

乳牛における分娩後の栄養代謝状態，  
乳生産および繁殖性と出生子牛の  
発育および栄養代謝状態に及ぼす要因解析  
— 妊娠末期の栄養代謝状態と遺伝子多型 —

平成 25 年  
(2013)

畜産衛生学専攻 博士前期課程 2 年  
動物医科学コース 家畜生産衛生学分野

宗像 めぐみ

(主指導：川島 千帆)

Analysis of factors affecting the postpartum metabolic  
status, milk production and fertility in dairy cow,  
and growth and metabolic state in their calf  
—Metabolic status during late gestation and gene polymorphism—

2013

Megumi Munakata

Master course of Animal and Food Hygiene

Graduate School of Obihiro University

## 目次

I. 緒論.....	1
II. 材料および方法.....	4
試験 1：乳牛における妊娠末期のインスリン感受性と分娩後の栄養代謝状態，乳生産および繁殖性と出生子牛の発育と血液性状との関連性.....	4
試験 2：GHR-SNP と母牛の分娩後における栄養代謝状態，乳量および繁殖性と子牛における発育および血液性状との関連性...	10
III. 結果.....	14
試験 1：乳牛における妊娠末期のインスリン感受性と分娩後の栄養代謝状態，乳生産および繁殖性と出生子牛の発育と血液性状との関連性.....	14
試験 2：GHR-SNP と母牛の分娩後における栄養代謝状態，乳量および繁殖性と子牛における発育および血液性状との関連性...	19
IV. 考察.....	22
V. 結論.....	29
VI. 謝辞.....	30
VII. 参考文献.....	32
VIII. 図および表.....	41
IX. 要約.....	61

## I. 緒論

一般的に、哺乳類の雌の妊娠期の内分泌や代謝のさまざまな変化は、胎盤を通して、直接的に胎子に影響を与える[1]. その中でも母体の糖代謝の生理的变化は特殊である[1]. 妊娠期ではインスリン分泌が亢進され、高インスリン血症傾向となる[1]. 一方で、母体の末梢組織は胎子の成長を支えるため、インスリン抵抗性 (Insulin Resistance ; IR) を持つようになる[2, 3]. IR とは、体内組織においてインスリンへの感受性が低下する生理状態のことである[4]. 両者の間には均衡が保たれ、正常な代謝状態が維持されることによって、胎子の子宮内発育に好条件の環境が作られている[1]. しかし、ヒトや乳牛において、IR と耐糖異常、ケトン体血症、ケトン体尿症のようないくつかの代謝異常との関連が報告されている[5]. また乳牛では、他の哺乳動物に比べ、乳量の多さがさらに IR を悪化させており、このことが、分娩後の乳生産エネルギーに比べ飼料からの摂取エネルギーが下回る負のエネルギーバランス (Negative Energy Balance ; NEB) の期間を長引かせるかもしれないと指摘されている[6, 7]. 過度の NEB は、分娩後の卵巣機能の回復遅延や発情兆候の微弱化を引き起こし、受胎率の低下を招いている[8, 9]. また、胎子の成長軸は胎盤を介した栄養供給によって調節されるため、母体の栄養状態に強く影響を受ける[10]. ヒトでは、妊娠中の低栄養状態は、その子の将来の成人病の罹患率を上昇させるという報告がされている[11]. またラットでは、妊娠中の低蛋白給餌は胎子期や出生後の発育に関わらず、産子の生殖能力低下や成人病発症の要因となる血管の機能低下を引き起こしたことが示されている[12]. 肉牛においては、妊娠中期の低蛋白給餌が胎子の骨格筋のインスリン様成長因子 (Insulin like growth factor ; IGF)

受容体 mRNA 発現量を増加させ、出生後の筋肉量に影響を及ぼすことが報告されている[13]. このように妊娠期の栄養代謝状態は、分娩後のエネルギー状態や繁殖成績、出生子牛の発育に関係があることは事実だが、乳牛においてこれらの関係を調査した報告は少なく、特に IR についての研究はほとんどない.

一方、一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism ; SNP) のような遺伝形質にも個々の特定の機能を潜在的に変化させる可能性がある. SNP とは、アミノ酸やタンパク質合成の基になる塩基の 1 つが他の塩基に変異していることをいう (図 1). 近年ヒトでは、母性遺伝することが知られているミトコンドリア DNA の SNP は、肥満のしやすさやがんの転移能に影響を与えているという報告もある[14, 15]. また、ヒトにおいて SNP は、肥満症やインスリン感受性と関与し、血漿レプチン濃度を上昇させるという報告がある[16]. ウシにおいても近年研究が進んでいる. 成牛では、IGF-1 が泌乳[17]や繁殖機能[18-20]を促進しており、IGF-1 は成長ホルモン (Growth Hormone ; GH) の刺激により GH 受容体 (GH receptor ; GHR) を介して産生されるが[21]、この GHR に SNP の存在が確認されている. そして、ウシ GHR-SNP の一部では乳量と乳質[22, 23]や繁殖機能[24]との関連性が報告されている. また、3 つのウシ GHR-SNP において血中 IGF-1 濃度との関連性も報告されている[25]. 子牛にとって、IGF-1 は主に細胞の増殖や肥大を促進し、タンパク質合成、筋肉合成促進、脂肪分解促進、骨密度増加、インスリン感度改善に働き、成長に不可欠な因子である[17]. したがって、GHR-SNP も分娩後の生産性や出生子牛の発育に関与しているかもしれない.

そこで本試験では、乳牛において妊娠末期のインスリン感受性試験による

IR の強さと、GHR-SNP のどちらが、分娩後の栄養代謝状態、乳量、繁殖成績および出生子牛の発育と血液性状に強く影響を及ぼすかを調査した。

## II. 材料と方法

試験 1 乳牛における妊娠末期のインスリン感受性と分娩後の栄養代謝状態，乳生産および繁殖性と出生子牛の発育と血液性状との関連性

### 1. 試験農場

本試験は，帯広畜産大学畜産フィールド科学センターにおいて行った。

### 2. 試験期間

試験期間は，2011年9月1日から2012年9月18日とした。

### 3. 供試家畜

試験農場で飼育されているホルスタイン種経産牛 50 頭を用いた。試験開始時の産次数の平均値および標準誤差（Standard error of the mean ; S.E.M.）は， $2.4 \pm 0.2$  産であった。

### 4. 飼養管理

供試家畜は，分娩予定日 3 週間前から乾乳後期用牛舎で飼養した。分娩予定日 10 日前から毎日体温を測定し，前日の体温より  $0.5^{\circ}\text{C}$  以上の低下が確認された時点で，特別管理牛舎内の分娩房へ移動させた。分娩後は，分娩後 6 日目まで特別管理牛舎で飼養した。その後は，搾乳牛用フリーストール牛舎で飼養した。試験期間を通じて，グラスサイレージとコーンサイレージ主体の全混合飼料（Total mixed ration ; TMR）を給与し，乾乳牛は上記の TMR に乾乳牛用配合飼料を給与した。分娩後は，乳量に合わせて搾乳牛

