

黒毛和種供胚牛へのグリセリン製剤給与が採胚成績に及ぼす影響

誌名	畜産の研究 = Animal-husbandry
ISSN	00093874
著者名	西貝,正彦
発行元	養賢堂
巻/号	65巻7号
掲載ページ	p. 707-710
発行年月	2011年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



黒毛和種供胚牛へのグリセリン製剤給与が 採胚成績に及ぼす影響

西貝正彦*

緒言

分娩後の乳牛は、急激な乳量増加のため、飼料からの摂取エネルギーに乳生産のエネルギーが追いつかず、血中グルコース濃度が低下するため、いわゆる「負のエネルギーバランス状態」に陥ることが知られている¹⁾。

血中グルコース濃度が低下して糖質からのエネルギー供給が不足すると、乳牛は体脂肪を動員しエネルギー産生を行う必要があるため、脂肪分解が亢進しケトン体(アセト酢酸, β -ヒドロキシ酪酸, アセトン)へと代謝されエネルギー不足分を補うが、牛体内でのケトン体の処理能力を超えた場合にはケトーシスを発症することになる²⁾。

グリセリンは中性脂肪やリン脂質の構成成分で、消化管から吸収された後、肝臓で糖新生の基質として利用されてエネルギー源となることから、分娩後にグリセリンやプロピレングリコールを経口給与することによりケトーシスの治療が行われている^{3,4)}。

ケトーシスは卵子の発育および黄体形成に悪影響を及ぼすことから⁵⁾、近年、グリセリンを分娩後の乳牛に給与してエネルギー不足を改善することにより人工授精の受胎成績が向上したことが報告され⁶⁾、グリセリンの給与が牛の繁殖成績の向上に影響を及ぼすことが注目されている。

本試験ではグリセリン製剤を黒毛和種ドナー牛に給与し、採胚成績に及ぼす影響について検討した。

材料と方法

1) 供胚牛および採血

試験に供したドナー牛は栃木県那須塩原市および那須町の和牛繁殖農家 40 戸で飼育されている黒毛和種経産牛 40 頭である。これらを実験に無作為に 2 群に分け、給与群 20 頭には発情日(給与開始日)から採卵日までグリセリン製剤を 3 週間給与した。

*那須イーティ研究所 (Masahiko Nishigai)

対照群 20 頭には対照としてグリセリン製剤を給与しなかった。さらに給与群、対照群から 5 頭をそれぞれ無作為に選定し、それらについて供胚牛の発情日と採卵日に頸静脈から採血を行い血液生化学的検査 [グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT), 尿素窒素 (BUN), 総コレステロール (T-Cho), 中性脂肪 (TG), 遊離脂肪酸 (NEFA), 総ケトン体, アセト酢酸, 3 ヒドロキシ酪酸 (3HB) および血糖] および血中プロジェステロン濃度ならびに血中インスリン様成長因子 1 (IGF-1) 濃度の測定を行った。

2) 血液生化学的検査の測定方法

GOT は JSCC 標準化対応法, BUN はウレアーゼ GLDH 法, 総コレステロール, TG, NEFA, ケトン体は酵素法, 血糖は固定化酵素電極法, 血中プロジェステロン濃度は化学発光免疫測定法, 血中インスリン様成長因子 1 (IGF-1) 濃度は免疫放射定量法 (ビーズ固相法) で測定した。

3) グリセリン製剤の給与方法

供胚牛の発情日を給与開始日から採卵日まで 3 週間にわたりグリセリン製剤 200g (カーブエイド G, 物産バイオテック株式会社; カーブエイド G200g 中にグリセリン 50g を含有) を濃厚飼料に混合して供胚牛に朝 1 回給与した。なお、カーブエイド G の成分は粉末グリセリンを主体とし強肝剤であるバイパスコリン, インスリンの作用を促進するクロムおよびナイアシン他を含む総合サプリメントである。

4) 過剰排卵処置・胚の採取および採血方法

過剰排卵処置は、既報⁷⁾に従い、黒毛和種のドナー牛に発情後 10 日(発情日を 0 日)から卵胞刺激ホルモン (FSH; アントリン, 共立製薬) 20 アーマー単位を減量投与方法により筋肉内注射し, FSH 投与開始後 3 日にプロスタグランジン F_{2 α} (PGF_{2 α} ; 動物用プロナルゴン F 注射液, ファイザー株式会社) をジノプロストとして 30mg (朝 20mg, 夕 10mg) 筋肉内注射して発情を誘起し, 発情発現後 24 時間に 1 回, 人工授精を行った。

