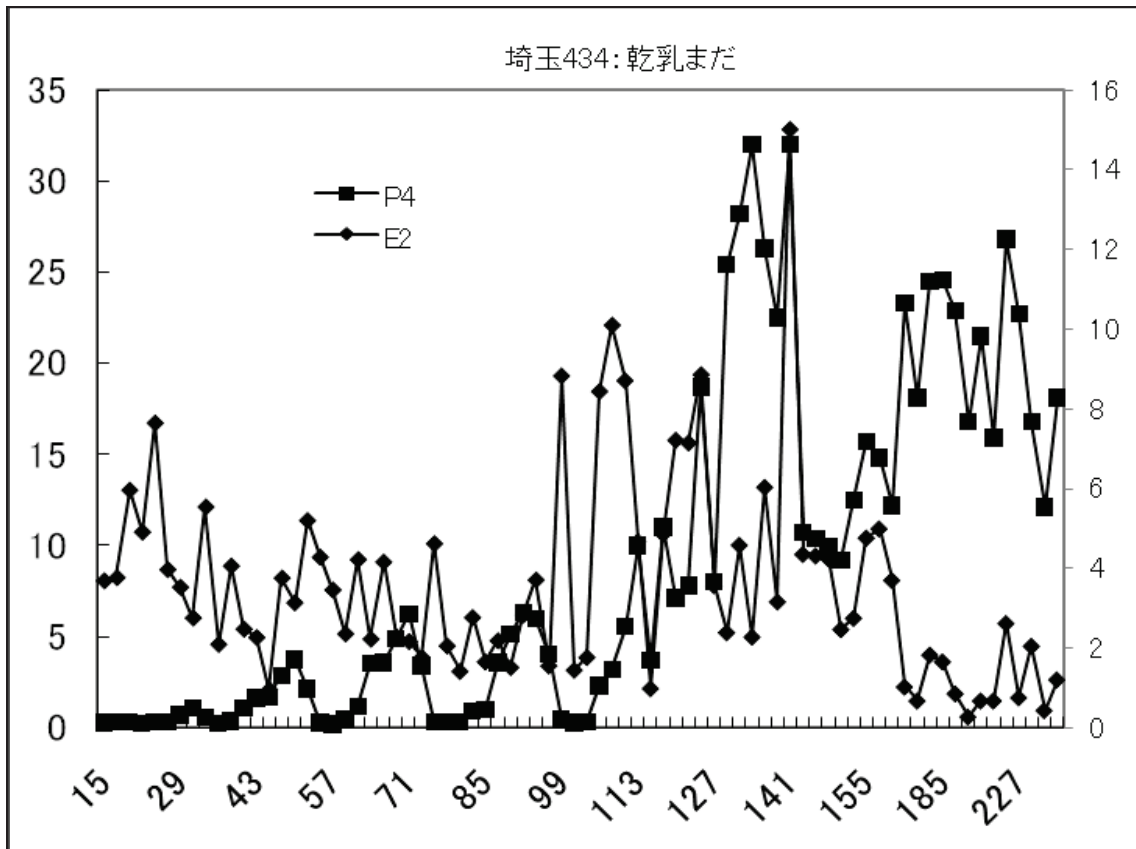
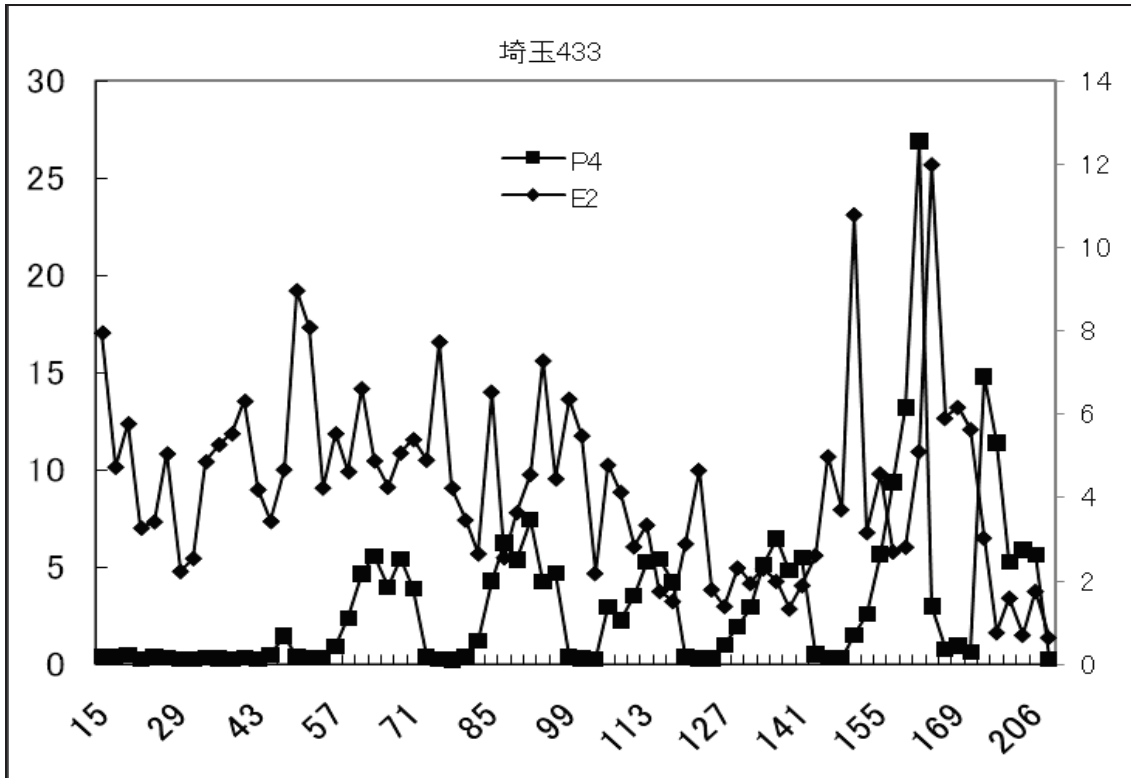


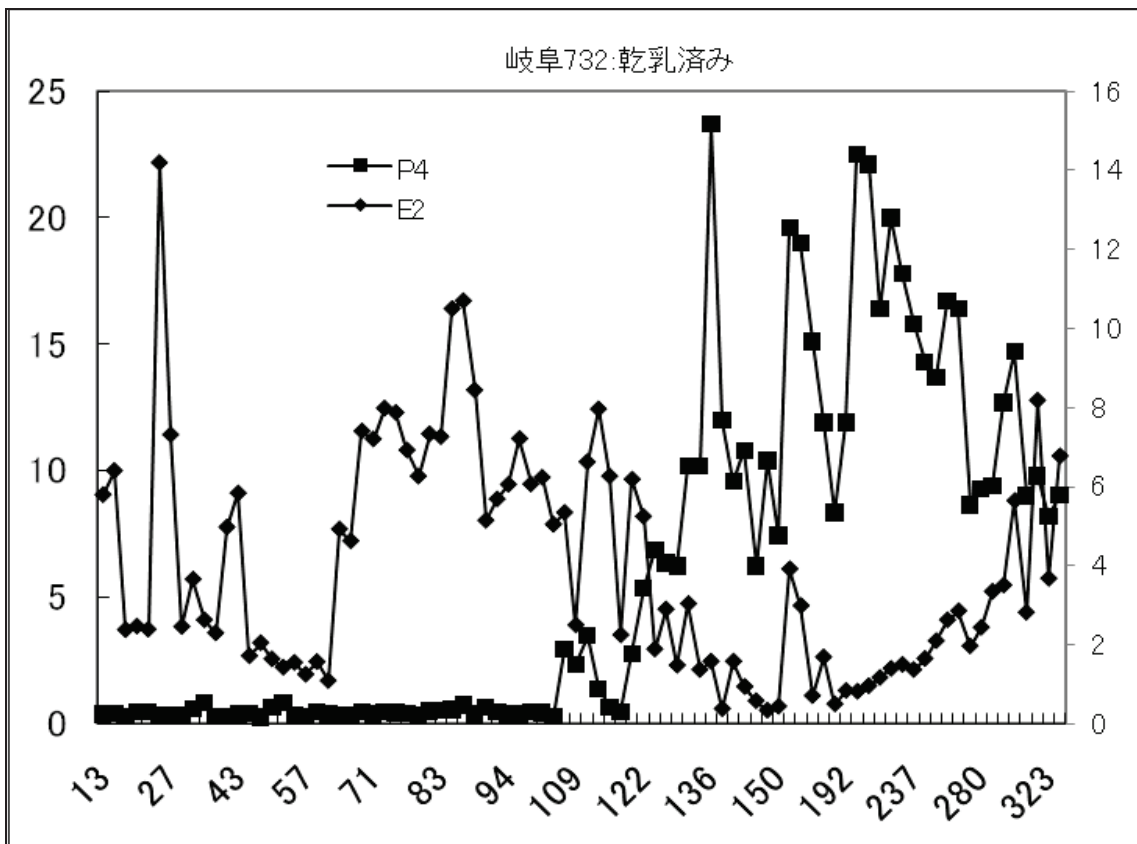
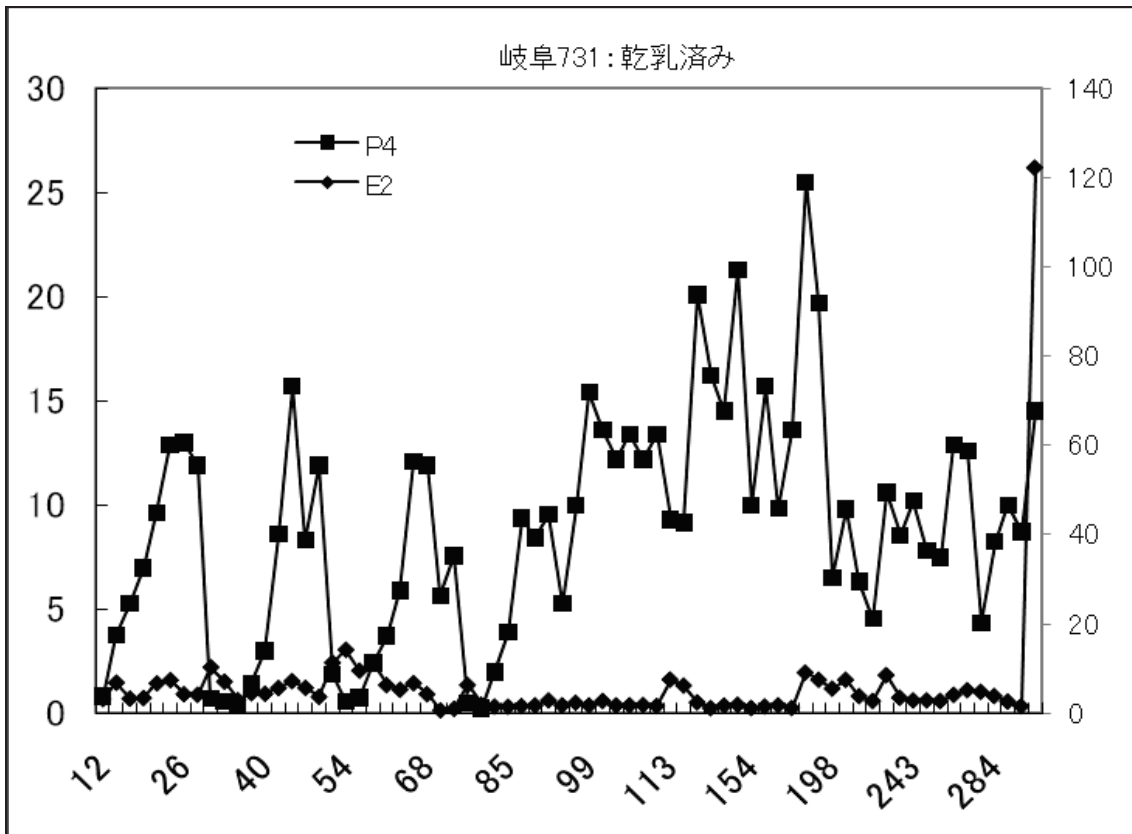


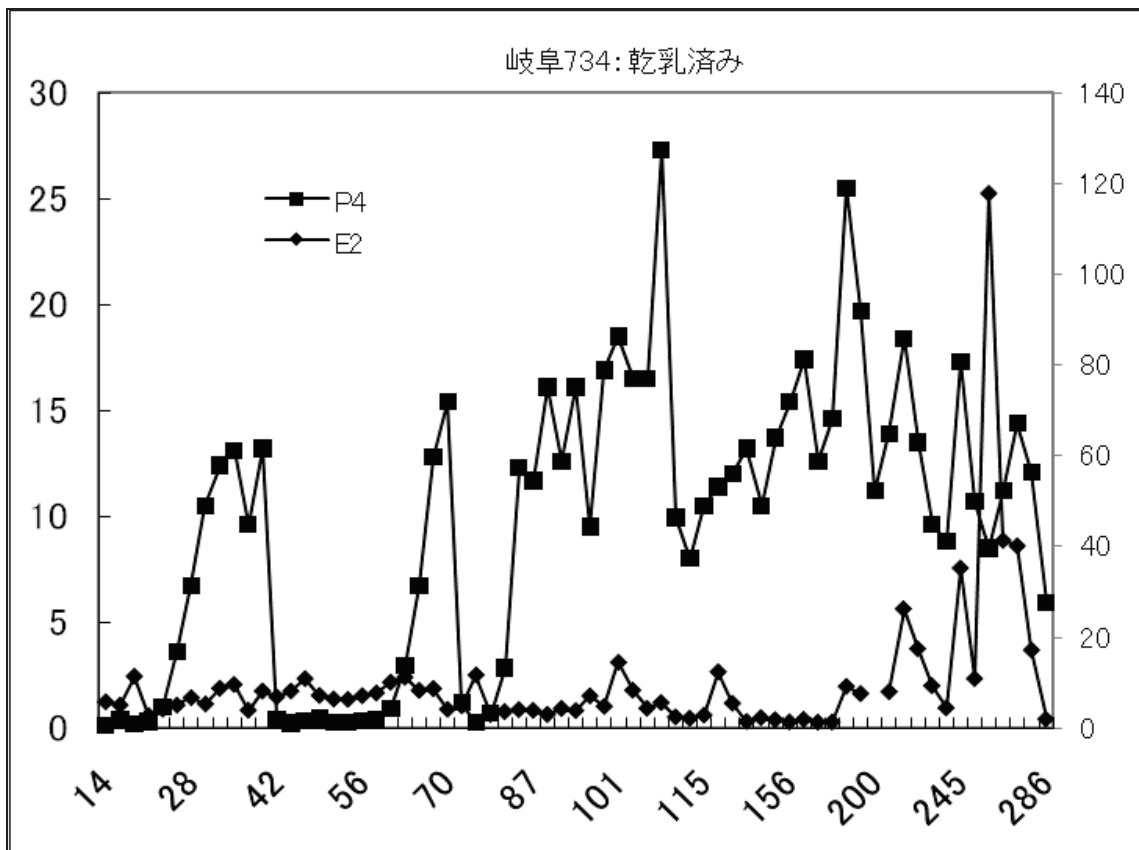
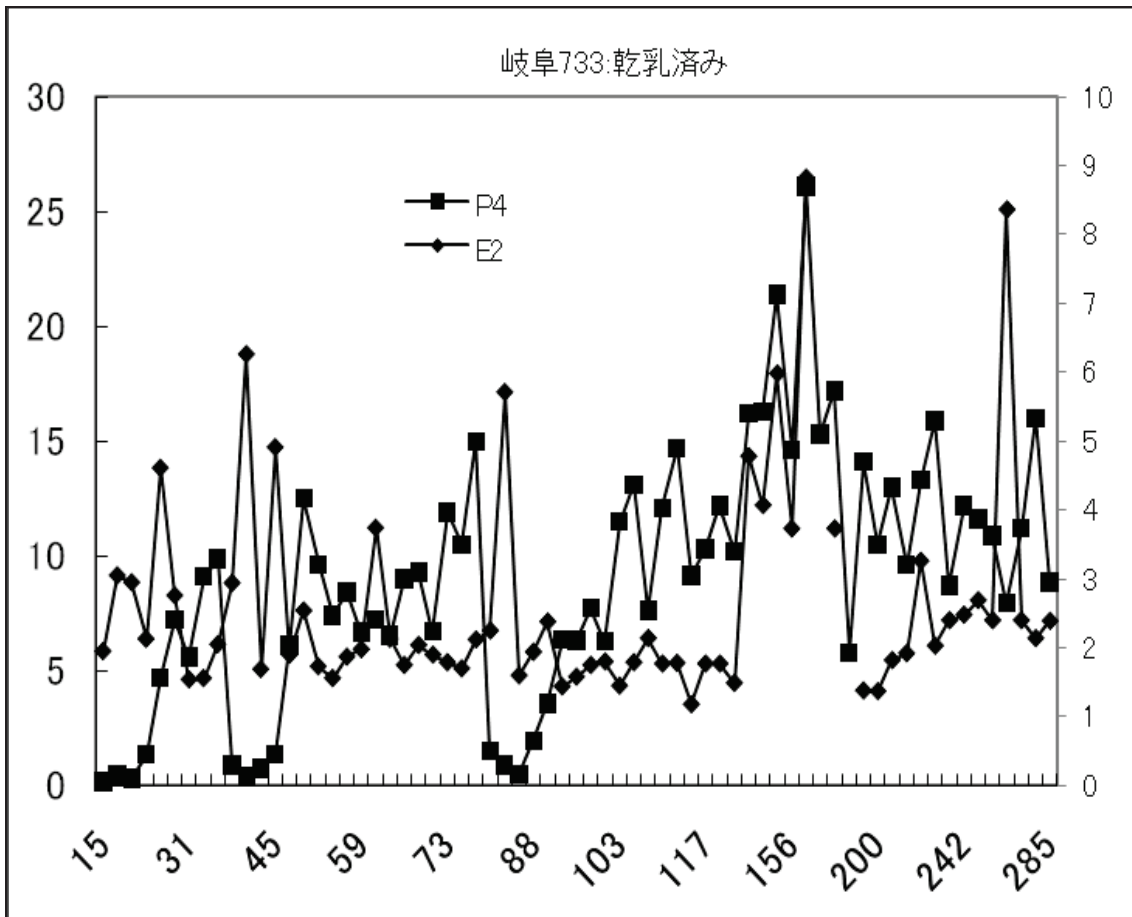


