



北海道大学



日本中央競馬会
特別振興資金助成事業

0

精漿タンパク質を活用した子宮機能異常の解消

— 乳牛の受胎成績改善への応用 —

北海道大学 大学院獣医学研究院
臨床獣医科学分野 繁殖学教室

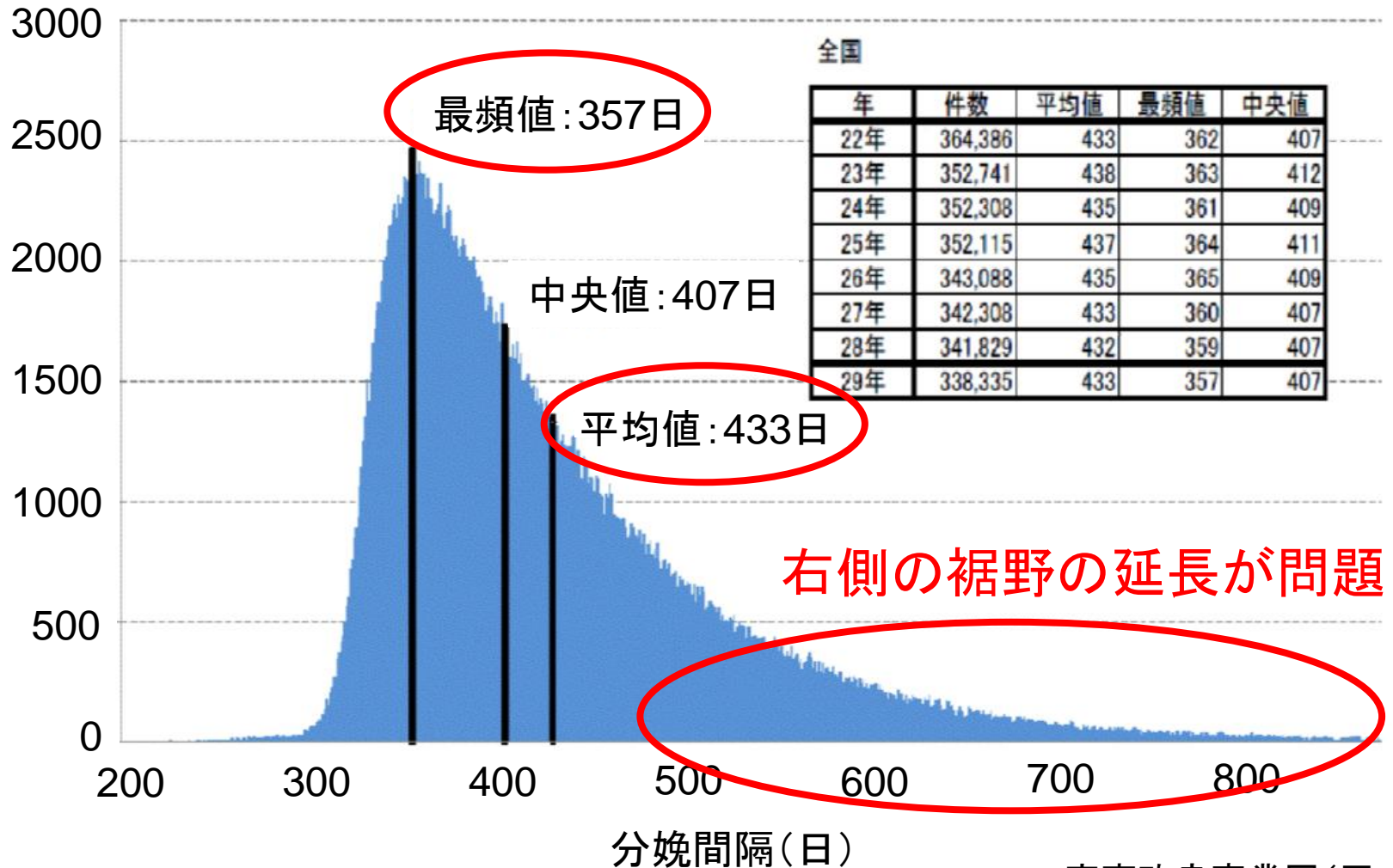
教授 片桐 成二

2009年9月5日



わが国の乳牛の分娩間隔の分布

(頭)



リピートブリーディング(低受胎)の考え方

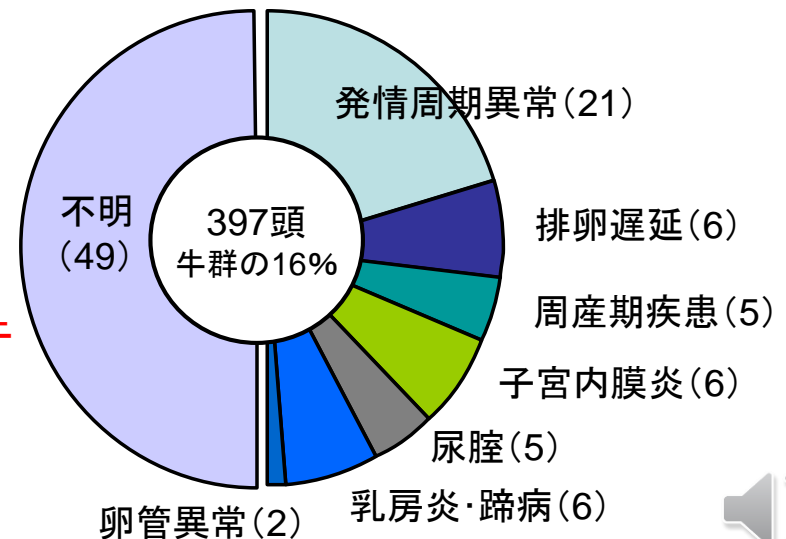
リピートブリーダー(低受胎)牛の定義

臨床症状、生殖器、発情周期の異常がないにもかかわらず
3回以上交配しても受胎しない牛

- リピートブリーダー牛 ≠ 長期不受胎牛
- = 不妊原因を特定できない不妊牛

3回以上交配しても妊娠しない
乳牛2,480頭の不妊原因の内訳
(北海道内18農場) 片桐(2004)