胚の採取は発情後 7 日に非手術的子宮灌流法によって行った。

5) 採取した胚の品質の判定方法

採取した胚の品質の判定方法には従来の Lindner ら⁸⁾の分類法と IETS(International Embryo Transfer Society)の分類法⁹⁾の 2 種類があるが、包括的なフィールドでの胚移植成績の検討により Lindner ら⁸⁾の分類が移植後の胚の生存性を直接反映することが報告されている¹⁰⁾ため、本試験では Lindner ら⁸⁾の分類に従って①凍結可能な Excellent および Good 胚 ②胚の凍結はできないが新鮮胚移植が可能な Fair および Poor 胚③凍結も新鮮胚移植もできない変性卵および未受精卵に品質を区分して採卵個数を比較した。

6) 統計計算

Student の *t* 検定¹¹⁾により有意差検定を行い、危険率 5%未満($P < 0.05$)を有意差ありと判定した。

成 績

1) 採卵成績

採卵成績は表 1 に示すとおりであった。すなわち、給与群の平均総採卵個数は 19.7 ± 2.6 (標準誤差; SE) 個であったが、対照群は 15.6 ± 1.6 個であり対照群と比較して多い傾向にあったが、有意差はみとめられなかった。

凍結可能である Excellent および Good 胚の平均採卵成績は給与群では 12.9 ± 2.0 個であったが、対照群では 7.1 ± 1.2 個であり、両群間に有意差がみとめられた ($P < 0.05$)。

凍結はできないが新鮮胚移植が可能である Fair および Poor 胚の平均採卵成績は給与群では 0.4 ± 0.2 個であったが対照群は 0.3 ± 0.1 個であり、対照群と比較して多い傾向にあったが有意差はみとめられなかった。

凍結も新鮮胚移植もできない変性卵および未受精卵の平均採卵成績は給与群では 6.4 ± 1.2 個であった

が、対照群は 8.3 ± 1.8 個であり両群間に有意差はみとめられなかった。

凍結および新鮮胚移植可能胚 (Excellent, Good, Fair および Poor 胚) の平均採卵成績は給与群では 12.9 ± 1.9 個であったが、対照群は 7.2 ± 1.2 個であり、対照群と比較して有意差がみとめられた ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2

群	移植可能胚
給与群 ($n=20$)	12.9 ± 1.9 ^{a)} *
対照群 ($n=20$)	7.2 ± 1.2 *

*間に有意差 ($P < 0.05$)あり, ^{a)}平均±SE

2) 血液生化学的検査成績

血液生化学的検査成績は表 3 に示すとおりであった。給与群の発情日と採卵日の平均血中プロゲステロン濃度と血糖値に有意差 ($P < 0.05$) が認められたが、GOT, BUN, 総コレステロール, TG, NEFA, 総ケトン体, アセト酢酸, 3HB ならびに IGF-1 の平均値について有意差は認められなかった。対照群の発情日と採卵日の平均血中プロゲステロン濃度に有意差 ($P < 0.05$) が認められたが、他の検査項目の平均値について、有意差は認められなかった。

給与群と対照群については全ての血液検査項目について平均値に有意差は認められなかった。しかし、給与群の血中総ケトン体濃度は発情日には $267 \pm 24 \mu\text{mol/l}$ で、採卵日には $293 \pm 20 \mu\text{mol/l}$ であったが、対照群では発情日には $493 \pm 110 \mu\text{mol/l}$ で、採卵日には $612 \pm 93 \mu\text{mol/l}$ と上昇した。

給与群の血中 3HB 濃度は発情日には $264 \pm 26 \mu\text{mol/l}$ で、採卵日には $290 \pm 10 \mu\text{mol/l}$ であったが、対照群では発情日には $479 \pm 105 \mu\text{mol/l}$ で、採卵日には $598 \pm 10 \mu\text{mol/l}$ と上昇した。

また給与群の IGF-1 の平均血中濃度は発情日には $123.8 \pm 26.2 \text{ ng/ml}$ で、採卵日には $136.6 \pm$

表 1

群	総採卵数	Excellent および Good ランク胚	Fair および Poor ランク胚	変性卵未受精卵
給与群 ($n=20$)	19.7 ± 2.6 ^{a)}	12.9 ± 2.0 *	0.4 ± 0.2	6.4 ± 1.2
対照群 ($n=20$)	15.6 ± 1.6	7.1 ± 1.2 *	0.3 ± 0.1	8.3 ± 1.8

