

ウシの分娩前後における血漿中ミトコンドリア由来細胞外DNA量の変化と血液成分値との関係

誌名	日本畜産學會報 = The Japanese journal of zootechnical science
ISSN	1346907X
著者名	野口,龍生 相澤,拓朗 岩田,尚孝
発行元	Zootechnical Science Society of Japan
巻/号	91巻3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 227-232
発行年月	2020年8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



ウシの分娩前後における血漿中ミトコンドリア由来 細胞外 DNA 量の変化と血液成分値との関係

野口龍生¹・相澤拓朗²・岩田尚孝²

¹ 東京農業大学富士農場, 富士宮市 418-0109

² 東京農業大学農学部, 厚木市 243-0034

(2019. 12. 9 受付, 2020. 4. 14 受理)

要 約 血液中には細胞外 DNA が含まれる。ミトコンドリアに由来する細胞外 DNA はその量が多く測定が容易である。本研究では血液中のミトコンドリア由来細胞外 DNA がウシの生理状態によって変動するのかどうかを調べるため、ホルスタイン種の栄養状態が大きく変化する時期である分娩前後の血漿の成分値（遊離脂肪酸（NEFA）、トリグリセリド（TG）、乳酸脱水素酵素（LDH）、およびグルコース）と細胞外 DNA 量との関係性について検討した。また、黒毛和種およびホルスタイン種を用いて人工授精後の妊娠の可否と授精時の細胞外 DNA 量との関係を検討した。血漿中の NEFA、TG、LDH、グルコースおよび細胞外 DNA 量は、分娩前後で大きく変動した。細胞外 DNA 量とそれぞれの血漿成分の平均値間で相関を調べると、LDH と正の相関が、TG と負の相関があった。一方で合計 14 頭の人工授精時細胞外 DNA 量の結果では、受胎牛と不受胎牛間に有意な関係が認められなかった。

日本畜産学会報 91 (3), 227-232, 2020

キーワード：ウシ, 血漿, 細胞外 DNA, ミトコンドリア

養牛農家において人工授精後の受胎率は経営に大きく影響する。家畜改良事業団の受胎率調査（家畜改良事業団 2015）によると、凍結精液を用いた乳用雌牛の人工授精後の受胎率は年々低下している。そのため、受胎率の低下に歯止めをかけることは養牛農家の喫緊の課題である。ウシでは分娩後早期に次の人工授精を行うことや分娩サイクルを短縮することが重要であり、分娩後のウシを適切な健康状態を維持する必要がある。しかし、母体の状態を評価する方法はボディコンディションスコアや飼養者の経験によるところが大きい。

健康状態は様々な方法で評価されているが、近年、血中に存在し健康状態を反映していると考えられている指標の一つに細胞外 DNA（cfDNA）がある。cfDNA とは細胞から血中に放出された DNA である。ヒトでは血液中の cfDNA の遺伝子異常を解析することによってがんの発見が可能であると報告されている（Bettegowda ら 2014）。さらに、生殖に関連する知見ではヒト精漿中の cfDNA 量が精液の質のマーカーとなるとする報告（Chou ら 2004）やヒト卵胞液中の cfDNA 量が胚移植後の受胎率と相関があるとする報告（Dimopoulou ら 2014）など、cfDNA と個体の生殖能力と関連した報告が多数なされている。一方で、cfDNA の濃度変化においては性周期間で変動がないことや、妊娠率とも関係ないことから妊娠性や繁殖生理

を反映しないとする報告もある（Hart ら 2005）。

血中 cfDNA は核由来とミトコンドリア由来のものがあ
るが、ミトコンドリア由来細胞外 DNA（cf-mtDNA）は、
細胞あたりのコピー数が多いため、リアルタイム PCR に
て正確に測定することができる（Kansaku ら 2018）。リ
アルタイム PCR を用いて cfDNA 量を測定し、これがウ
シの健康状態の評価に利用できるならば、ウシの状態をよ
り正確に把握することが可能になる。我々は卵胞液から抽
出した cf-mtDNA を吸光度で測定し、これとリアルタイ
ム PCR で測定した cf-mtDNA を比べると非常に高い相
関があることを見だしている（Kansaku ら 2018）。