リピートブリーダー牛
198頭(8%)

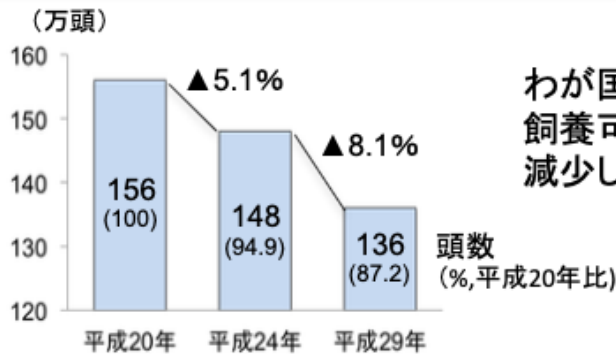


本事業のねらい

目的

早期淘汰の対象となるリピートブリーダー（低受胎）牛を繁殖可能な健康牛のプールに戻す技術を開発する

背景



わが国の乳牛の飼養可能頭数は減少している

(H27家畜改良増殖目標)

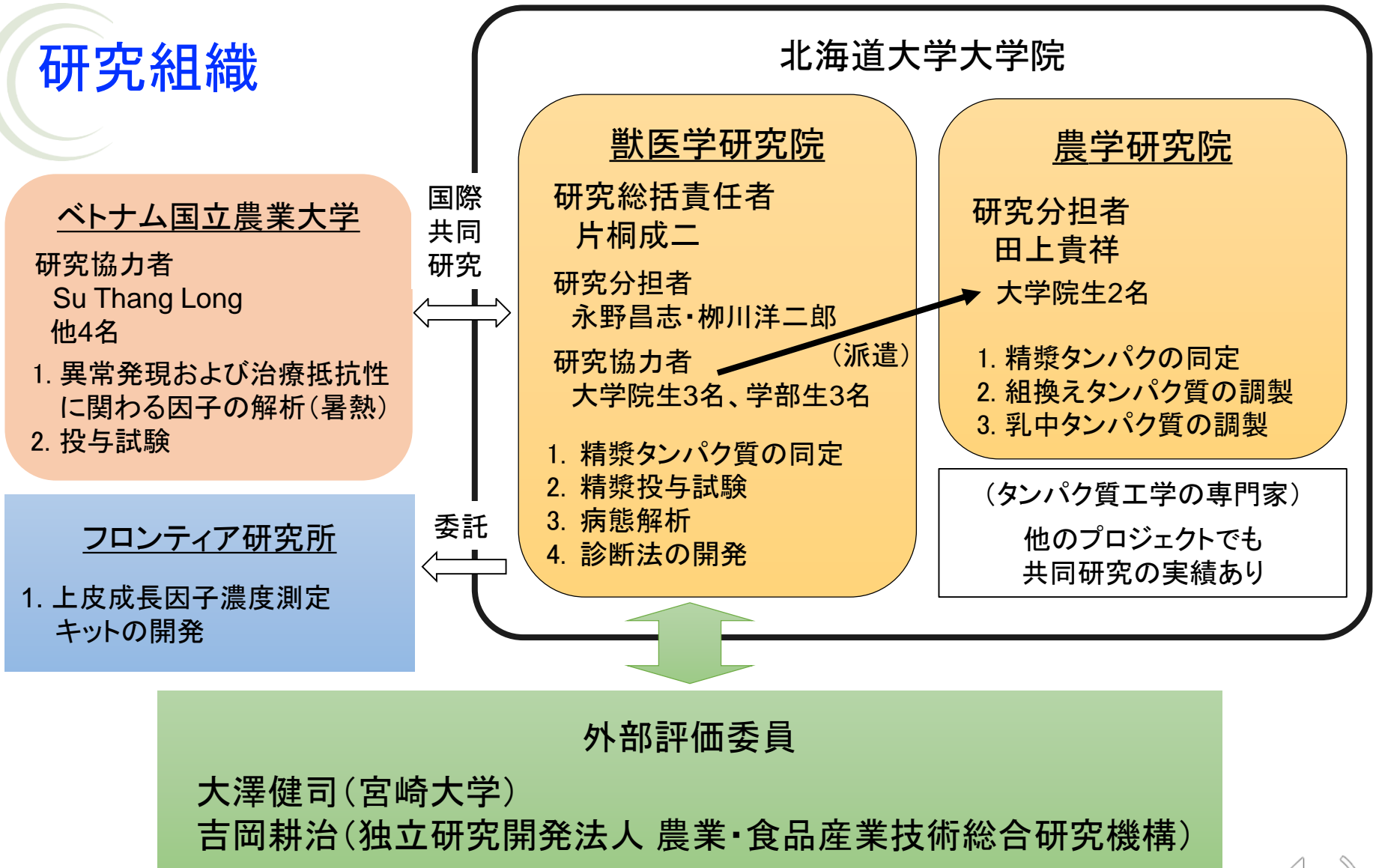
持続可能な酪農業の基盤

- ・効率的な後継牛の生産