*間に有意差 ($P < 0.05$)あり, ^{a)}平均±SE

表 3

群	発情日	採卵日	発情日	採卵日
	GOT (U/l)	GOT (U/l)	BUN (μ g/dl)	BUN (μ g/dl)
給与群 (n=5)	82.3 \pm 5.2 ^{a)}	85 \pm 7.7	8.08 \pm 1.09	8.18 \pm 1.15
対照群 (n=5)	78.2 \pm 2.3	79.6 \pm 16.5	9.44 \pm 1.13	10.5 \pm 0.92

^{a)}平均 \pm SE

群	発情日	採卵日	発情日	採卵日
	T-Cho (mg/dl)	T-Cho (mg/dl)	TG (mg/dl)	TG (mg/dl)
給与群 (n=5)	128.4 \pm 11.8	122.7 \pm 12.4	11.4 \pm 1.8	8.6 \pm 1.8
対照群 (n=5)	140.4 \pm 6.3	134.8 \pm 6.4	10.6 \pm 1.8	6.4 \pm 2.5

群	発情日	採卵日	発情日	採卵日
	NEFA (mEq/l)	NEFA (mEq/l)	プロジェステロン (ng/ml)	プロジェステロン (ng/ml)
給与群 (n=5)	0.20 \pm 0.05	0.25 \pm 0.06	0.42 \pm 0.05*	36.9 \pm 6.5*
対照群 (n=5)	0.31 \pm 0.04	0.25 \pm 0.03	0.65 \pm 0.21*	52.5 \pm 11.1*

*間に有意差 (P<0.05)あり

群	発情日	採卵日	発情日	採卵日
	IGF-1 (ng/ml)	IGF-1 (ng/ml)	総ケトン体 (μ mol/l)	総ケトン体 (μ mol/l)
給与群 (n=5)	123.8 \pm 26.2	136.6 \pm 14.9	267 \pm 24	293 \pm 20
対照群 (n=5)	104.7 \pm 7.7	105.6 \pm 5.3	493 \pm 110	612 \pm 93

群	発情日	採卵日	発情日	採卵日
	アセト酢酸 (μ mol/l)	アセト酢酸 (μ mol/l)	3HB (μ mol/l)	3HB (μ mol/l)
給与群 (n=5)	6 \pm 2	3 \pm 2	264 \pm 26	290 \pm 10
対照群 (n=5)	13.5 \pm 4.5	14 \pm 11	479 \pm 10.5	598 \pm 10

群	発情日	採卵日
	血糖 (mg/dl)	血糖 (mg/dl)
給与群 (n=5)	58.4 \pm 2.2*	82.2 \pm 8.7*
対照群 (n=5)	61.4 \pm 4.2	66.8 \pm 4.8

*間に有意差 (P<0.05)あり

14.9ng/ml と上昇したが、対照群では発情日には 104.7 \pm 7.7ng/ml で、採卵日には 105.6 \pm 5.3ng/ml と変化はなかった。

考 察

分娩後の乳牛は生理的に成長ホルモン(GH)が上昇する。GH は肝臓に作用し、インスリン様成長因子 1

(IGF-1) の分泌を刺激するが、分娩後の負のエネルギーバランス状態では IGF-1 の分泌は下降する¹²⁾。

牛では血中 IGF-1 のほとんどが肝臓で産生され、成牛では黄体の発育、ステロイド合成および卵子の成熟に大きな影響を及ぼしている。さらに初期胚には IGF-1 受容体が存在し、IGF-1 を培養液に添加することにより卵胞の成熟を促すとともに、アポトーシス

細胞数が減少し総細胞数が増加することが報告されている^{13,14)}。

インスリンと IGF-1 は牛の卵胞発育の調節に関係することが報告されている^{15,16)}が、特に IGF-1 は牛の過剰排卵成績に大きな影響を与えることが報告されている¹⁷⁾。

いっぽう、Hidalgo ら¹⁸⁾はプロピレングリコールを未経産牛の受胎牛に 20 日間経口投与した場合に胚移植の受胎率が向上したと報告していることから、グリセリン製剤をドナー牛に給与することにより過剰排卵成績を向上させる可能性がある。

そこで、黒毛和種ドナー牛にグリセリン製剤(カーブエイド G) 200g を 1 日 1 回、発情日から採卵日まで 3 週間給与し、採卵数と採卵した胚の品質に及ぼす影響について検討した。