用の配合飼料を給与した。乾草と鉱塩および水は自由摂取させた。出生後の雄子牛は生後 1 週間の初乳期間後に外部に売り払われ、雌子牛については、初乳期間後、ロボット哺乳舎で飼育された。生後 1 週間は特別管理牛舎で個別に管理し、2ℓ のミルクを朝夕の 1 日 2 回給与した。その後は、ロボット哺乳舎で群管理し、1ℓ のミルクを 4 時間おきに 1 日 4 回給与した。

## 5. 試料採取

分娩予定日 3 週間前から分娩後 3 週間目まで週 2 回、尾静脈からの採血を行い、同時にボディコンディションスコア (Body Condition Score; BCS) とルーメンフィルスコア (Rumen Fill Score; RFS) および臍部の深さを測定した。採血管は、血清採取用に市販の 9mL 分離剤入りプレイン真空採血管 (滅菌済みベノジェクト®II 真空採血管, テルモ株式会社, 東京), 血漿採取用に、上記の 9mL 分離剤入りプレイン真空採血管に 200 $\mu$ L の抗凝固剤 (0.3M EDTA, 1% アセチルサリチル酸, pH7.4) を添加したものをそれぞれ使用した。出生子牛において出生直後に採血と体重測定を行い、加えて雌子牛は離乳までの間、週 1 回体重を測定した。血液を採取した採血管は、速やかに氷水に浸して実験室に持ち帰った。血清採取用採血管を 38 $^{\circ}$ C の温水中で 10 分間加温し、フィブリンを析出させた後、遠心分離 (3500rpm, 4 $^{\circ}$ C) を 15 分間行った。血漿採取用採血管は、そのまま遠心分離 (3500rpm, 4 $^{\circ}$ C), を 15 分間行った。血清および血漿は測定まで -30 $^{\circ}$ C で冷凍保存した。さらに、分娩後 1 ヶ月以降は、初回人工授精 (Artificial Insemination; AI) 後 3 週間まで、AI されなかった牛は分娩後 4 ヶ月まで、週 2 回乳サンプルを夕方搾乳時に採取した。乳サンプルは、採取後遠心分離 (3500rpm, 4 $^{\circ}$ C) を 15 分間行い、乳清を採取し、測定まで -30 $^{\circ}$ C で冷凍保存した。

## 6. インスリン感受性試験 (Insulin tolerance test : ITT)

ITT は分娩予定日の 3 週間前に行った。インスリンはノボリン®R 注 100IU/ml (ノボノルディスク ファーマ株式会社) を用いた。投与量は体重あたり 0.05IU とし, ITT の開始前日に体重を測定し, インスリン投与量を決定した。インスリン投与は給餌 2 時間前の午前 8 時頃に行い, 4ml のヘパリン処理された生理食塩液 (100IU/ml, 大塚生食注, 大塚製薬株式会社, 東京) にインスリンを溶解したものをトップエクステンションチューブ (X2-L100, 株式会社トップ, 東京) を用いて頸静脈から投与し, 投与後さらにカテーテル内に残ったインスリンを流し込むため, 2ml の生理食塩水を投与した。血中グルコース濃度を測定するために, インスリン投与前 (0 分), 投与後 30 分, 45 分そして 60 分に尾静脈から血液を採取した。採血管は上記の血漿用と同様のものを用いた。

## 7. IR の評価法

インスリン投与に対する①反応の速さと②反応の強さについて IR を評価した。

### ①反応の速さ

インスリン投与後の血中グルコース濃度が最低になった時間で分類した。

### ②反応の強さの評価

インスリン投与後の血中グルコース濃度の最低値が投与前の 50% 以上の牛と 50% 未満の牛に分類した。

## 8. 分娩後の卵巣機能回復日の定義

血漿中および乳中プロジェステロン（Progesterone ; P4）濃度が 1.0ng/ml を超えた場合を，機能的な黄体が存在するとし[26]，分娩後初めて血漿および乳中 P4 濃度が 1.0ng/ml をこえた日を卵巣機能回復日とした。

## 9. 繁殖管理

分娩後 40 日目から，直腸検査または超音波画像診断装置で卵巣観察を行った。分娩後 60 日以降に発情行動が観察された牛や，膣鏡検査で発情兆候がみられた牛に AI を行った。

## 10. 血液成分の測定方法

### ①血清中代謝物濃度

血清中代謝物濃度測定には，自動化学分析装置（TBA-120FR，東芝メディカルシステムズ株式会社，栃木）を用いた。

### ②血漿中代謝ホルモン濃度

i ) IGF-1 : Biotin-streptavidin 法を利用した二抗体法（Enzyme immunoassay ; EIA）を用いて測定した[27]。濃度測定における標準曲線の範囲は 0.34-50ng/mL，ED50 は 4.8ng/mL，測定内変動係数は 5.7%であった。測定間変動係数は 7.3%であった。

ii ) GH : Biotin-streptavidin 法を利用した二抗体法を用いて測定した[27]。濃度測定における標準曲線の範囲は 0.78-100ng/mL，ED50 は 3.1ng/mL，測定内変動係数は 8.2%であった。測定間変動係数

は 8.9%だった.

iii) インスリン: Bovine Insulin ELISA (MRD: 10-1131-01; Merckodia, Uppsala, Sweden) のキットを用いた.

iv) P4 濃度: ジエチルエーテルによって抽出した後, 二抗体法で測定した[28]. 標準曲線の範囲は, 0.05-50ng/mL, ED50 は 0.78ng/mL, 測定内変動は 6.0%, 測定間変動は 9.2%だった. なお, 抽出率は 90%であった.

## 11. BCS, RFS, 臍部の深さの測定方法

### ①BCS

BCS の測定には, [29]の方法を用いた.

### ②RFS

RFS は, 牛体の左後方から観察し, 臍部の張り具合によって, 「ほとんど採食できていない状態 (1)」から「十分に採食できている状態 (5)」までの 5 段階にスコアリングした[30].

### ③臍部の深さ

肩端と腰角を結んだ線に対し, 第 3 腰椎と第 4 腰椎の間から垂直に下ろした交点に独自に作成した測定器を重ね, 臍部に対して垂直に定規を当て, 最も深い部位を二か所測定し, 平均値を用いた (図 2).

## 12. 解析項目

### ①BCS

### ②RFS

### ③臍部の深さ

④血清中代謝物濃度

グルコース，β-ヒドロキシ酪酸 (β-hydroxybutyrate acid ; BHBA)，γ-グルタミルトランスペプチターゼ (γ-glutamyl transepeptidase ; GGT)，アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (Aspartate aminotoransferase ; AST)，遊離脂肪酸 (Non-esterified fatty acid ; NEFA)，総コレステロール (Total cholesterol ; T-cho) 濃度

⑤血漿中代謝ホルモン濃度

IGF-1，GH，インスリン濃度

⑥産歴および分娩状況

i) 産歴

ii) 分娩予定日とのずれ

iii) 分娩難易度

1 : 自然分娩，2 : 軽い介助，3 : 2. 3 人の助産，4 : 難産，5 : 外科処置または母牛死亡として難易度を評価した.