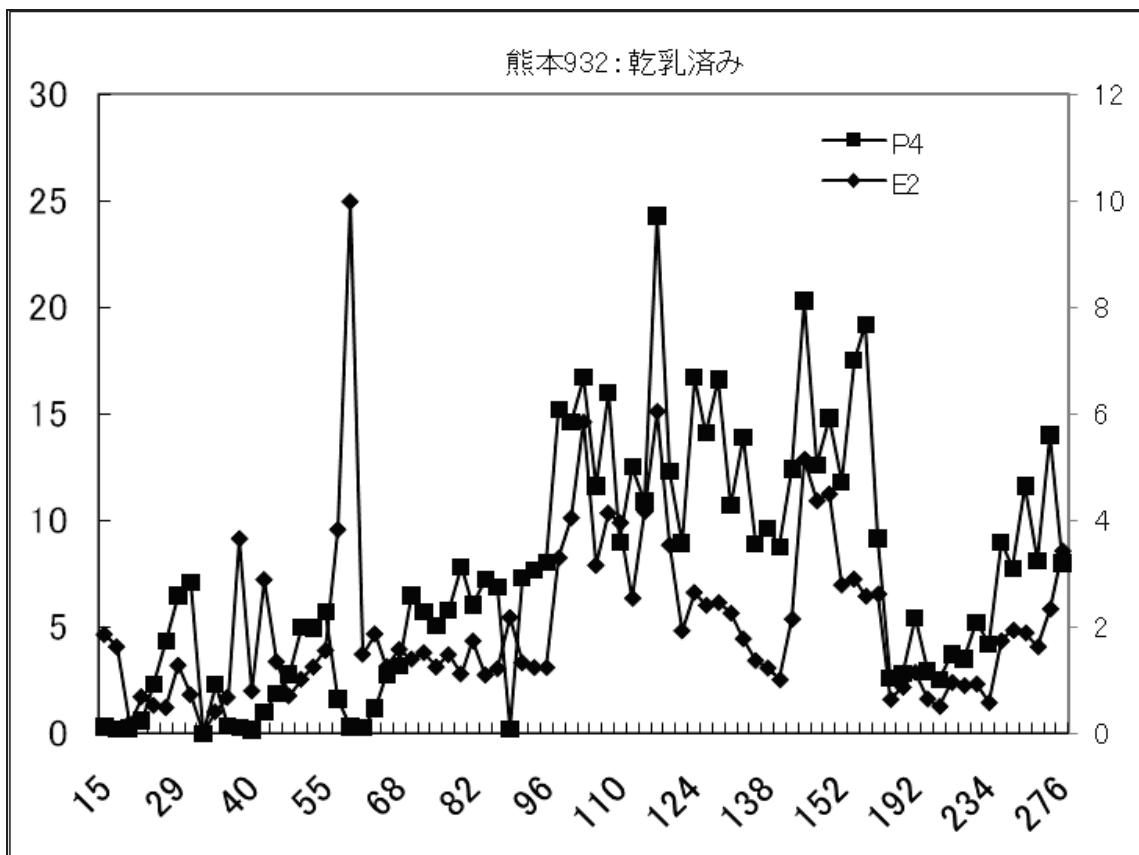
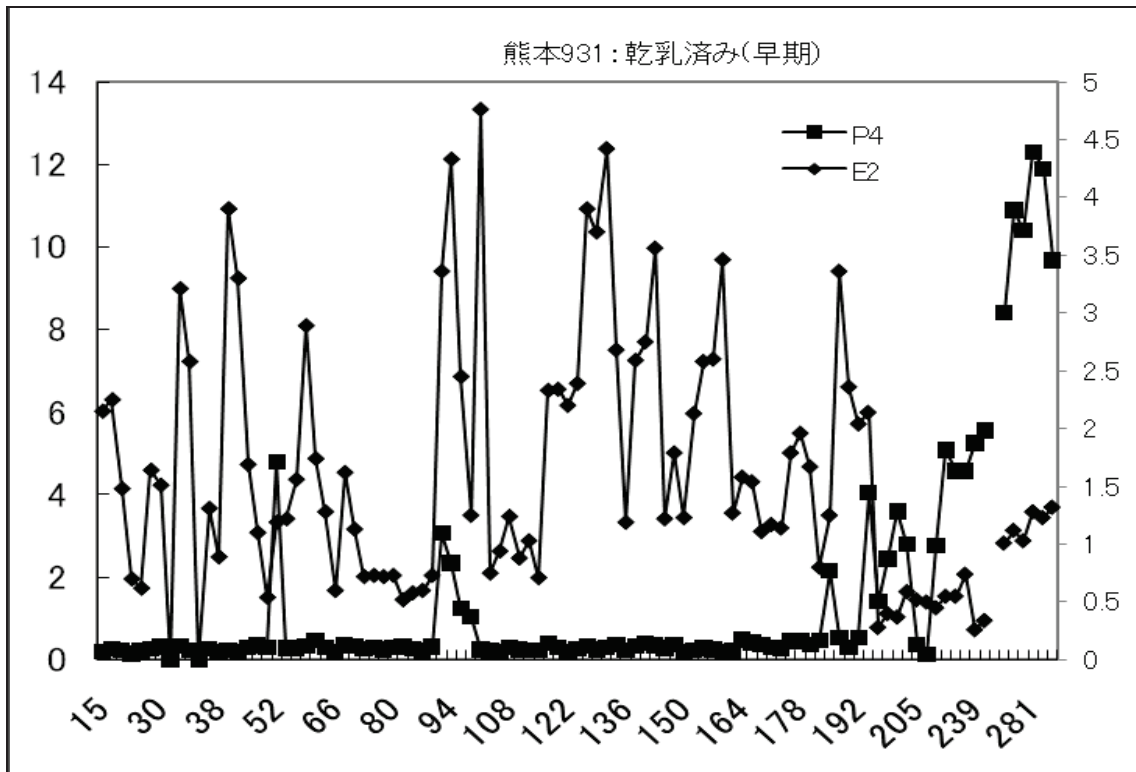


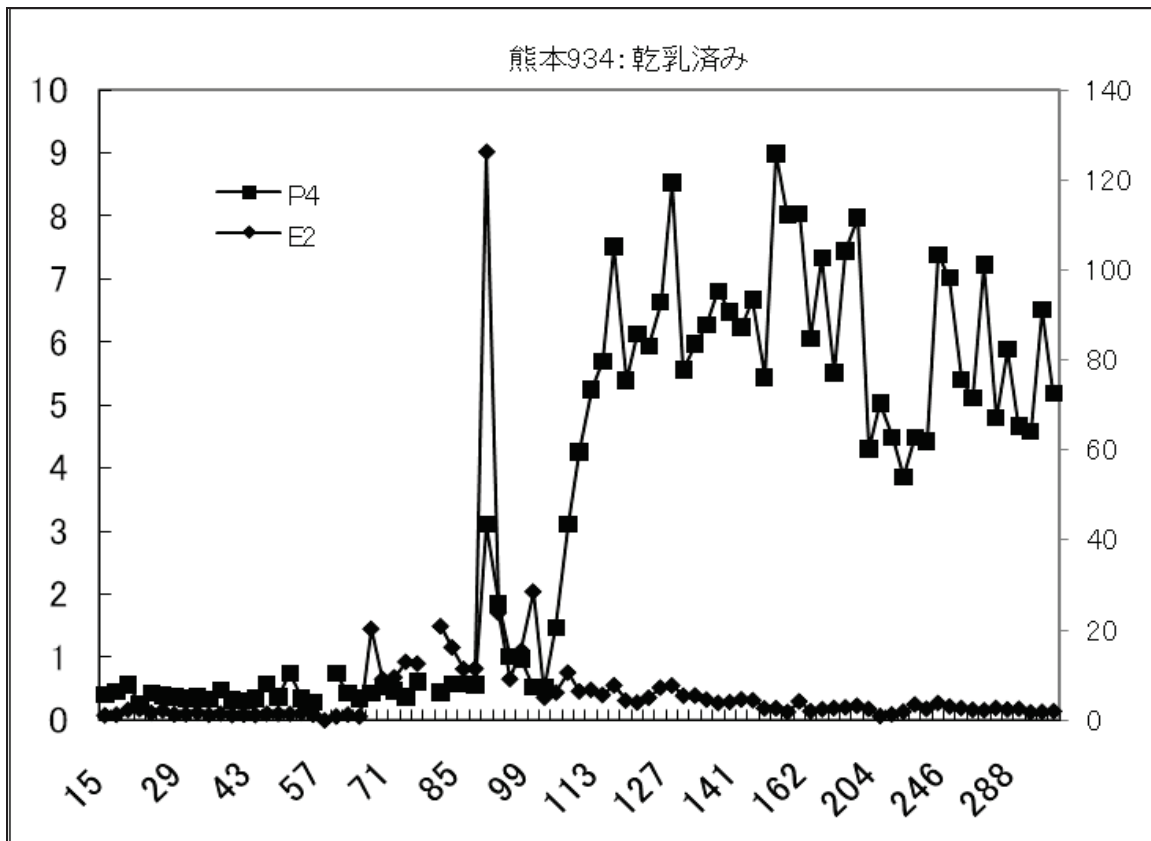
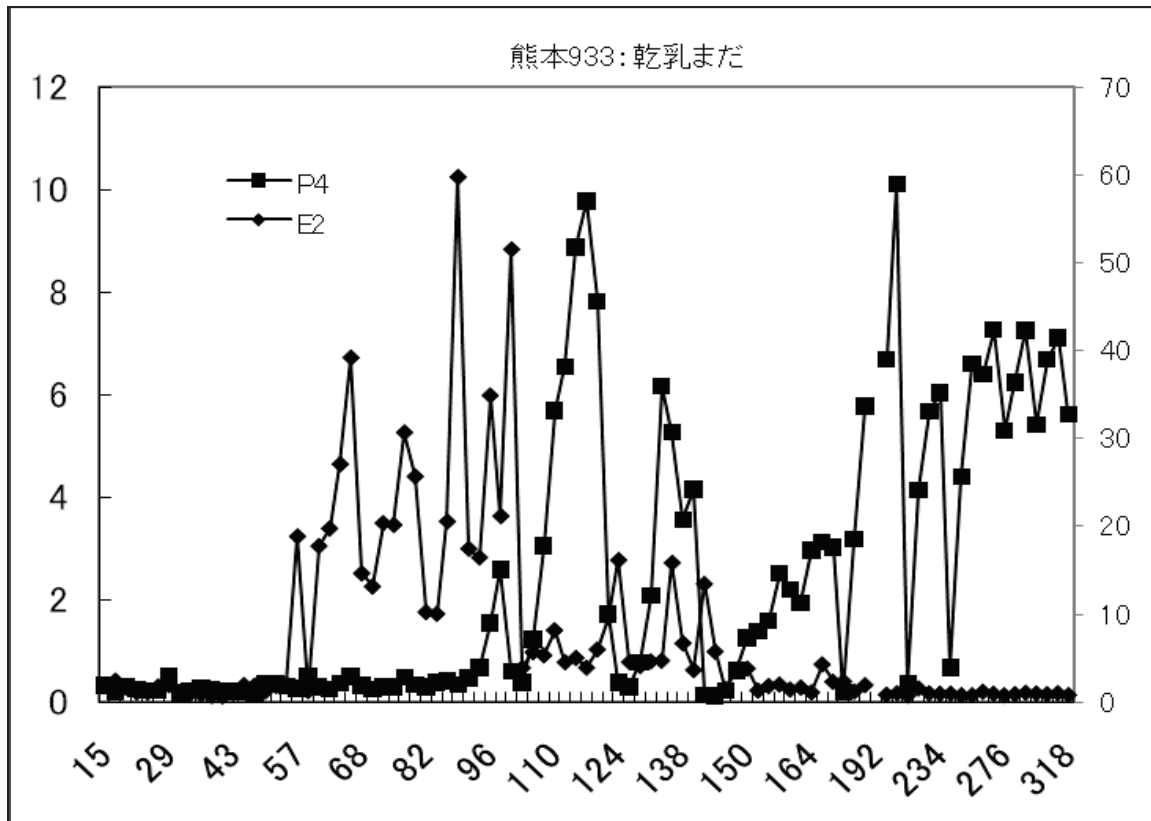












計44頭（60頭の供試牛のうち）の分娩後約15日目から乾乳（分娩予定日の約2か月前に実施）あるいは乾乳近くまでの期間における乳汁中の性ステロイドホルモン（P4濃度およびE2濃度）の推移を臍別個体別に示した。