- ・供用年数の延長
 - 疾病予防
 - 低受胎牛対策

- 低受胎牛の妊娠率を20%向上させる
- 分娩間隔を15日間短縮する

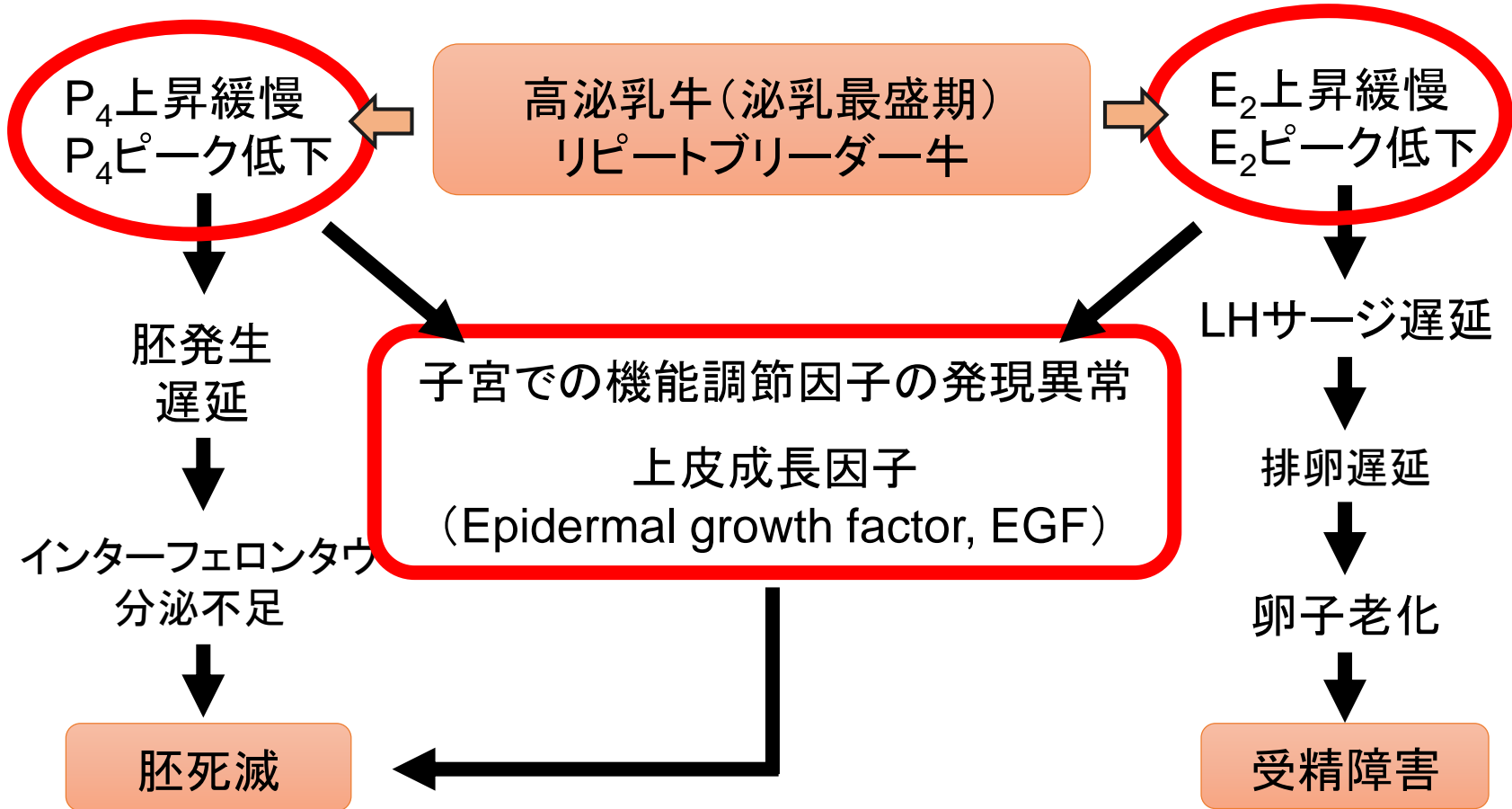


研究組織



子宮機能異常による受胎性低下の仮説

- 卵巣機能のゆがみが子宮機能の異常として顕在化

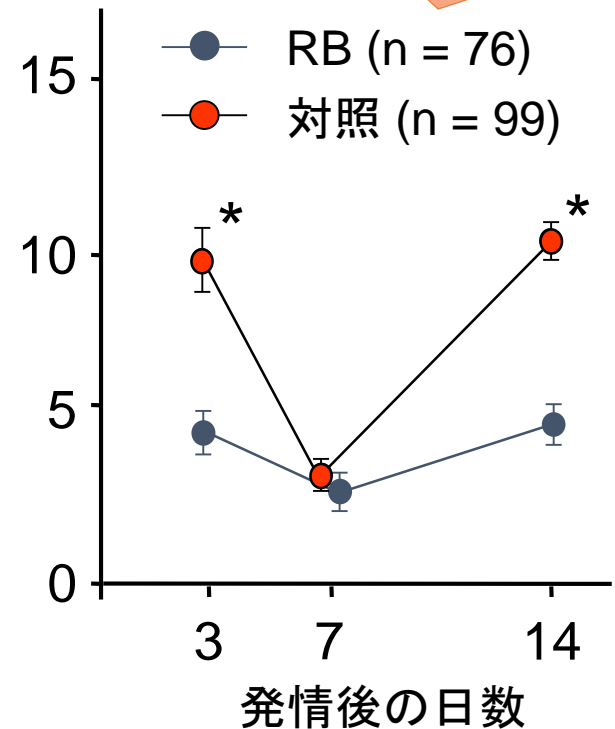
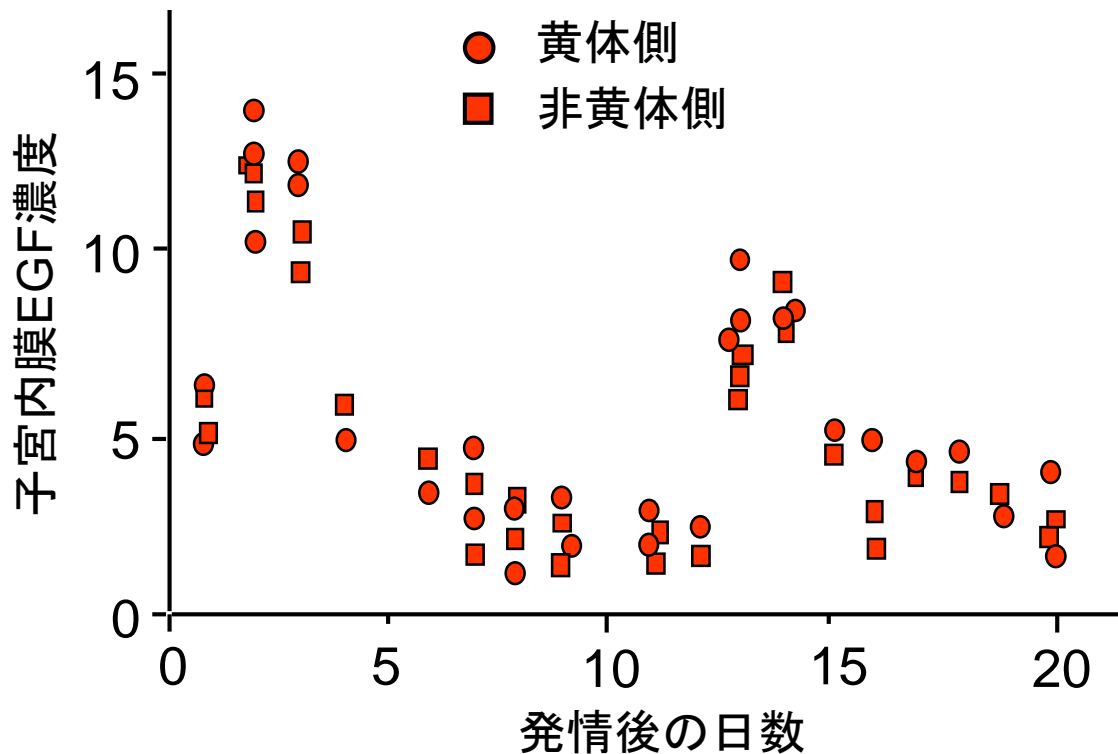