乳牛では分娩後、負のエネルギーバランスに陥りこれは
遊離脂肪酸（NEFA）やトリグリセリド（TG）などの血
液成分の変化によって評価される。またこの負の栄養状態
は卵巣機能にも負の影響を及ぼしウシの繁殖能力を低下さ
せることが報告されている（Leroy ら 2011）。負の栄養
状態時に血中で高く検出される NEFA は、卵胞液のそれ
と正の相関がある事（Van ら 2014）が報告されており、
高い NEFA 濃度が卵子の能力を低減させることも
（Desmet ら 2016）報告されている。そこで、分娩時の
栄養生理の変化の激しい時期を対象に、cf-mtDNA の変
化やウシの人工授精の結果との関係を比べることで、cf-
mtDNA 量がウシの栄養または繁殖生理状態とどのような

連絡者：岩田尚孝（e-mail: h1iwata@nodai.ac.jp）

関係にあるのかを検討することが出来る。

そこで本研究では、分娩前後の時期を対象に、cf-mtDNA 量の変化を調べ、血液中の指標 (NEFA, TG, 乳酸脱水素酵素 (LDH), グルコース) とどのような関係性にあるのか、人工授精時の妊孕性とどのような関係にあるのかを検討した。

材料および方法

1. 対象雌牛

実験 1 は当大学付属牧場で飼養している正常に発情周期が確認できたホルスタイン種 15 頭 (平均月齢 39.2 ± 3.8 平均産歴 1.7 ± 0.2) を実験に用いた。また、実験 2 は当大学付属牧場で飼養している黒毛和種 9 頭とホルスタイン種未受胎牛 5 頭 (受胎牛: 平均月齢 64.4 ± 18.8 平均産歴 3.4 ± 1.3 不受胎牛: 平均月齢 67.1 ± 14.9 平均産歴 2.6 ± 0.9) を実験に用いた。これらのウシは、ホルスタイン種、黒毛和種共に日中は放牧場にて自由採食、朝・夕方に当牧場で作成したサイレージを与えて管理している。血液採取は東京農業大学の実験動物委員会の承認を得て行った。

2. 血漿成分の測定

血漿中の NEFA と TG, グルコース濃度は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) のキット (ラボアッセイ™, NEFA ラボアッセイ™ トリグリセライド, ラボアッセイ™ グルコース) を、LDH の吸光度はタカラバイオ株式会社の乳酸脱水素酵素測定キット (LDH Cytotoxicity Detection kit) を用いて測定した。方法は添付のプロトコールに従い、測定は 2 回測定した平均値を用いた。

3. ミトコンドリア由来細胞外 DNA (cf-mtDNA) コピー数の測定

血漿は DNase RNase free 水 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で 400 倍希釈した。希釈倍率は血漿由来タンパクが反応を阻害しない濃度を前実験にて決定した。DNA の抽出は (Kansaku ら 2018) の方法に従い抽出液 (最終濃度, 20mmol/L トリス塩酸, 0.9% Nonidet P-40, 0.9% Tween-20, Proteinase K 200 µg/ml, pH 7.8) と希釈血漿を等量混合し、55℃で 30 分、98℃で 5 分処理し冷蔵保存した。

PCR は KAPA SYBER (KAPA Biosystems) を用いて、CFX Connect リアルタイム PCR 機 (Bio-Rad, CA, USA) にて行った。プライマーのデザインはウシミトコンドリアゲノム配列 (NC_006853.1) を基に 1626-1706 の部分 81 bp を対象に primer3 plus を用いて設計した forward : 5'-accctgtaccttttgcacat-3', reverse : 5'-tctggtttcggtgcttag-3' を用いた。PCR の条件は 95℃で 3 分後、97℃で 5 秒、60℃で 10 秒の 2 ステップを 40 回繰り返した。絶対定量のため PCR 産物をベクター (PCR-Blunt2-TOPO) に組み込み、シーケンスにて配列を確認したもので 10 倍希釈系列を作成してスタンダードと