本成績において、給与群の Excellent および Good 胚の平均採卵数は対照群のそれより有意($P < 0.05$)に多く、凍結および移植可能胚数も有意($P < 0.05$)に多かった。

このことに関し、給与群では総ケトン体と 3HB 濃度は発情日と採卵日に差がなかったが、対照群では発情日に比べて採卵日には大幅に上昇した。また投与群の IGF-1 の平均濃度は発情日に比べ採卵日には上昇したが、対照群では発情日と採卵日に変化はなかった。

このことから、牛の過剰排卵成績においてグリセリン製剤を給与することにより血糖値が有意に上昇し、分娩後の負のエネルギーバランスが改善され、血中ケトン体濃度が減少するとともに、IGF-1 濃度が上昇し、初期胚の発育が促進されたため、胚の採卵数と胚の品質が向上したものと考えられた。

結 論

黒毛和種ドナー牛にグリセリン製剤 200g を 3 週間給与し、採卵した胚の品質に及ぼす影響について検討したところ、グリセリン製剤給与群では①Excellent および Good 胚数②凍結および移植可能胚数が対照群に比べて有意に向上した。採卵数と胚の品質向上はグリセリンの他、バイバスコリン、クロム、ナイアシンなどにより総合的な糖新生が促進され、血糖値が有意に上昇することにより血中ケトン体濃度の減少と IGF-1 濃度の上昇により採卵数と胚の品質が向上したものと考えられた。

最後にカーブエイド G を提供いただいた物産バイオテック株式会社に感謝します。

参 考 文 献

1. Leroy JLMR, Opsomer G, Van Soom A, Goovaerts IGF, Bols PEJ. (2007) Reduced fertility in high-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part I - The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reprod Dom Anim*. 43:623-632.
2. Roche JF, Mackey D, Diskin MD. (2000) Reproductive management of postpartum cows. *Anim Reprod Sci*. 60-61:703-712.
3. DeFraain JM, Hippen AR, Kalscheur KF, Jardon PW. (2004) Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. *J Dairy Sci*. 87:4195-4206.
4. Nielsen NI, Ingvarsen KL. (2004) Propylene glycol for dairy cows. A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. *Animal Feed Science and Technology*. 115: 191-213.
5. Leroy JL, Van Soom A, Opsomer G, Goovaerts IG, Bols PE. (2008) Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II. Mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reprod Domest Anim*. 43:623-632.
6. León AO, Cerón J H, Gutiérrez C G. (2010) Glycerol supplementation after artificial insemination increases conception rate in holstein cows. *Rev Mex Cienc Pecu*. 1:69-74.
7. Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T and Kaneda Y. (2002) Improvement of pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 58:1597-1606.
8. Lindner GM and Wright RW Jr. (1983) Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*. 20:407416.
9. IETS Manual, 3rd Edition (1999)
10. Hasler, J.F. (2001) Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*. 56:1401-1415.
11. SPSS 16.0 J. User's Guide (2007) SPSS Japan Inc.
12. MC Lucy (2007) The bovine dominant ovarian follicle. *J Anim Sci*. 85(supple):89-99.
13. Radcliff RP, McCormack BL, Crooker BA, Lucy MC. (2003) Growth Hormone (GH) Binding and Expression of GH Receptor IA mRNA in Hepatic Tissue of Periparturient Dairy Cows. *J Dairy Sci*. 86:3933-3940.
14. Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. (2002) Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol Reprod Dev*. 62:489-95.
15. Butler ST, Pelton SH, Butler WR. (2004) Insulin increases 17 beta-estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reproduction*. 127:537-545.
16. Spicer LJ, Alpizar A & Echternkamp SE (1993) Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotrophins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, oestradiol production, and (or) insulin-like growth factor-I production *in vitro*. *J Anim Sci*. 71: 1232-1241
17. Velazquez MA, Zaraza J, Oropeza A, Webb R, Niemann H. (2009) The role of IGF1 in the *in vivo* production of bovine embryos from superovulated donors. *Reproduction*. 137:161-80.
18. Hidalgo CO, Gomez E, Prieto A, Duqueal P, Goyachea F, Fernandez L, Fernandez I, Facala N, Dieza C (2004) Pregnancy rates and metabolic profiles in cattle treated with propylene glycol prior to embryo transfer. *Reprod Domest Anim*. 39:664-676.