牛の子宮内膜EGF濃度変化とRB牛にみられる異常

- 正常牛では2回のピークを持つ周期的変化
- RB牛では約70%でピークが消失または低下

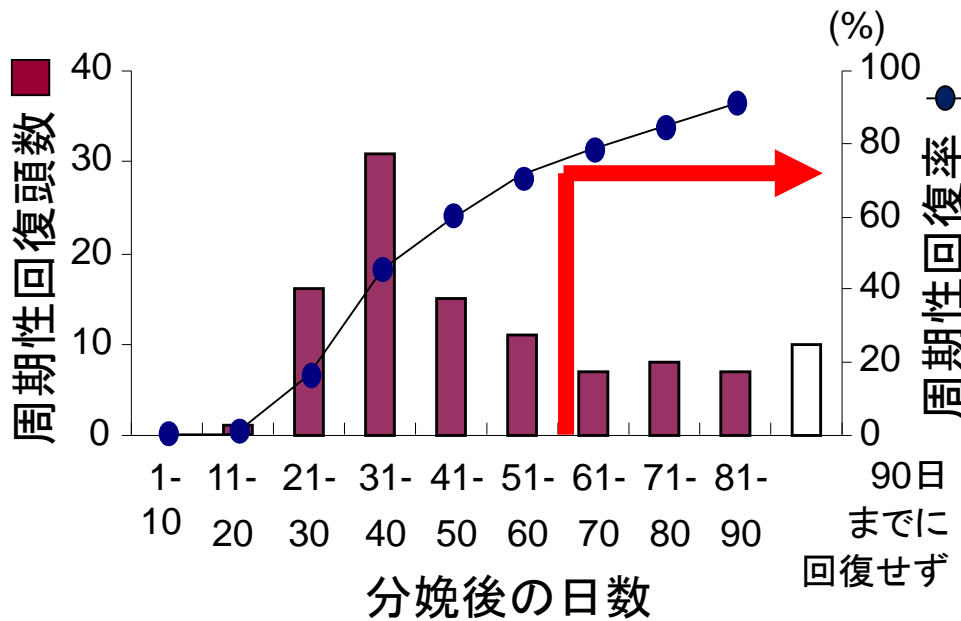
EGF濃度	頭数(%)
正常	22 (29)
異常	54 (71)

(ng/g 組織重量)

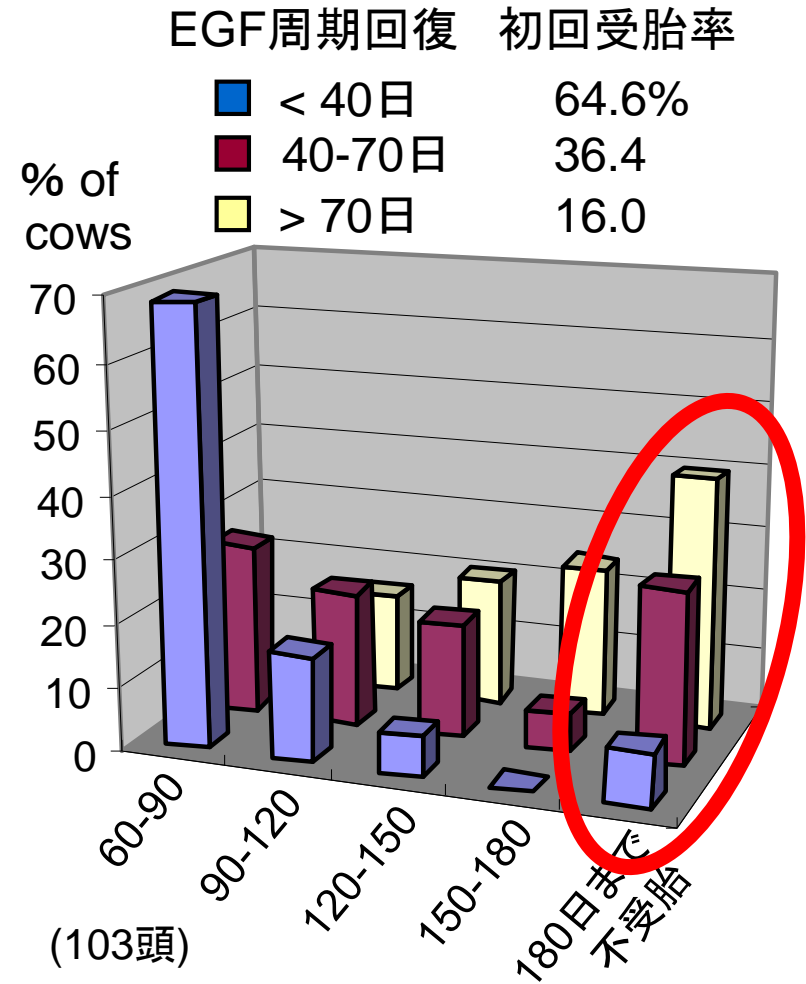


上皮成長因子(EGF)の濃度異常の発生状況

- 60日までの回復率は約75%
- 回復の遅れる牛は受胎せずRB牛となる



ホルスタイン種経産牛106頭
片桐 (2005) 獣医学会にデータを追加



発情後3日目の子宮内膜EGF濃度と胚移植の成績

- 子宮内膜EGF濃度ピークの低下は受胎性の低下につながる

EGF濃度 (ng/g組織重量)	頭数(%)	受胎(%)	
< 2.5	23 (5.3)	11 (47.8) ^a	
2.5 – 5.0	64 (14.6)	18 (28.1) ^a	33.3%
5.0 – 7.5	109 (24.9)	66 (60.6) ^{ab}	
7.5 – 10.0	110 (25.2)	94 (85.5) ^b	
10.0 – 12.5	97 (22.2)	82 (84.5) ^b	
12.5 <	34 (7.8)	27 (79.4) ^b	76.9%
合計	437 (100)	298 (68.2)	