⑦分娩後の卵巢機能回復と授精

i) 分娩後の卵巢機能回復日

ii) 初回 AI までの日数

ii) 初回 AI 受胎率

⑧乳量

i) 7-100 日総乳量

試験農場の月乳量表の日乳量を基に，初乳期間 (7 日間) を除外し分娩後 7 日目から 100 日目までの日乳量を合算して求めた.

ii) 7-100 日平均日乳量

上記の 7-100 日総乳量から平均日乳量を求めた。

⑨子牛の体重と血液性状

- i) 出生子牛全頭の生時体重
- ii) 雌子牛の哺乳期間の体重と日増体量
- iii) 血漿中代謝ホルモン濃度  
インスリン, GH, IGF-1 濃度
- iv) 血清中代謝物濃度  
グルコース濃度

### 13. 統計解析

母牛において、分娩前と分娩後で、それぞれ独立に統計処理を行った。分娩日を 0 日とし、分娩後 0-6 日を 0 週とした。各血中ホルモン濃度、代謝物濃度、BCS, RFS と臍部の深さ、雌子牛の哺乳期間の体重は反復測定分散分析を行った。時間と群の間に交互作用が認められた場合は、各時点での比較を対応なしの Student's t 検定を行った。初回 AI 受胎率についてはカイ二乗検定を行った。その他のデータは対応なしの Student's t 検定を実施した。P<0.05 を有意差ありとし、 $0.05 \leq P < 0.1$  を傾向ありとし、データは全て、平均±S.E.M で表した。

## 試験 2 GHR-SNP と母牛の分娩後における栄養代謝状態、乳量および繁殖性と子牛における発育および血液性状との関連性

### 1. 試験農場

試験 1 と同様であった。

## 2. 供試家畜

母牛における GHR-SNP の解析のために、試験 1 で用いたホルスタイン種乳牛 (n=50) を用いた。子牛における GHR-SNP の解析には試験 1 の雌子牛 (n=21) を用いた。

## 3. 試料採取

試験 1 と同様に行った。

## 4. 遺伝子型同定

血液からゲノム DNA を抽出し、ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction ; PCR) 制限断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism ; RFLP) 法を用いて遺伝子型を同定した。本研究の PCR-RFLP 法で使用したウシ GHR 遺伝子の 318bpDNA 断片の増幅のためにプライマーとして FWD : CTGGCGTATGGTCTTTGTCA, REV : TGGTCTTGCTGCTTTCCTAT を用いた。

全 PCR 反応は、1 $\mu$ l ゲノム DNA, 100mM プライマー0.24 $\mu$ l, 10 $\times$ PCR バッファー2.5 $\mu$ l, dNTPs2 $\mu$ l, Taq ポリメラーゼ 1 単位を用い、25 $\mu$ l の量で行った。PCR プロトコールは最初の変性を 95 $^{\circ}$ C で 5 分間行い、次に 95 $^{\circ}$ C で 1 分間の変性、54 $^{\circ}$ C で 1 分間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C で 1 分間の伸長を 40 サイクル行い、最後の伸長は 72 $^{\circ}$ C で 7 分間行った。PCR 産物は NsiI 制限酵素 (BioLabs inc.) の 1 単位を用い 37 $^{\circ}$ C で 3 時間処理した。制限断片は、2%アガロースゲル電気泳動で分離した後、エチジウムブロマイドを用いて染色、紫外線光下で可視化し、撮像装置で解析した。

## 5. 分娩後の卵巣機能回復の定義と繁殖管理

試験 1 と同様であった。

## 6. 血液成分の測定方法

試験 1 と同様に行った。

## 7. BCS, RFS, 臍部の深さの測定方法

試験 1 と同様に行った。

## 8. 解析項目

①BCS

②RFS

③臍部の深さ

④血清中代謝物濃度

試験 1 と同様の項目について解析した。

⑤血漿中代謝ホルモン濃度

試験 1 と同様の項目について解析した。

⑥産歴および分娩状況

試験 1 と同様の項目について解析した。

⑦分娩後の卵巣機能回復と授精

試験 1 と同様の項目について解析した。

⑧乳量

試験 1 と同様の項目について解析した。

#### ⑨子牛の体重と血液性状

試験 1 と同様の項目について解析した。

### 9. 統計解析

母牛において、分娩前と分娩後で、それぞれ独立に統計処理を行った。分娩日を 0 日とし、分娩後 0-6 日を 0 週とした。各血中ホルモン濃度、代謝物濃度、BCS、RFS、臍部の深さと雌子牛の哺乳期間の体重は反復測定分散分析を行った。交互作用が認められた場合は、各時点での比較を対応なしの Student's t 検定を用いて行った。初回 AI 受胎率についてはカイ二乗検定を行った。その他のデータは対応なしの Student's t 検定を実施した。P<0.05 を有意差ありとし、 $0.05 \leq P < 0.1$  を傾向ありとし、データは全て、平均±S.E.M で表した。

### III. 結果

#### 試験 1 乳牛における妊娠末期のインスリン感受性と分娩後の栄養代謝状態、乳生産および繁殖性と出生子牛の体重と血液性状との関連性

試験牛のうち、分娩が予定日に比べて $\pm 7$ 日以上ずれた牛（6頭）、乳房炎等により途中で淘汰された牛（3頭）、双子分娩の牛（1頭）インスリン感受性試験での採血ミス（3頭）やインスリン投与後の血中インスリン濃度増加が確認されなかった牛（3頭）を除き、計 34 頭を解析に用いた。

##### 1-① インスリンに対する反応の早さの評価

インスリン投与後グルコース濃度が最低値に至った時間が、投与後 30 分の牛は 1 頭、投与後 45 分の牛は 27 頭、投与後 60 分の牛は 6 頭であった。そこで、血中グルコース濃度の最低値が 30 分と 45 分だった牛 28 頭（以下、45 分群）と 60 分だった牛 6 頭（60 分群）の 2 群に分けて解析を行った。

##### ①BCS, RFS, 臍部の深さ

図 3 に分娩 3 週間前から分娩後 3 週目までの BCS, RFS, 臍部の深さを示した。BCS は分娩 3 週間前から分娩 1 週間まで、60 分群が 45 分群に比べ低く推移し ( $P < 0.05$ )、分娩後は 0 週 ( $P < 0.05$ ) と 1 週 ( $P < 0.05$ ) で低かった (図 3)。RFS は、両群間に差はなかったが、臍部の深さは分娩前と分娩後の全ての期間で 60 分群が 45 分群よりも浅かった ( $P < 0.05$ ; 図 3)。

## ②血清中代謝物濃度

図4に分娩3週間前から分娩後3週目までの血清中代謝物濃度を示した。分娩前は、60分群が45分群に比べ、血清中グルコース濃度が低い傾向があった ( $P=0.05$ ; 図4)。分娩後は、60分群が45分群に比べ、血清中NEFA濃度が低く推移し ( $P<0.05$ )、血清中BHBA濃度においても低い傾向があった ( $P=0.09$ ; 図4)。その他の項目において、両群間に差はなかった (図4)。