して用いた。すべての反応効率 は 2.0-1.97 であった。

4. 実験 1 分娩後の cf-mtDNA 変動と血液性状との関係

血液性状として NEFA, TG, LDH, グルコースを測定し、リアルタイム PCR で測定した cf-mtDNA 量と相関を調べた。血液採取は、対象牛 15 頭 (全頭ホルスタイン種) から分娩前 30 日～分娩後 60 日までの間の計 11 回、給餌後 2 時間以内に、尾静脈より採取した。血液はヘパリン処理し、3000rpm で 20 分間の遠心分離により血漿化し、これを実験に用いた。採血間隔は 30 日, 3 日前, 4 日, 11 日, 20 日, 30 日, 33 日, 37 日, 44 日, 51 日そして 60 日後とした。

5. 実験 2 人工授精時の血液性状と cf-mtDNA 量と妊孕性

対象牛 14 頭に対して、人工授精時 (授精直後) の静脈血を尾静脈より採取し、実験 1 と同様の方法で血漿化したのち、性状の測定を行った。さらに cfDNA を抽出し、cf-mtDNA をリアルタイム PCR 法で測定した。また人工授精は定法により、妊娠鑑定は授精後 60 日目に胎膜触診と超音波診断にて行った。測定した血液性状と cf-mtDNA は受胎と不受胎のウシ間で比較した。

6. 統計解析

測定した各項目間の相関係数はエクセルに付属の CORREL 関数を用いて測定した。また 2 区間の比較には Welch の t-test を用い $P < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

乳牛 15 頭の分娩 30 日前から 60 日後までの血漿中 NEFA 濃度を図 1A に示す。分娩 30 日前と比較し、分娩 3 日前から分娩 51 日後までは有意に高い値となった ($P < 0.05$)。その後分娩 60 日後には有意差がなくなり、同等の値に低下した。血漿中 TG 濃度 (図 1B) は分娩 30 日前と比較し、分娩 4 日以降において有意に低くなりそのまま低値で推移した ($P < 0.05$)。血漿中 LDH の吸光度 (図 1C) は、分娩 30 日後から分娩 51 日後までは有意に高い値となった ($P < 0.05$)。その後分娩 60 日後には有意差がなくなり、同等の値に低下した。血漿中グルコース濃度 (図 1D) は、分娩後緩やかに上昇し、分娩後 33 日以降、分娩前 30 日に比べて有意に高い値となった ($P < 0.05$)。そして血漿中 cf-mtDNA コピー数 (図 1E) は分娩 30 日前と比較し、分娩 4 日後から有意に高い値となった ($P < 0.05$)。各値の平均値間の相関関係の結果を図 2 に示した。cf-mtDNA コピー数が増加すると LDH が増加する正の相関関係が認められた (図 2A, $P < 0.05$)。一方で、グルコース濃度と LDH 間に正の相関、cf-mtDNA コピー数と TG 濃度間、TG 濃度と LDH 間そしてグルコース濃度と NEFA 濃度の間に負の相関関係 (図 2B-E, $P < 0.05$) が認められた。その他の組み合わせである cf-mtDNA と NEFA およびグルコース間には相関が