黒毛和種 (310)、ホルスタイン (87)、F1 + 不明 (40)
Katagiri (2007)



ホルモン製剤による治療成績

- EGF濃度ピークの回復した牛では受胎性も回復する

処理	EGF 周期性	頭数 (%)	妊娠率 (%)		妊娠 頭数 (%)
			1 st AI	2 nd まで	
無処理(対照)	正常	4 (13)	25	50	5 (17)
	異常	26 (87)	4	12	
CIDR+1 mg EB	正常	9 (30)	78	89	12 (40)
	異常	21 (70)	10	19	
CIDR+5 mg EB	正常	20 (67)*	60	85*	20 (67)*
	異常	10 (33)	0	30	
合計	正常	33 (37)	61	82 ^a	37 (41)
	異常	57 (63)	5	18 ^b	

各群30頭 Katagiri & Takahashi (2008)



妊娠成立に関わる精漿の役割

人：性交とART(AIおよびIVF-ET)後の受胎率

マウス、ラット：胚発育、胎盤形成、着床率、胎子成長

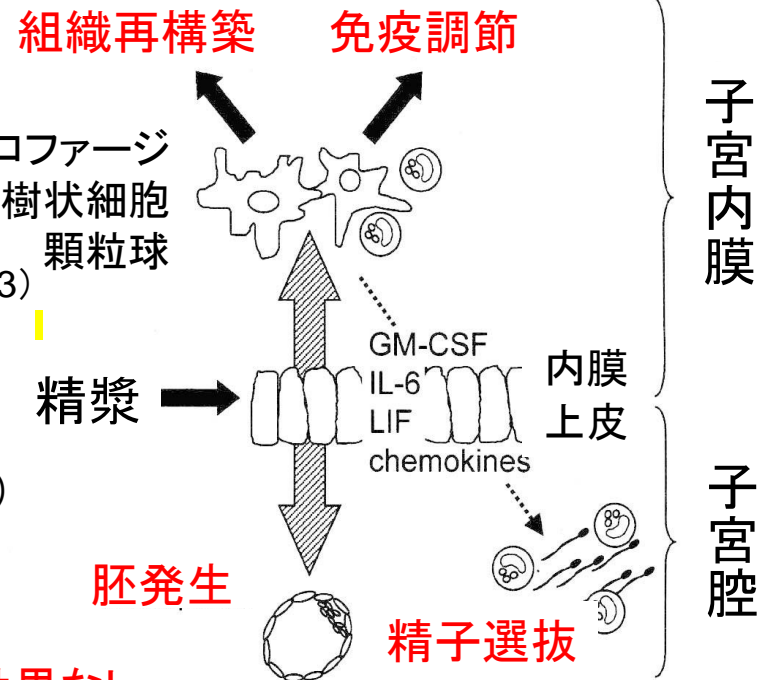
豚：受胎率、産子数

馬：子宮内膜炎抑制

牛精漿中の受胎関連タンパク質

= 受胎率の高い精液に多く含まれるタンパク質
(Killian et al., 1993)

- ・ リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素 (L-PGDS)
- ・ トランスフォーミング増殖因子- β_1 (TGF- β_1)
- ・ オステオポンチン(OPN)



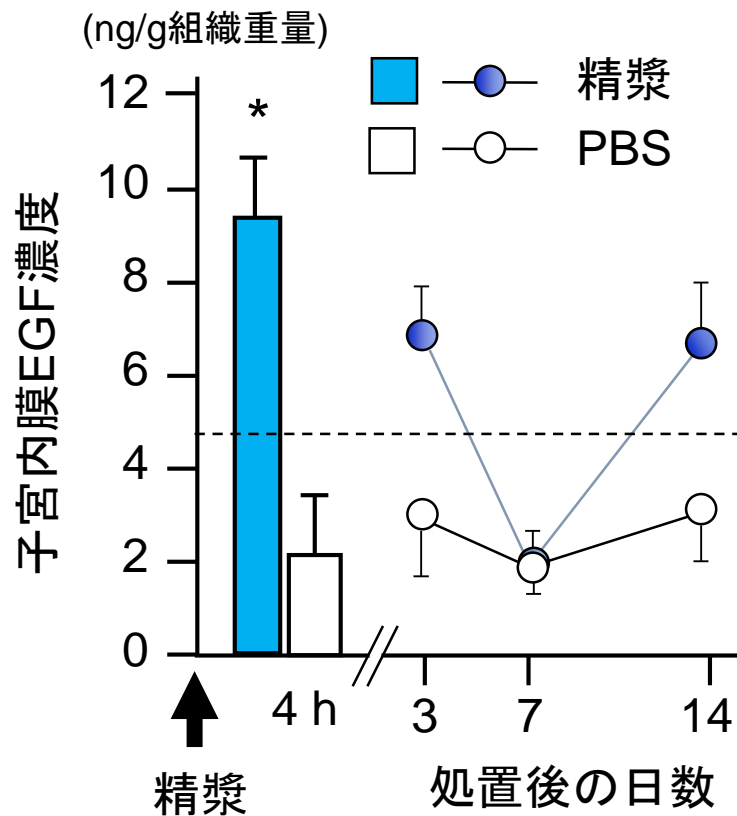
- 牛では精漿の子宮内投与による受胎性改善効果なし

Robertson (2005)