## ③血漿中代謝ホルモン濃度

図5に分娩3週間前から分娩後3週目までの血漿中代謝ホルモン濃度を示した。血漿中IGF-1濃度において、60分群が45分群に比べ、分娩1週間前で低い傾向があったが ( $P=0.08$ )、そのほかの期間では両群間に差はなかった (図5)。血漿中GHとインスリン濃度には分娩前後ともに両群間に差はなかった (図5)。

## ④分娩状況と繁殖成績

表1に産歴、分娩予定日とのずれ、分娩難易度、分娩後の卵巣機能回復日数、分娩後の初回AI日数と初回AI受胎率を示した。産歴、分娩予定日とのずれ、分娩難易度には両群間に差はなかった (表1)。分娩後の卵巣機能の回復日数は、60分群が45分群に比べ短かったが ( $P<0.05$ )、初回AI日数には差がなく、また初回AI受胎率にも差はなかった (表1)。

## ⑧乳量

表2に分娩後7-100日総乳量と7-100日平均日乳量を示した。60分群が

45 分群に比べ，分娩後 7-100 日総乳量と平均日乳量ともに低かった ( $P < 0.05$  ; 表 2).

#### ⑨子牛体重と血液性状

表 3 に出生直後の体重と血漿中代謝ホルモン濃度と血清中グルコース濃度を示した．生時体重は，60 分群が 45 分群に比べ小さかった ( $P < 0.05$ )．血漿中インスリン濃度は，60 分群が 45 分群に比べ高かったが ( $P < 0.05$ )，血漿中 IGF-1 濃度は低かった ( $P < 0.01$  ; 表 3)．血漿中 GH 濃度と血清中グルコース濃度には，両群間に差はなかった (表 3)．

表 4 に雌子牛の生時体重，離乳期体重，哺乳日数，哺乳期間の日増体量を示した．45 分群の雌子牛は 14 頭，60 分群の雌子牛は 3 頭であった．生時体重は，60 分群が 45 分群よりも小さかった ( $P < 0.05$  ; 表 4)．他の項目では，両群間に差はなかった (表 4)．図 6 に哺乳期間の体重の推移を示した．全期間において 60 分群が 45 分群よりも低く推移した ( $P < 0.05$ ; 図 6)．

## 1-② インスリンに対する反応の強さの評価

インスリン投与後の血清中グルコース濃度の最低値が，投与前の濃度の50%以上で，グルコース減少量が少なかった群（n=18；L群）と50%未満で，グルコース減少量が多かった群（n=16；H群）の2群に分けて解析を行った。

### ①BCS, RFS, 臍部の深さ

図7に分娩3週間前から分娩後3週目までのBCS, RFS, 臍部の深さを示した。BCSは分娩3週前から分娩1週前まで，L群がH群に比べ高く推移し（ $P<0.05$ ），分娩後は高い傾向があった（ $P=0.10$ ；図7）。RFSと臍部の深さは，両群間に差はなかった（図7）。

### ②血清中代謝物濃度

図8に分娩3週間前から分娩後3週目までの血清中代謝物濃度を示した。分娩前は，全ての血清中代謝物濃度において，両群間に差はなかった（図8）。分娩後は，L群がH群に比べ，血清中グルコース濃度が低く（ $P<0.05$ ），血清中NEFA濃度が高かった（ $P<0.05$ ；図8）。また，血清中T-cho濃度は分娩後2週目と3週目において，L群がH群よりも高かった（ $P<0.05$ ；図8）。

### ③血漿中代謝ホルモン濃度

図9に分娩3週間前から分娩後3週目までの血漿中代謝ホルモン濃度を示した。分娩前後ともに，全ての血漿中ホルモン濃度に両群間に差はなかった（図9）。

#### ④分娩状況と繁殖成績

表 5 に産歴，分娩予定日とのずれ，分娩難易度，分娩後の卵巢機能回復日数，分娩後の初回 AI 日数と初回 AI 受胎率を示した．全ての項目において，両群間に差はなかった（表 5）．

#### ⑧乳量

表 6 に分娩後 7-100 日総乳量と 7-100 日平均日乳量を示した．L 群が H 群に比べ，分娩後 7-100 日総乳量と平均日乳量ともに高かった（ $P < 0.01$ ；表 6）．

#### ⑨子牛体重と血液性状

表 7 に出生直後の体重と血漿中代謝ホルモン濃度と血清中グルコース濃度を示した．生時体重は両群間に差はなかった（表 7）．血漿中インスリン濃度は，L 群が H 群に比べ低かった（ $P < 0.05$ ；表 7）．他の項目において両群間に差はなかった（表 7）．

表 8 に雌子牛の生時体重，離乳期体重，哺乳日数，哺乳期間の日増体量を示した．L 群の雌子牛は 11 頭，H 群の雌子牛は 6 頭であった．全ての項目では，両群間に差はなかった（表 8）．加えて哺乳期間の体重の推移も両群間に差はなかった（図 10）．

## 試験 2 GHR-SNP と母牛の分娩後における栄養代謝状態, 乳量および繁殖性と子牛における体重および血液性状との関連性

試験牛のうち, 分娩が予定日より 10 日以上早く分娩した牛 (2 頭), 途中で淘汰されてしまった牛 (3 頭), 双子分娩の牛 (1 頭) を除き, 計 44 頭を解析に用いた.

NsiI 酵素処理による -154 位での変異により, GHR 遺伝子の遺伝子型は A/A, A/G, G/G の 3 つに分類された.

母牛の SNP の割合は A/A が 77% (n=34), A/G が 21% (n=9), G/G が 2% (n=1) であった. G/G は 1 頭だったため, 統計解析から除外した.

子牛の SNP の割合は A/A が 71% (n=15), A/G が 29% (n=6), G/G が 0% (n=0) であった.

### ①BCS, RFS, 臍部の深さ

図 11 に分娩 3 週間前から分娩後 3 週目までの BCS, RFS, 臍部の深さを示した. BCS は分娩前後ともに A/G 群が A/A 群に比べ低かった ( $P < 0.001$ ; 図 11). RFS と臍部の深さは, 両群間に差はなかった (図 11).

### ②血清中代謝物濃度

図 12 に分娩 3 週間前から分娩後 3 週目までの血清中代謝物濃度を示した. 分娩前は, 血清中グルコース濃度において, A/G 群が A/A 群に比べ低く ( $P < 0.05$ ), 血清中 T-cho 濃度は低い傾向があった ( $P = 0.07$ ; 図 12). その他の項目は両群間に差はなかった (図 12).