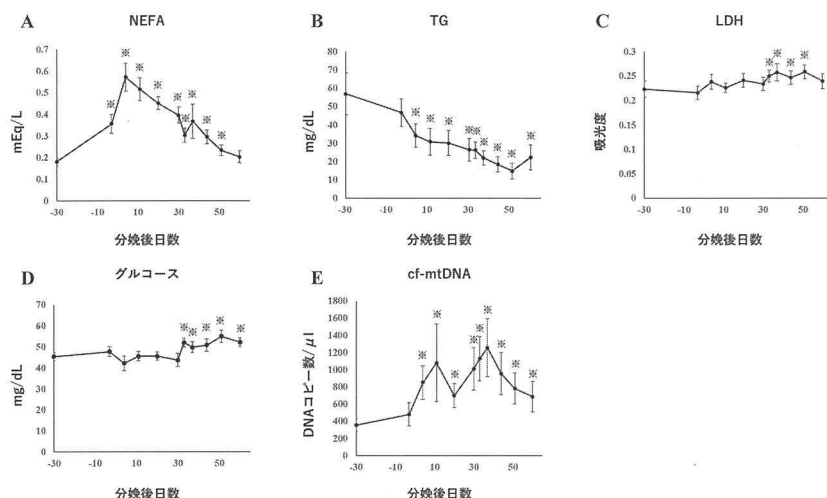


図 1 分娩前後の血漿中成分値の推移

ホルスタイン種 15 頭の血漿中の成分値 (NEFA, TG, LDH, グルコース, cf-mtDNA) を測定し、日数ごとの平均値と標準誤差を示した。A は NEFA 濃度の推移を、B は TG 濃度の推移を、C は LDH の吸光度の推移を、D はグルコース濃度の推移を、そして E は cf-mtDNA コピー数の推移を示している。縦軸は測定値を、横軸は分娩日を 0 とした日数を表している。※は分娩 30 日前 (−30) と比較し有意差があり ($P < 0.05$)。

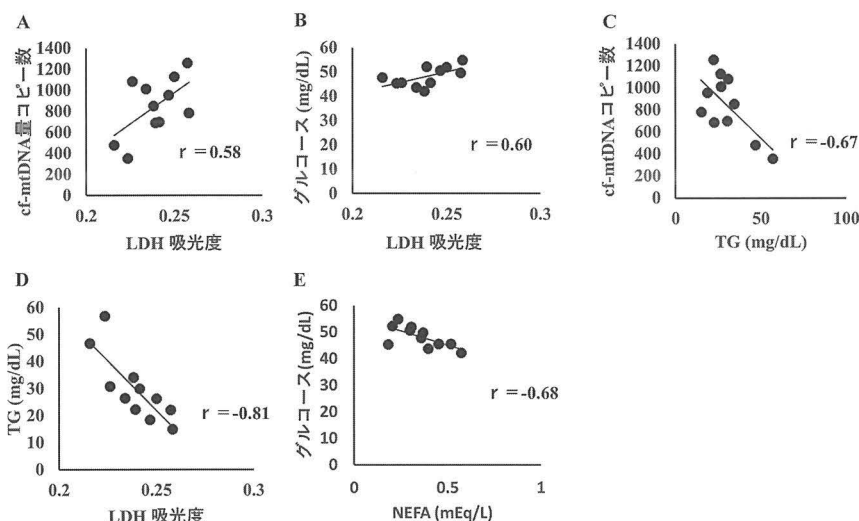


図 2 血液性状間の相関関係

ホルスタイン種 15 頭の測定値の平均値をもとめ各項目間の相関係数を算出した。有意な相関が認められた項目を図に示す。A：血漿中 cf-mtDNA コピー数（縦軸）と LDH の吸光度（横軸）。両者の間に正の相関有り ($P < 0.05$)。B：血漿中グルコース濃度（縦軸）と LDH の吸光度（横軸）。両者の間に正の相関有り。C：血漿中 cf-mtDNA コピー数（縦軸）と TG 濃度（横軸）。両者の間に負の相関有り。D：血漿中 TG 濃度と LDH の吸光度（横軸）。両者の間に負の相関関係有り。E：血漿中グルコース濃度（縦軸）と NEFA 濃度（横軸）。両者の間に負の相関有り。

認められなかった (図 3)。

ウシ 14 頭の人工授精時の血液性状と cf-mtDNA コピー数を表 1 に示した。非妊娠の個体と比較し、妊娠した個体の血漿中 NEFA 濃度は有意に高い値となった ($P < 0.05$)。一方で cf-mtDNA コピー数は、受胎の成否によ

る差は認められなかった。また 14 頭にはホルスタイン種 5 頭と黒毛和種 9 頭で構成されるため、品種間ごとで比較したがすべての項目で差がなく、品種ごとに分けて受胎・不受胎間の比較を行ったところ、NEFA および cf-mtDNA では妊娠牛が兩種とも非妊娠に比べて値が高いものの、有