なお、早期に乾乳処置をした牛（乳房炎のため）、人工授精を行ったが受胎に至らなかった牛および受胎後流産した牛、計6頭と同濃度の推移を比較対照のため示した（早期乾乳：熊本331、不受胎：石川セルティック、茨城リトル、埼玉431、埼玉433；流産：宮城133）。個体差が存在するものの、乾乳処置のため乳汁採取が終了している25頭のうち、2頭は明瞭な変化を示さなかったが、23頭では乾乳に近づくにしたがって、E2濃度が上昇傾向を示した。また、乾乳近くまで採材が終了している17頭（図中に「乾乳まだ」と表示）のうち8頭が同様な上昇傾向を示した。P4濃度とE2濃度の推移に関して、経産牛と初産牛の間に明瞭な差は認められなかった。P4濃度が妊娠成立後から高濃度（ $<10\sim 20\text{ng/mL}$ ）で維持される傾向は全頭にみられた。これらの結果は、血漿中P4濃度およびE2濃度の傾向と同様であった。泌乳期間中における乳汁中P4濃度およびE2濃度に及ぼす飼養環境の影響（CPu低減とNFC低減）については、明瞭な差が認められなかった（現在、共同研究先で詳細に検討中）。調査された項目は、体重（試験開始時および分娩後）、産乳成績【最高乳量、泌乳量、脂肪、蛋白質、無脂固形分、MUN（乳中尿素態窒素濃度）】、乾物摂取量、繁殖成績（分娩難易度、産子体重、胎盤停滞の有無、初回発情日数、受胎までの日数、授精回数、繁殖障害の有無）、消化試験（窒素出納）、血液性状（Ht値、血糖値、遊離脂肪酸濃度、BUN、カルシウム、リン）であった。

泌乳期全体を通じて、個体間差はあるものの、分娩後しばらくの間（観察は、分娩直後からではなく分娩後2週間経過以降から）は、P4濃度およびE2濃度のいずれにおいても低濃度で推移した（生理的卵巣静止のためと思われる）。