### ③血漿中代謝ホルモン濃度

図 13 に分娩 3 週間前から分娩後 3 週目までの血漿中代謝ホルモン濃度を示した。血漿中 GH 濃度において、A/G 群が A/A 群に比べ、分娩前では高い傾向があり ( $P=0.06$ ), 分娩後は高かった ( $P<0.01$ ; 図 13)。血漿中 IGF-1, インスリン濃度に両群間に差はなかった (図 13)。

### ④分娩状況と繁殖成績

表 9 に産歴, 分娩予定日とのずれ, 分娩難易度, 分娩後の卵巣機能回復日数, 分娩後の初回 AI 日数と初回 AI 受胎率を示した。産歴は, A/A 群よりも A/G 群が低かった ( $P<0.01$ ; 表 9)。その他の項目において, 両群間に差はなかった (表 9)。

### ⑧乳量

表 10 に分娩後 7-100 日総乳量と 7-100 日平均日乳量を示した。A/G 群が A/A 群に比べ, 分娩後 7-100 日総乳量と平均日乳量ともに低かった ( $P<0.05$ ; 表 10)。

### ⑨子牛体重と血液性状

表 11 に母牛の GHR-SNP による出生直後の体重と血漿中代謝ホルモン濃度と血清中グルコース濃度を示した。生時体重は両群間に差はなく, 血漿中代謝ホルモン濃度と血清中グルコース濃度においても, 両群間に差はなかった (表 11)。

表 12 に子牛の GHR-SNP による出生直後の体重と血漿中代謝ホルモン濃

度と血清中グルコース濃度を示した．血漿中 GH 濃度は A/G 群が A/A 群よりも高い傾向があった ( $P=0.06$  ; 表 12)．一方，生時体重は両群間に差はなく，また他の血液成分も差はなかった (表 12)．

表 13 に雌子牛の生時体重，離乳期体重，哺乳日数，哺乳期間の日増体量を示した．A/A 群のうち 1 頭は哺乳期間中に他の試験に用いられたため除外し，A/A 群 14 頭，A/G 群 6 頭で解析した．全ての項目では，両群間に差はなかった (表 13)．加えて哺乳期間の体重の推移も両群間に差はなかった (図 14)．

## IV. 考察

本研究では、乳牛において妊娠末期のインスリン感受性試験による IR の強さと、GHR-SNP のどちらが、分娩後の栄養代謝状態、乳量、繁殖成績および出生子牛の発育と血液性状に強く影響を及ぼすかを調査した。

### 1. インスリン感受性と母牛の分娩前後の栄養代謝状態、乳量および繁殖成績との関係性

インスリンに対する反応の速さでの解析において、60 分群はインスリンの反応性が弱い、つまり IR が強い群といえ、反応に 45 分群は IR が弱い群だと考えられる。IR が強い牛は比べて IR が弱い牛よりも分娩前の BCS は低く推移しているが、臍部は浅く、血清中グルコース濃度が低い傾向があった。BCS は、エネルギーの摂取状況を反映して変化する[31]。また、RFS は乾物摂取量と相関があるため、飼料摂取量を判断できる指標として使うことができると報告されている[32]。血中グルコース濃度はエネルギーの指標となり[33]、減少する要因としてはエネルギー不足や肝機能低下などが挙げられる[34]。分娩に近づくにつれ、インスリンの感受性が低下し IR が増すことが知られているが[35]、どの時期からこの現象がおこるのかは分かっていない。本試験では、分娩前 3 週間前にすでに IR が強くなっている牛は、IR が弱い牛に比べて採食しているにもかかわらず、肝臓でのグルコース生成できておらず、その結果 BCS が低くなっていることが考えられる。また、分娩 3 週間前からこれらの項目に差があることから、インスリン感受性が悪くなったのはもっと前であると思われる。IR を増す機序は明らかではないが、脂肪組織の増大による炎症や身体的ストレスがその一因となっている

と考えられている[36]. Lewis らは、過肥の状態は肝臓に脂肪が蓄積しやすく、それに伴い肝機能が低下し、糖代謝に異常をきたすと報告した[37]. しかし、本試験では、IR の弱い牛のほうが脂肪の蓄積が多かったため、これらの報告とは異なる結果となった. したがって、今回分娩 3 週間前に IR が強くなった理由は過肥ではないと考えられ、IR が強くなった要因については不明である.

インスリンの分泌を調節する因子は、グルコースや NEFA など様々であり、さらに、分娩直後は GH や IGF-1 などのホルモンや、ケトン体などの因子の血中濃度に大きく影響される[5, 38]. 分娩後において IR の強い牛は、IR の弱い牛に比べ、BCS が分娩後 0 週と 1 週で低く、臍部の深さは分娩後 0 週から 3 週までずっと浅かった. また、血清中 NEFA 濃度は低く推移し、血清中 BHBA 濃度においても低い傾向があったが、血漿中ホルモン濃度には両群間に差はなかった. 一般的に、血中 NEFA および BHBA 濃度はエネルギーの指標となる[33]. 試験農場で定めている血中 NEFA, BHBA 濃度の正常範囲はそれぞれ、 $32.7\text{-}546.2\mu\text{Eq/L}$ ,  $474\text{-}1184\mu\text{mol/L}$  であり、IR が弱い牛は、分娩直後から分娩後 1 週目にかけて血中 NEFA 濃度が正常範囲よりも高値となったこと、採食量が少ないことから、体脂肪動員が行われていた. 血清中 BHBA はケトン体の一種で、血漿濃度は、NEFA の利用効率を表しており、IR の弱い群は NEFA が有効利用されていない状態だったと考えられた. また、削瘦牛では NEFA 濃度が低いことや、ルーメンでの VFA 産生や吸収の低下によって BHBA 濃度は低下することが知られている[34]. このことから、本試験の IR が強い牛は、痩せているが、採食量は多く NEFA 濃度が低いということも一致しており、体脂肪動員が少なかったことが考えられた.

さらに、IR が強い牛は IR が弱い牛に比べ、7-100 日総乳量および平均日乳量が低かった。これは、母体が痩せており、蓄積されている脂肪が少なく体脂肪動員が少なかったため、乳生産へのエネルギー供給が少なかったためであると考えられた。

また、産歴、分娩予定日とのずれ、分娩難易度には差はなかった。分娩後の卵巢機能の回復日数は IR が強い群は IR が弱い群に比べ短かったが、初回 AI 日数や初回 AI 受胎率は、両群間に差はなかった。一般的にインスリンは、グルコースを調節するホルモンであり、グルコースは食物からの摂取や肝臓での糖新生によって作られる[17]。また、インスリン、グルコース濃度は栄養状態に反映される[17]。肝臓でグリコーゲン、タンパク質の合成の促進を行う。また、インスリンの分泌を調節する因子は、グルコースや NEFA など様々であり[5]、分娩直後は GH や IGF-1 などのホルモンや、NEFA やケトン体などの代謝因子の血中濃度が大きく変化する時期である[38]。血漿中インスリン濃度が高いと、分娩後早期に初回排卵を起こす乳牛の割合が高くなること[39]や、初回排卵が起こるまでの日数が短縮されること[40]が報告されている。川島らは、栄養水準が低い牛は分娩後の初回排卵が遅れると報告した[27]。Zulu とも乳牛において肝機能低下は、分娩後早期の卵巢機能に影響を与えると報告した[41]。肝機能障害は肝臓からインスリン様成長因子-1 の放出を弱め、分娩後の卵巢の回復を遅延させる[37, 38]。本試験では分娩前後において血漿中インスリン濃度に両群に差はなく、分娩後の血漿中 IGF-1 濃度にも差はみられなかったが、体脂肪動員の多さから、IR の弱い牛では過度の NEB となり、初回排卵が遅れたと思われる。また、分娩前の ITT により、グルコース減少が多い牛すなわち IR が弱い牛は、分娩後の繁殖能力を抑える可能性があるという報告がある[42]。本試験では、IR