精漿投与によるEGF濃度異常の解消と受胎性回復

- 精漿の腔内投与は子宮のEGF濃度を正常化し受胎性を回復させる

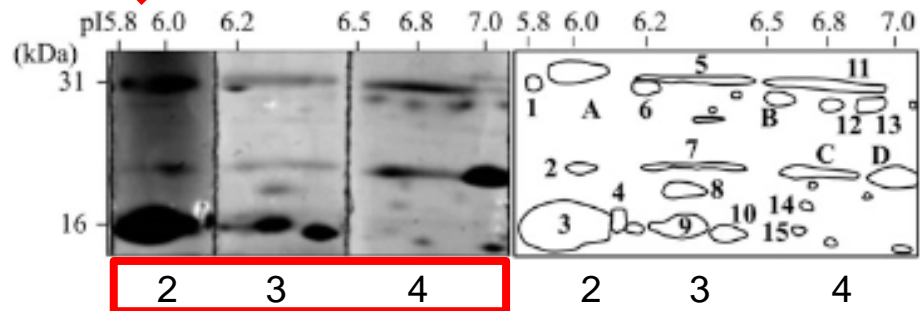
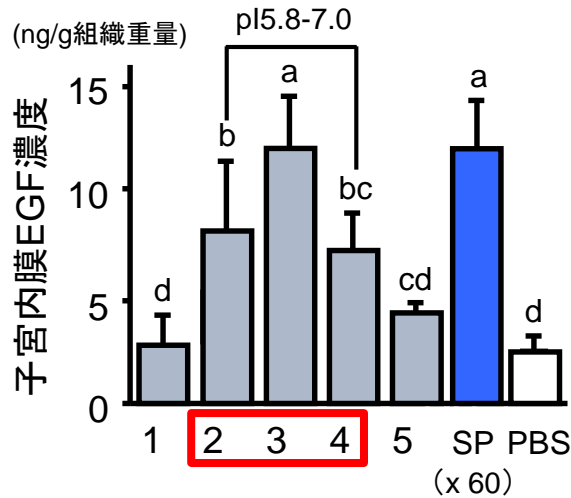
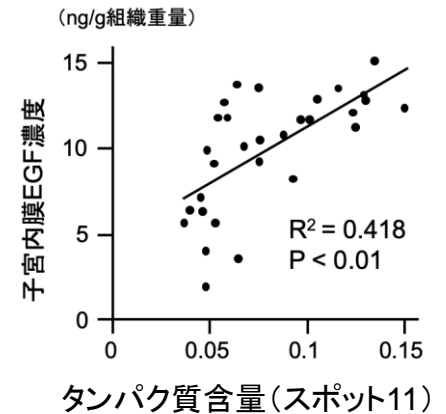
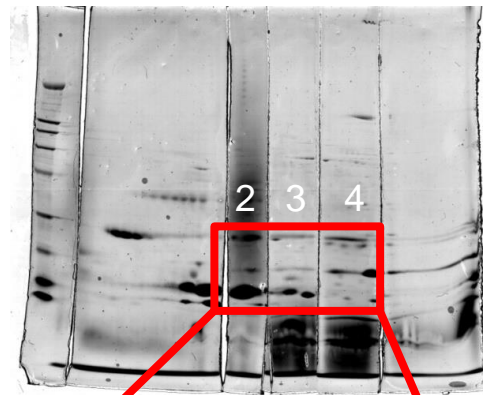
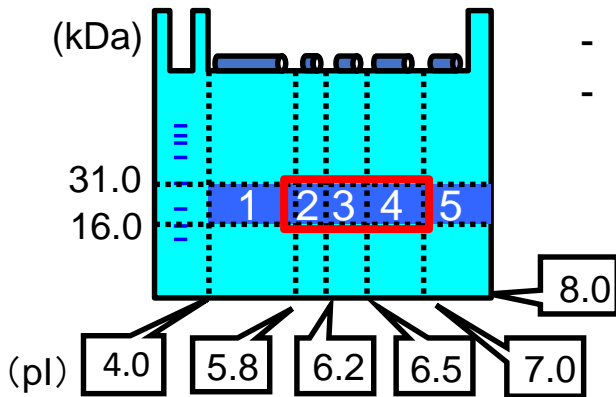


群	EGF濃度	頭数 (%)	妊娠率 (%)
精漿 (36)	正常	21 (58.3) ^A	13 (61.9) ^a
	低下	15 (41.7)	3 (20.0) ^b
	合計	36 (100)	16 (44.4) ^A
PBS (31)	正常	7 (22.6) ^B	3 (42.9)
	低下	24 (77.4)	3 (12.5)
	合計	31 (100)	6 (19.4) ^B

Katagiri et al. (2010)

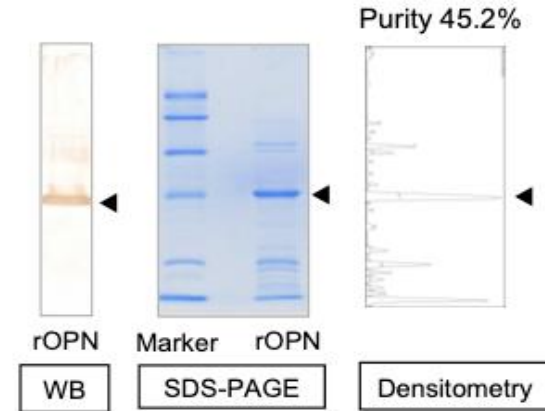
精漿タンパク質の分離と同定

- 16k-31kDa, pI5.8-7.0にEGF濃度を正常化する活性
- RB牛への投与試験によりスポット11に高い活性
- アミノ酸フィンガープリンティングによりオステオポンチンと同定



遺伝子組換えオステオポンチン(rOPN)による治療成績

- 合成牛オステオポンチンcDNA(コドン最適化)
- Host: E coli Rosetta (DE3)
- ウェスタンブロッティング
- アミノ酸フィンガープリンティング