その後、卵巣の活動再開に伴う卵胞の発育によるE2濃度の上昇ピークに続いて、排卵後の黄体形成によるP4濃度の上昇ピークがみられた。いずれの場合も、E2濃度の上昇ピークが先行し、引き続いて排卵が起こった場合にはP4濃度の上昇ピークが後に続くという図式は全頭でみられた。その後、人工授精により受胎した牛では、P4濃度が持続的に高レベルを示した。一方、人工授精を試みるが受胎に至らない牛では、P4濃度とE2濃度が周期性を持ってピークを繰り返した。流産をすると黄体が退行するためP4濃度は低下した。また、受胎している牛の中でも、P4濃度が比較的高濃度（ $>20\text{ng/mL}$ ）で安定しているものと、低濃度（ $<10\text{ng/mL}$ ）で上下動を反復するものが存在した。

分娩後受胎に至るまで個体によって、その期間はさまざまであるが、乾乳に近づくにしたがって（すなわち、図の右側に行くにしたがって）、P4とE2の合計AUC（area under the curve；線の下面積）は大きくなることは明らかであった。このことは、分娩後に再受胎した牛においては乾乳が近づくにしたがって、乳汁中の性ステロイドホルモン濃度は上昇することを意味する。しかし、泌乳期間中の泌乳量は、分娩後1～2か月後をピークに徐々に減少を示すので、性ステロイドホルモン濃度の高い生乳がバルク乳中の性ステロイドホルモン濃度に及ぼす影響は、生理的卵巣静止期の比較的低濃度との比率だけでなく乳量および搾乳牛群の構成比（平成20年度の成果）を加味して考える必要がある。

臨床繁殖学的には、凍結した全乳を用いて性ステロイドホルモン濃度を測定することによって、卵巣活動の再開、発情周期の把握、受胎維持の確認等がほぼ確実にできることが判明し、非侵襲的な方法ゆえに連続かつ頻繁な採材が可能となり、乳牛の体内機構の解明に貢献することが今後期待される。