の弱い群において、分娩後卵巣機能の回復日が遅れたことは、この報告に一致する。しかし、本試験では、その後の初回 AI 日数やその受胎率に両群間に差が無かった。IR の強い群において初回排卵は早いものの、その後良い繁殖には繋がらなかった可能性が示唆され、分娩後早期の栄養代謝状態がその後の繁殖成績まで影響を及ぼしていないと推測されるが、本試験では初回 AI 日までの長期的な栄養代謝状態は把握できなかったため、詳細は分からない。

インスリンに対する反応の強さでの解析では、分娩前の BCS のみに違いがあり、L 群すなわち IR が強い牛は、それに比べて IR の弱い牛である H 群よりも高く推移した。BCS は、エネルギー摂取状況を反映して変化するが、その変化が起こるまでにはタイムラグがある[31]。IR が強い牛は、IR が弱い牛に比べ、分娩 3 週前の時点ですでに太っていることが分かったが、この時期の採食状況や血液性状に差はないことから、乾乳前期あるいは泌乳後期のエネルギー状態が BCS に反映していることが考えられる。したがって、妊娠末期のインスリンに対する反応の強さによって IR を評価し、分娩前の母牛の栄養状態をモニタリングすることは難しいと考えられる。

## 2. インスリン感受性と子牛の発育と血液性状との関係性

前述よりインスリン投与に対する反応の速さで IR を評価した場合の産子の発育と血液性状の解析をした。IR が強い母牛の子は IR が弱い母牛の子に比べ、生時体重は軽く、血漿中インスリン濃度は高く、血漿中 IGF-1 濃度は低かったが、血漿中 GH 濃度と血清中グルコース濃度には差はなかった。さらに雌子牛の発育を比べると IR の強い母牛の子の方が生時体重は軽く、

哺乳期間の体重変化も低く推移した。胎子の成長ホルモン軸は胎盤を介した栄養供給によって調節されるため、母体の栄養状態に強く影響を受ける[10]。また、出生後の筋肉質量増加は、存在する筋細胞の肥大あるいは、衛星細胞の活性化に依存しているという報告がある[43]。また、Osgerbyらはヒツジにおいて、妊娠後期に食物摂取量を要求量の70%に制限することは、胎子の成長に悪影響を及ぼすことを示し、胎子の血漿IGF-1を有意に減少させるが、母の血漿IGF-1濃度にはあまり影響がないことを報告している[44]。このことから、IRが強い母牛の子において、母体のエネルギー不足、肝臓での糖新生が上手く行われていないことが、胎子の発育に影響を及ぼしていると考えられ、子牛は出生時の時点で小さく、骨格筋量が少なかった。それ故、出生後の血漿中IGF-1濃度も低く、その後の哺乳期間においても、発育が悪いことが推測された。また、子牛の血漿中インスリン濃度が高かったのは、少ない栄養から少しでも多くを吸収しようとしていたと考えられた。ウシにおいて胎子の血清IGF-1濃度は胎子の成長率と相互関係があるが、胎子のIGF-1分泌パターン[45]は母体で観測されたもの[46]と一致せず、Holloandらが示唆したように、母体の循環IGF-1濃度はおそらく母体の組織成長を反映し、胎子の成長に直接影響しない[47]。それにも関わらず、母体の血漿IGF-1濃度は、出生後に潜在的に子牛の成長に影響を与えることができ、母体の血漿IGF-1濃度はBCSと妊娠期飼料の両方によって変化されている[44, 48, 49]。これらをふまえると、本試験では妊娠末期の母体の血漿中IGF-1濃度に差はなかったが、IRの弱い母牛の子において、子は大きく生まれ、血漿中IGF-1濃度も高く、哺乳期間の日増体も良好であったことは報告を裏づけたといえる。

### 3. 母牛の GHR-SNP と分娩前後の栄養代謝状態、乳量および繁殖成績との関連性

分娩前後ともに A/G をもつ牛は A/A をもつ牛に比べ、BCS は低かったが、RFS および臍部の深さには両群間に差はなかった。また、A/G をもつ牛が A/A をもつ牛に比べ、分娩前において血清中グルコース濃度は低く、血清中 T-cho 濃度は低い傾向があった。さらに、A/G をもつ牛は A/A をもつ牛に比べ、血漿中 GH 濃度は分娩前において高い傾向があり、分娩後は高かったが、血漿中 IGF-1、インスリン濃度には両群間に差はなかった。産歴は A/A をもつ牛よりも A/G をもつ牛が低かったが、繁殖成績に両群間の違いはみられなかった。また、A/G をもつ牛が A/A をもつ牛よりも 7-100 日総乳量および平均日乳量が低かった。産歴に明らかに差がみられた理由として、試験農場の飼養管理の中で選抜され、淘汰されずに長期飼養している牛に A/A をもつ牛が多いこと、さらに雌牛は外部から導入していないことから、A/G または G/G をもつ種雄牛の精液が本学畜産フィールド科学センターで用いられ、近年の生まれた牛は A/G をもつ個体が多かったことが考えられる。一般的に、初産牛よりも経産牛の方が乳量は多く [50]、乳量は 7~8 歳の 5 産まで年齢、産次に伴い増加することから [51]、A/G をもつ牛が A/A をもつ牛よりも乳量が低かったのは、産歴の影響を受けていることが考えられる。同様に、BCS において A/G をもつ牛が低く推移していたことも GHR-SNP のタイプより産歴の影響が強かったのではないかと考えられる。ウシ GHR 遺伝子 5'領域内の NsiI 部位の A/G 多型は、血中 IGF-1 濃度に関連があり [52]、A/G をもつ牛は A/A をもつ牛より血中 IGF-1 濃度が有意に高いと報告されている [53]。しかし、本試験では、両群間の血漿中の IGF-1 濃度に差は認められなかった。以上より、本試験では両群間に産歴の差があったことから、

SNP だけを要因とした分娩前後の栄養代謝状態や乳量，繁殖成績に対する影響を検討することは難しい。今後は同じ産次の牛で比較することが必要である。

#### 4. GHR-SNP と子牛の発育と血液性状

母牛の GHR-SNP と子牛の発育と血液性状についてみると，生時体重に差はなく，血漿中代謝ホルモン濃度および血清中グルコース濃度にも差はなかった。このことから，本試験においては，母体の GHR-SNP と子牛の発育と血液性状には関連がない可能性が示された。