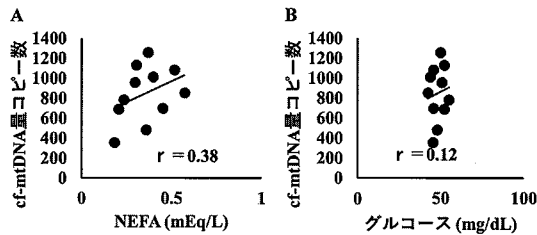


図3 cf-mtDNA コピー数とその他血液性状間の相関関係

ホルスタイン種 15 頭の測定値の平均値をもとめ各項目間の相関係数を算出した。有意な相関が認められなかった項目を図に示す。A：血漿中 cf-mtDNA コピー数（縦軸）と NEFA 濃度（横軸）。両者の間に相関なし。B：血漿中 cf-mtDNA コピー数（縦軸）とグルコース濃度（横軸）。両者の間に相関なし。

有意差はなかった（ホルスタイン種 vs. 黒毛和種, NEFA, 0.17 ± 0.02 vs. 0.17 ± 0.02 ; cf-mtDNA, $4,657.15 \pm 1,469.45$ vs. $2,814.81 \pm 808.60$, ホルスタイン種受胎 vs. 不受胎, NEFA, 0.21 ± 0.01 vs. 0.12 ± 0.01 ; cf-mtDNA, $5,609.30 \pm 2,169.98$ vs. $3,228.92 \pm 1,100.31$, 黒毛和種受胎 vs. 不受胎, NEFA, 0.19 ± 0.01 vs. 0.15 ± 0.02 ; cf-mtDNA, $3,537.10 \pm 1,126.52$ vs. $2,236.97 \pm 463.10$).

考 察

本実験では、リアルタイム PCR 法を用いて測定した cfDNA 量が、分娩前後の生理状態が著しく変化する時期において大きく変動すること、この値が血漿成分の LDH と正の相関が、TG 濃度と負の相関関係にあることが認められた。一方で人工授精による受胎牛と非受胎牛の間には cfDNA 量に有意な差は観察されなかった。

分娩前後で血液性状は大きく変化することは一般に知られているが実験 1 においても血液性状の変化が確認できた。血漿中 NEFA 濃度は分娩後の脂肪動員により上昇することがこれまで報告されている (Monteiro ら 2017; McCarthy ら 2016)。また、分娩後の NEFA 濃度の上昇は急激な泌乳開始に伴う脂肪動員が関係していることが報告されている (Kunz ら 1985)。我々の試験においても分娩後、有意な NEFA 濃度の上昇が認められたが、この値と cfDNA には相関が認められなかった。血漿中の TG 濃度は、分娩後、泌乳開始とともに低下することが報告されている (Nowroozi-Asl と Aarabi 2016)。本研究では同様の変動を確認し、この値は、cf-mtDNA コピー数と負の相関が認められた。これまでの既報では、血漿中 TG 濃度が減少する個体は高泌乳であることが示唆されており (木村ら 1993)、母体への負荷の高さを cf-mtDNA 量が反映していると考えられる。

血中の LDH 量は一般的に、動物の体内での炎症などの指標として用いられている。また乳牛に過剰排卵などの処

表 1 人工授精の後の受胎の成否と血液性状および cf-mtDNA コピー数

検査項目	受胎牛 (n = 7)	不受胎牛 (n = 7)
NEFA (mEq/L)	0.20 ± 0.01^a	0.14 ± 0.01^b
TG (mg/dL)	17.63 ± 10.46	16.20 ± 6.11
グルコース (mg/dL)	49.64 ± 5.79	47.07 ± 4.85
LDH (吸光度)	0.98 ± 0.04	0.93 ± 0.03
cf-mtDNA (copy)	4425.19 ± 1195.28	2520.39 ± 486.76

受胎牛 7 頭と不受胎牛 7 頭の血液性状と血漿 1 μ l 中の cf-mtDNA コピー数を示した。a-b 間は有意差有り。値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示す。