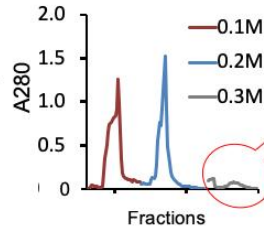
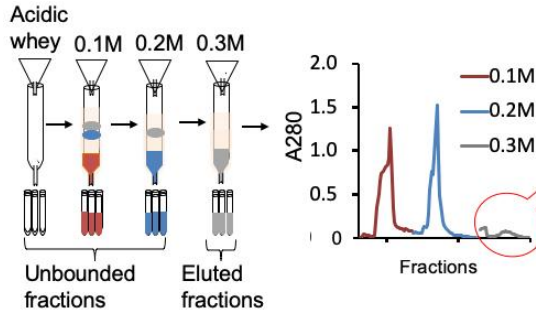


rOPN(1 mg)による子宮内膜EGF濃度の正常化と受胎性回復効果

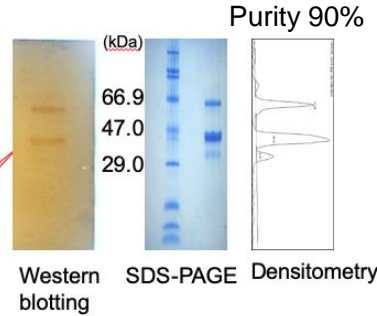
試料	治療後のEGF濃度	頭数	正常化率 (%)	授精頭数	受胎頭数 (%)	受胎率 (%)
PBS (74)	正常	23	31.1 ^a	12	6 (50.0)	8/25 (32.0)
	低下	51		13	2 (15.4)	
精漿 (84)	正常	50	59.5 ^b	21	13 (61.9) ^a	16/36 (44.4)
	低下	34		15	3 (20.0) ^b	
rOPN (91)	正常	51	56.0 ^b	18	14 (77.8) ^a	17/36 (47.2)
	低下	40		18	3 (16.7) ^b	

乳中オステオポンチン(mOPN)による治療成績

イオン交換クロマトグラフィー



ウェスタンブロッティング



アミノ酸フィンガープリンティング

Coverage- 55% to bOPN

```

MRIAIVCFLLGTASALPVKPTSSGSSEEKQLNNKY
PDAVATWLKPDPSQKQTFLLAPQNSVSSSEETDDNK
QNTLPSKSNESPEQTDLDDDDDDNSQDVNSNDSDD
AETDDDPDHSDESHHSDESDEVDFTDIPTIAVFTP
FIPTESANDGRGDSVAYGLKSRSKKFRSNVQSPD
ATEEDFTSHIESEEMHDAPKKTSQLTDHSHKETNSS
ELSKELTPKAKDKNKHSNLIESQENSKLSQEFHLSLE
DKLDDLHKSEEDKHLKIRISHELDSASSEVN
    
```

mOPN(1 mg)による子宮内膜EGF濃度の正常化と受胎性回復効果

試料	治療後のEGF濃度	頭数	正常化率 (%)	授精頭数	受胎頭数 (%)	受胎率 (%)
PBS (49)	正常	11	22.4 ^a	11	5 (45.4)	10/45 (22.2) ^a
	低下	38		34	5 (14.7)	
精漿 (118)	正常	72	61.0 ^b	72	55 (46.6) ^a	64/118 (54.2) ^b
	低下	46		46	9 (7.6) ^b	
mOPN (80)	正常	44	55.0 ^b	30	17 (56.7) ^a	20/46 (43.5) ^b
	低下	36		16	3 (18.7) ^b	

a,b 同群間で差異あり
P < 0.05

EGF濃度異常による受胎性低下に関わる因子

高泌乳、品種、暑熱、肥満などは：

- 異常の発生頻度を高める
- 治療への抵抗性を誘導する

高泌乳

- 未経産 < 経産
- 高泌乳
(ピーク > 50 kg/日)

品種

- ホルスタイン
- 黒毛和種

肥満

- BCS > 4.0
(EGF異常約40%)
- 高アンドロジェン血症
耐糖性低下

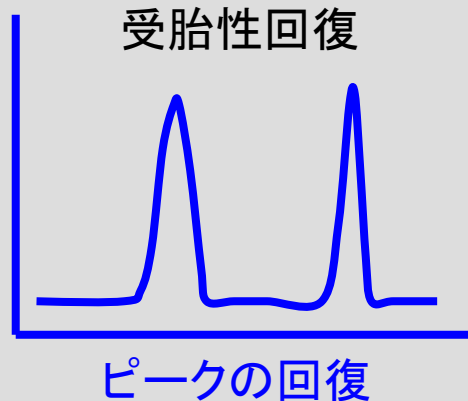
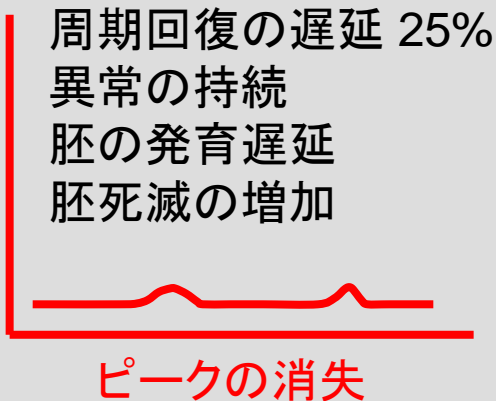
暑熱

- 発情日の高体温
(39.5以上)

受胎性の低い牛：RB牛および高泌乳牛

rOPN
mOPN

EGF正常化: 70%
受胎: 50-60%



暑熱とEGF濃度異常の発生および治療抵抗性の関係

直腸温 発情日 3日目		供試 頭数	EGF濃度* 異常発生率	小計	移植 頭数	受胎率	小計
高	高	18	66.7	64.1 ^a	12	25.0	26.7 ^a
高	低	21	61.9	(25/39)	18	27.8	(8/30)
低	高	16	31.3	30.0 ^b	15	46.7	51.4 ^b
低	低	24	29.2	(12/40)	22	54.5	(19/37)

高 > 39.5°C、低 < 39.5°C未満

群	時期	頭数	正常化 (%)	受胎 (%)
治療	6~9月	21	5 (23.8) ^a	7 (33.3) ^a
	10~1月	20	14 (70.0) ^{bA}	15 (75.0) ^{bA}
無処置	6~9月	23	4 (17.4)	4 (17.4)
	10~1月	16	2 (12.5) ^B	5 (31.3) ^B

abおよびAB P < 0.05

本事業のまとめ — 目標の達成状況

リピートブリーダー(低受胎)牛の約20%を繁殖可能な健康牛のプールに戻す技術を開発できた

- ✓ EGF濃度測定系の簡易化
- ✓ 精漿タンパク質による受胎促進効果の確認
- ✓ 活性を持つ精漿中のタンパク質の同定:オステオポンチン
- ✓ 組換えオステオポンチンの作成、乳由来オステオポンチンの精製
- ✓ 調製試料の効果を確認