子牛の GHR-SNP とその個体の発育と血液性状についてみると，血漿中 GH 濃度は A/G をもつ牛は A/A をもつ牛よりも高い傾向があったが，生時体重や他の血液成分に差はなかった。GH は哺乳類において生後の成長と代謝の主要調節因子であり，細胞増殖，骨格成長，タンパク質合成のような同化作用を促進する [54-56]。離乳前の子牛は乳糖と脂肪が主なエネルギーであり，乳糖は小腸で消化されグルコースとなる [57]。また，雌子牛の発育，哺乳期間の体重の推移について両群間に差はなかった。生時体重，血漿中インスリン，IGF-1 濃度，血清中グルコース濃度に差はなく，血漿中 GH 濃度が A/G をもつ牛で高かったことから，A/G をもつ牛では A/A をもつ牛と同じ量の IGF-1 を産生するために，より多くの GH が放出されていると考えられた。この原因として，A/G をもつ牛において，GHR の数自体が少ないのかまたは IGF-1 産生効率が悪かったのか，理由は本試験では明らかにできなかったため，今後検討する必要がある。

## V. 結論

IR の強い牛は IR の弱い牛に比べて、分娩 3 週間前において、採食量は多いが、エネルギー状態が低く痩せていた。さらに脂肪の蓄積が少ないため、分娩後において体脂肪動員は少なく、卵巢機能の回復は早いですが、乳量が少なく、その後の繁殖成績は悪いことが示された。また、その産子の生時体重は軽く、哺乳期間の日増体も少ないことが明らかとなり、妊娠末期の IR の強さが分娩後の生産性や、産子の体質を決める要因の 1 つになることが示唆された。また、GHR-SNP での解析は、産歴の影響により、本試験では母体の栄養状態や乳量、繁殖成績のモニタリングはできなかったが、GHR-SNP の A/G をもつ子牛は A/A をもつ子牛に比べて、IGF-1 合成効率が悪い可能性が示された。

したがって、本試験では GHR-SNP よりも、妊娠末期のインスリン感受性が母体の分娩後の栄養代謝状態、乳量、繁殖性とその産子の発育や血液性状に強く反映すると結論づける。

## VI. 謝辞

稿を終えるにあたり、論文作成に終始ご指導、ならびにご校閲を賜りました本学畜産フィールド科学センターの川島千帆講師に深く感謝いたします。また、副査として、本論文を校閲していただくだけでなく、実験のアドバイスなど多岐にわたりご指導くださいました、本学畜産フィールド科学センターの木田克弥教授ならびに生殖科学研究室の清水隆准教授に深く感謝いたします。また、実験に関して多大なるご協力をいただきました獣医臨床繁殖学研究室の松井基純准教授ならびに所属学生の皆様に心から感謝いたします。さらに、実験に快くご協力いただきました、上杉さん、松井さんをはじめとする本学畜産フィールド科学センター職員の皆様、本当にありがとうございました。また、血液成分の分析において多大なる協力をいただきました、山崎絵里子さん、角田英さんにも大変感謝いたします。皆様の中でも特に、川島先生には、学部時から実験や分析、論文作成など大変お世話になりました。出来の悪い私で迷惑ばかりかけてしまいましたが、最後まで温かく見守ってくださり、感謝してもしきれません。大学院では、堀内まやさんとともに海外学会という貴重な体験ができ、少しですが成長したと思えたこと、大変嬉しく心に焼き付いています。

また、一緒に実験を行った嵐寛子さん、唐木智尋さん、先輩らしからぬ私を最後まで支えてくれたことに深く感謝しています。嵐が卒業してからというもの、しっかり者のカラキシが居なかったらこの実験は成り立たなかったと本当に思います。つつい頼り過ぎていた面が多く、負担も多くなってしまったこと、お詫び申し上げます。そして、実験のサポートをしてくれた、山下陽子さん、原田雄基くん、靱倉茂朗くん、藤本賢くん、本田利彦くん、

加治原彩子さん，小川公二さん，角田さん，昨年の卒業生，研究室の 3 年生，卒業後も気にかけてくれた元 FSC 研究室メンバーに心から感謝します。

最後に，6 年間もの長い間，支え見守ってくれた家族に最大の敬意を表します。

## VII. 参考文献

1. 杉山隆, 豊田長康: 妊婦の糖・脂質代謝 (<特集> 周産期の栄養と食事-産科編) . *周産期医学* 2001, vol.31 no.2:175-180.
2. Debras E, Grizard J, Aina E, Tesseraud S, Champredon C, Arnal M: Insulin sensitivity and responsiveness during lactation and dry period in goats. *Am J Physiol* 1989, 256(2 Pt 1):E295-302.
3. Bell RA, Summerson JH, Konen JC: Dietary intakes by levels of glycemic control for black and white adults with non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). *J Am Coll Nutr* 1995, 14(2):144-151.
4. Kahn CR: Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metabolism* 1978, 27(12 Suppl 2):1893-1902.
5. Hayirli A: The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Vet Res Commun* 2006, 30(7):749-774.
6. Reist M, Erdin DK, von Euw D, Tschumperlin KM, Leuenberger H, Hammon HM, Morel C, Philipona C, Zbinden Y, Kunzi N *et al*: Postpartum reproductive function: association with energy, metabolic and endocrine status in high yielding dairy cows. *Theriogenology* 2003, 59(8):1707-1723.
7. Balogh O, Szepes O, Kovacs K, Kulcsar M, Reiczigel J, Alcazar JA,

- Keresztes M, Febel H, Bartyik J, Fekete SG *et al*: Interrelationships of growth hormone AluI polymorphism, insulin resistance, milk production and reproductive performance in Holstein-Friesian cows. *Vet Med-Czech* 2008, 53(11):604-616.
8. Steen A, Gronstol H, Torjesen PA: Glucose and insulin responses to glucagon injection in dairy cows with ketosis and fatty liver. *Zentralbl Veterinarmed A* 1997, 44(9-10):521-530.
  9. Ohtsuka H, Koiwa M, Hatsugaya A, Kudo K, Hoshi F, Itoh N, Yokota H, Okada H, Kawamura S: Relationship between serum TNF activity and insulin resistance in dairy cows affected with naturally occurring fatty liver. *J Vet Med Sci* 2001, 63(9):1021-1025.
  10. Holt RIG: Fetal programming of the growth hormone-insulin-like growth factor axis. *Trends Endocrin Met* 2002, 13(9):392-397.
  11. Barker DJP: Fetal origins of cardiovascular disease. *Ann Med* 1999, 31:3-6.
  12. 伊藤茂: 1) 母体の栄養状態が胎児に及ぼす影響. *日産婦誌*, 60 巻 9 号.
  13. Micke GC, Sullivan TM, Gatford KL, Owens JA, Perry VE: Nutrient intake in the bovine during early and mid-gestation causes sex-specific changes in progeny plasma IGF-I, liveweight, height and carcass traits. *Anim Reprod Sci* 2010, 121(3-4):208-217.
  14. Stunkard AJ, Sorensen TIA, Hanis C, Teasdale TW, Chakraborty