理を加えると血中の LDH が上昇するという報告もある (Hwang ら 2013)。我々の試験では分娩後 30 日後にゆるやかな上昇が認められた。Wall ら (2015) は乳牛では血中 LDH 濃度には大きな変化が観察されないと報告しており、今回の結果とは異なっている。彼らの報告既報では変化がない理由として血中 LDH が乳中に排出されているからと考察されているが、異なった報告の原因には使用したウシや牧場の環境にあるのではないかと推測している。一方で血中の LDH を cf-mtDNA 量と比べた場合、両者には正の相関が認められた。一般に LDH は細胞傷害を測定する指標として広く用いられており、様々な細胞動物種において利用されている (Kaja ら 2017; Decker と Lohmann-Matthes 1988)。また我々はブタの顆粒層細胞の培養において、膜電位喪失剤でミトコンドリアに障害を与えた場合、cf-mtDNA が増えること (Kansaku ら 2019)、胞状卵胞内で顆粒層細胞のアポトーシス率と卵胞液中 cf-mtDNA 量に正の相関があることを報告しており (Ichikawa ら 2020)、これら LDH と cf-mtDNA 間で正の相関が認められたことから、cf-mtDNA 量は分娩後の母体の細胞や組織に何らかの障害があり、これにより血中に cf-mtDNA が放出されることが考えられる。この LDH は前述の TG と負の相関が認められたことから、体内で起る細胞の炎症や機能不全が多いと cfDNA が高く、TG が低いという関係が予想されるが、今後この点は確認する必要がある。

最後に cfDNA とウシの妊孕性の関係を明らかにするために、人工授精後の妊娠の可否と授精時の血漿中成分を比較した。血漿成分では NEFA 濃度が受胎牛群において高くなっていた。低 NEFA 値は慢性的なエネルギー不足の指標とされているが、今回の測定では他の成分値を測ることが出来なかったため栄養生理を評価する他項目について再確認する必要がある。また cf-mtDNA の量は受胎牛と

不受胎牛の二区間で比較した結果では有意差が見られなかった。本実験では付属農場内の限られた数のウシを使った検討であったため、品種、産歴や分娩後の日数に大きなばらつきがあり、斉一な牛群を用いた大規模な検討が必要であると考えられる。

本研究では、血漿中の cf-mtDNA 量が分娩後大きく変動することや、血液中の LDH や TG など特定の成分濃度と関連がある事が示されたが、妊孕性との相関は見られなかった。