以上により本事業の目標であった以下の2点を達成できた

- ✓ 低受胎牛の妊娠率を20%向上させる: 20%→42.2%
- ✓ 分娩間隔を15日間短縮する: 19日間短縮(試験実施11農場での試算)



本事業の成果による論文や解説記事

解説記事(4件)

1. 片桐成二. 乳牛の繁殖学に関する最近の知見 -子宮機能異常による低受胎とその対策-. 九州実験動物雑誌 35:53-58, 2019
2. 片桐成二(座長). 座談会: 炎症性子宮疾患と低受胎対策への取り組み. 臨床獣医4月号, 12-33, 2018
3. 片桐成二. 子宮からのアプローチ: 上皮成長因子と妊娠率 -新しい牛の繁殖 -新技術の現場応用と近未来への展望-. 臨床獣医臨時増刊号, 102-106, 2017
4. 山岸修一, 藤井貴志, 森安 悟, 陰山聡一, 平山博樹, 片桐成二. 普及と研究が連携した受胎率向上技術の経済効果試算方法. 農業普及研究Hokkaido 43:1-7, 2017

学術論文(3件)

1. Sugiura T, Akiyoshi S, Inoue F, Yanagawa Y, Moriyoshi M, Tajima M, Katagiri S. Relationship between bovine endometrial thickness and plasma progesterone and estradiol concentrations in natural and induced estrus. J Reprod Dev 64:135-143, 2018
2. Badrakh D, Shirasawa A, Yanagawa Y, Nagano M, Katagiri S. Identification of bovine seminal plasma proteins with an activity to normalize endometrial epidermal growth factor concentrations in repeat breeder cows. Jpn J Vet Res 68:91-103, 2020
3. Badrakh D, Yanagawa Y, Nagano M, Katagiri S. Effect of seminal plasma infusion into the vagina on the normalization of the endometrial epidermal growth factor concentrations and fertility in repeat breeder dairy cows. J Reprod Dev 66:149-154, 2020

学会発表(招待講演)(5件)

1. Katagiri S. Repeat breeding: the cause and the possible treatment to restore fertility. The 17th International Conference on Production Diseases in Farm Animals, June 2019, Bern, Switzerland
2. Katagiri S. Repeat breeding caused by uterine dysfunction and its treatment. The 24th Annual Meeting of Korean Association for Buiatrics, June 2019, Daejeon, Korea
3. 片桐成二. 精漿蛋白による子宮機能調節とその低受胎対策への応用. シンポジウム 精子および精漿による雌の繁殖機能調節, 第112回日本繁殖生物学会 令和元年9月、札幌
4. 田上貴祥. 治療試験用オステオポンチンの調製と野外試験の現状. シンポジウム1. 精子および精漿による雌の繁殖機能調節, 第112回日本繁殖生物学会 令和元年9月、札幌
5. 片桐成二. 乳牛の繁殖学に関する最近の知見. 第38回日本実験動物技術者協会・九州支部研究発表会および第36回九州実験動物研究会総会. 平成30年11月

学会発表(一般講演)(3件)

1. 佐藤弘子, Hay Mar Kyaw, 柳川洋二郎, 永野昌志, 田上貴祥, 片桐成二. 組換えオステオポンチンによる牛子宮内膜上皮成長因子濃度の正常化効果の検証. 第112回日本繁殖生物学会 令和元年9月、札幌
2. 河野光平, 柳川洋二郎, Nattapong Ninpetch, 永野昌志, 片桐成二. 乳牛の子宮内膜組織血流量に影響を及ぼす因子の解析. 第162回日本獣医学会学術集会, 令和元年9月、つくば
3. 河野光平, 柳川洋二郎, Nattapong Ninpetch, 坂口謙一郎, 菅野智裕, 鳥居佳子, 植芝滉己, 宮本祥代, 永野昌志, 片桐成二. 乳牛における暑熱ストレスと子宮内膜上皮成長因子濃度異常との関係および暑熱の子宮内環境への影響評価のための子宮内温度と子宮内膜血流量の測定法の検討. 第163回日本獣医学会学術集会, 平成30年9月、つくば

新聞記事(2件)

1. 日本農業新聞 不受胎牛 精漿を使い治療 北大などキット開発、実証へ(2019年7月11日)
2. 北海道新聞 牛の受胎率改善 精漿中のタンパク質で 北大など臨床試験へ(2019年8月17日)



今後の展開

オステオポンチンを用いた治療処置の実用化

1. 組換えタンパク質の調製と製剤化
2. 乳由来オステオポンチンの活用
 - 1) 商業的に調製されたオステオポンチンの利用
 - 2) 低受胎牛の乳からオステオポンチンを調製して活用

子宮でのEGF濃度異常の病態解明と予防への取り組み

1. 高泌乳、暑熱、肥満が分娩後のEGF濃度の周期的変化の回復を阻害する機序
2. 治療抵抗性を示す機序



ここまでの研究に関わった方々に感謝いたします

高橋 芳幸 先生(北海道大学名誉教授)

森好 政晴 先生(酪農学園大学)

杉浦 智親 先生(酪農学園大学)

臨床現場の獣医師および農家の方々

一般社団法人 ジェネティクス北海道

地方独立行政法人 北海道立総合研究機構畜産試験場

学生および大学院生

(北海道大学)

山下傑夫, 福井秀樹, 中田剛司, 松田(矢野)恵理, 中田(奥村)嘉子,
高江洲 昇, 金子絵美, 高見野枝, 白澤篤, Dagvajamnt Badrak, 谷田孝志,
Nattapon Ninpetch, Hay Mar Kayw, 佐藤弘子、河野光平

(酪農学園大学)

久田学, 笹崎真史, 澤田恵理奈, 野元拓哉, 鳥居住佳子(現北海道大学)