文 献

- Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Luber B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong SM, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SK, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih IM, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorescu D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang TL, Weingart JD, Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Diaz LA Jr. 2014. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science Translational Medicine* **6** (224), 224ra24.
- Chou JS, Jacobson JD, Patton WC, King A, Chan PJ. 2004. Modified isocratic capillary electrophoresis detection of cell-free DNA in semen. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **21** (11), 397-400.
- Decker T, Lohmann-Matthes ML. 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods* **115** (1), 61-69.
- Desmet KL, Van Hoeck V, Gagné D, Fournier E, Thakur A, O'Doherty AM, Walsh CP, Sirard MA, Bols PE, Leroy JL. 2016. Exposure of bovine oocytes and embryos to elevated non-esterified fatty acid concentrations : integration of epigenetic and transcriptomic signatures in resultant blastocysts. *BMC Genomics* **17** (1), 1004.
- Dimopoulou M, Anifandis G, Messini CI, Dafopoulos K, Kouris S, Sotiriou S, Satra M, Vamvakopoulos N, Messinis IE. 2014. Follicular fluid oocyte/cumulus-free DNA concentrations as a potential biomolecular marker of embryo quality and IVF outcome. *BioMed Research International* **2014**, 289306.
- Hart EA, Patton WC, Jacobson JD, King A, Corselli J, Chan PJ. 2005. Luteal phase serum cell-free DNA as a marker of failed pregnancy after assisted reproductive technology. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **22** (5), 213-217.
- Hwang SJ, Cho TH, Kim IS. 2013. In vivo gene activity of human mesenchymal stem cells after scaffold-mediated local transplantation. *Tissue Engineering Part A* **20** (17-18), 2350-2364.
- Ichikawa K, Shibahara H, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. 2020. Cell-free DNA content in follicular fluid : a marker for the developmental ability of porcine oocytes. *Reproductive Medicine and Biology* **19** (1), 95-103.
- 家畜改良事業団. 2015. 受胎調査成績. [homepage on the Internet]. 一般社団法人家畜改良事業団家畜改良技術研究所, 群馬; [cited on 8 December 2019]. Available from URL : <http://liaj.or.jp/giken/hanshoku/jyutai.html>
- Kansaku K, Munakata Y, Itami N, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. 2018. Mitochondrial dysfunction in cumulus-oocyte complexes increases cell-free mitochondrial DNA. *Journal of Reproduction and Development* **64** (3), 261-266.
- Kansaku K, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. 2019. Mitochondrial cell-free DNA secreted from porcine granulosa cells. *Zygote* **27** (5), 272-278.
- Kaja S, Payne AJ, Naumchuk Y, Koulen P. 2017. Quantification of Lactate Dehydrogenase for Cell Viability Testing Using Cell Lines and Primary Cultured Astrocytes. *Protocols in Toxicology* **2**, 72:2.26.1-2.26.10.
- 木村容子, 新井一博, 湊 和之, 阿部伸司, 野呂明弘. 1993. 高泌乳牛の各泌乳期における生乳, 血液および第一胃液成分の変動. *日本獣医師会雑誌* **46**, 385-391.
- Kunz PL, Blum JW, Hart IC, Bickel H, Landis J. 1985. Effects of different energy intakes before and after calving on food intake, performance and blood hormones and metabolites in dairy cows. *Animal Science* **40** (2), 219-231.
- Leroy JL, Rizos D, Sturmey R, Bossaert P, Gutierrez-Adan A, Van Hoeck V, Valckx S, Bols PE. 2011. Intrafollicular conditions as a major link between maternal metabolism and oocyte quality : a focus on dairy cow fertility. *Reproduction, Fertility and Development* **24** (1), 1-12.
- McCarthy MM, Yasui T, Felipe MJ, Overton TR. 2016. Associations between the degree of early lactation inflammation and performance, metabolism, and immune function in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **99** (1), 680-700.
- Monteiro APA, Bernard JK, Guo JR, Weng XS, Emanuele S, Davis R, Dahl GE, Tao S. 2017. Effects of feeding betaine-containing liquid supplement to transition dairy cows. *Journal of Dairy Science* **100** (2), 1063-1071.
- Nowroozi-Asl A, Aarabi N, Rowshan-Ghasrodashti A. 2016. Ghrelin and its correlation with leptin, energy related metabolites and thyroidal hormones in dairy cows in transitional period. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **19** (1), 197-204.
- Van Hoeck V, Bols PE, Binelli M, Leroy JL. 2014. Reduced oocyte and embryo quality in response to elevated non-esterified fatty acid concentrations: a possible pathway to subfertility? *Animal Reproduction Science* **149** (1-2), 19-29.
- Wall SK, Gross JJ, Kessler EC, Villez K, Bruckmaier RM. 2015. Blood-derived proteins in milk at start of lactation : Indicators of active or passive transfer. *Journal of Dairy Science* **98** (11), 7748-7756.

Cell free mitochondrial DNA in plasma and physical condition of cows

Tatsuo NOGUCHI¹, Takuro AIZAWA² and Hisataka IWATA²

¹ Tokyo University of Agriculture, Fuji Farm, Fujinomiya 418-0109, Japan

² Tokyo University of Agriculture, Atsugi 243-0034, Japan

Corresponding : Hisataka IWATA (e-mail : h1iwata@nodai.ac.jp)

Blood contains cell free DNA (cfDNA), and cell free mitochondrial DNA(cf-mtDNA) is able to be easily detected by real time PCR. The present study investigated the relationship between the amount of cf-mtDNA in plasma and physiological conditions of cows. In addition, relationship between pregnancy following artificial insemination and concentration of cf-mtDNA in the corresponding plasma. Significantly positive relationship was found between concentration of LDH and cf-mtDNA, and negative relationship was found between concentration of triglyceride and cf-mtDNA. There was no significant difference in the amount of cf-mtDNA between pregnant or non-pregnant cows following artificial insemination.

Nihon Chikusan Gakkaiho 91 (3), 227-232, 2020

Key words : cell free-DNA, cows, mitochondria, plasma.