- R, Schull WJ, Schulsinger F: An Adoption Study of Human Obesity. *New Engl J Med* 1986, 314(4):193-198.
15. Hayashi M, Kouki T, Takasu N, Sunagawa S, Komiya I: Association of an A/C single nucleotide polymorphism in programmed cell death-ligand 1 gene with Graves' disease in Japanese patients. *Eur J Endocrinol* 2008, 158(6):817-822.
  16. Do R, Bailey SD, Desbiens K, Belisle A, Montpetit A, Bouchard C, Perusse L, Vohl MC, Engert JC: Genetic variants of FTO influence adiposity, insulin sensitivity, leptin levels, and resting metabolic rate in the Quebec Family Study. *Diabetes* 2008, 57(4):1147-1150.
  17. 佐々木康之., 小原嘉昭.: 反芻動物の栄養生理学. 農山漁村文化協会 1998.
  18. Daftary SS, Gore AC: IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005, 230(5):292-306.
  19. Spicer LJ, Echterkamp SE: The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 1995, 12(3):223-245.
  20. Watson AJ, Westhusin ME, Winger QA: IGF paracrine and autocrine interactions between conceptus and oviduct. *J Reprod Fertil Suppl* 1999, 54:303-315.
  21. Renaville R, Hammadi M, Portetelle D: Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domest Anim Endocrinol* 2002, 23(1-2):351-360.

22. Falaki M, Gengler N, Sneyers M, Prandi A, Massart S, Formigoni A, Burny A, Portetelle D, Renaville R: Relationships of polymorphisms for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *J Dairy Sci* 1996, 79(8):1446-1453.
23. Blott S, Kim JJ, Moisisio S, Schmidt-Kuntzel A, Cornet A, Berzi P, Cambisano N, Ford C, Grisart B, Johnson D *et al*: Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. *Genetics* 2003, 163(1):253-266.
24. Shirasuna K, Kawashima C, Murayama C, Aoki Y, Masuda Y, Kida K, Matsui M, Shimizu T, Miyamoto A: Relationships between the first ovulation postpartum and polymorphism in genes relating to function of immunity, metabolism and reproduction in high-producing dairy cows. *J Reprod Dev* 2011, 57(1):135-142.
25. Katoh K, Kouno S, Okazaki A, Suzuki K, Obara Y: Interaction of GH polymorphism with body weight and endocrine functions in Japanese black calves. *Domest Anim Endocrinol* 2008, 34(1):25-30.
26. Sianangama PC, Rajamahendran R: Characteristics of corpus luteum formed from the first wave dominant follicle following hCG in cattle. *Theriogenology* 1996, 45(5):977-990.
27. Kawashima C, Fukihara S, Maeda M, Kaneko E, Montoya CA,

- Matsui M, Shimizu T, Matsunaga N, Kida K, Miyake Y *et al*: Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction* 2007, 133(1):155-163.
28. Miyamoto A, Okuda K, Schweigert FJ, Schams D: Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. *J Endocrinol* 1992, 135(1):103-114.
29. Ferguson JD, Galligan DT, Thomsen N: Principal Descriptors of Body Condition Score in Holstein Cows. *Journal of Dairy Science* 1994, 77(9):2695-2703.
30. 乳牛群の健康管理のための環境モニタリング. 酪農ジャーナル 及川伸監修, 臨時増刊号:12-13.
31. 木田克弥: 牛群検診と個体能力の向上. もうかる酪農経営 酪農総合研究所 1996.
32. Burfeind O, Sepulveda P, von Keyserlingk MA, Weary DM, Veira DM, Heuwieser W: Technical note: Evaluation of a scoring system for rumen fill in dairy cows. *J Dairy Sci* 2010, 93(8):3635-3640.
33. 木田克弥: 乳牛の代謝プロファイルテスト. 乳牛管理の基礎と応用 柏村文郎, 増子 孝義, 古村 圭子編 *DairyJapan* 2006:343-344.
34. 生産獣医療システム 乳牛編 3 2001.
35. Hayirli A, Bertics SJ, Grummer RR: Effects of slow-release insulin on production, liver triglyceride, and metabolic profiles of Holsteins in early lactation. *Journal of Dairy Science* 2002,

- 85(9):2180-2191.
36. インスリン抵抗性とは？ [糖尿病] All about.  
<http://allaboutcojp/gm/gc/387346/>.
  37. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A: Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrine Reviews* 2002, 23(2):201-229.
  38. Roche JF: The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science* 2006, 96(3-4):282-296.
  39. Miyoshi S, Pate JL, Palmquist DL: Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. *Animal Reproduction Science* 2001, 68(1-2):29-43.
  40. Gong JG, Lee WJ, Garnsworthy PC, Webb R: Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction* 2002, 123(3):419-427.
  41. Zulu VC, Sawamukai Y, Nakada K, Kida K, Moriyoshi M: Relationship among insulin-like growth factor-I, blood metabolites and postpartum ovarian function in dairy cows. *J Vet Med Sci* 2002, 64(10):879-885.
  42. Lee HH, Kida K, Miura R, Inokuma H, Miyamoto A, Kawashima C, Haneda S, Miyake Y, Matsui M: Slow recovery of blood glucose in the insulin tolerance test during the prepartum transition period

- negatively impacts the nutritional status and reproductive performance postpartum of dairy cows. *J Vet Med Sci* 2012, 74(4):457-464.
43. Charge SB, Rudnicki MA: Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004, 84(1):209-238.
  44. Osgerby JC, Wathes DC, Howard D, Gadd TS: The effect of maternal undernutrition on ovine fetal growth. *J Endocrinol* 2002, 173(1):131-141.
  45. Holland MD, Hossner KL, Williams SE, Wallace CR, Niswender GD, Odde KG: Serum concentrations of insulin-like growth factors and placental lactogen during gestation in cattle. I. Fetal profiles. *Domest Anim Endocrinol* 1997, 14(4):231-239.
  46. Hossner KL, Holland MD, Williams SE, Wallace CR, Niswender GD, Odde KG: Serum concentrations of insulin-like growth factors and placental lactogen during gestation in cattle. II. Maternal profiles. *Domest Anim Endocrinol* 1997, 14(5):316-324.
  47. Holland MD, Hossner KL, Tatum JD, King ME, Mauck HS, Odde KG: Serum insulin-like growth factor I profiles in beef heifers with single and twin pregnancies. *J Anim Sci* 1988, 66(12):3190-3196.
  48. Constancia M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, Stewart F, Kelsey G, Fowden A, Sibley C *et al*: Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 2002, 417(6892):945-948.
  49. Osgerby JC, Gadd TS, Wathes DC: The effects of maternal

- nutrition and body condition on placental and foetal growth in the ewe. *Placenta* 2003, 24(2-3):236-247.
50. Kume S, Yamamoto E, Kudo T, Tanabe S: Effect of rarity on Mineral and Vitamin Status of Holstein Cows during Early lactation. *Animal Science Technology (Japan)* 1995, 66(6):506-512.
51. 古村圭子: 乳腺の発育. 乳牛管理の基礎と応用 柏村文郎, 増子 孝義, 古村 圭子編 ( (株) デーリィジャパン社, 東京):72-87.
52. Ge W, Davis ME, Hines HC, Irvin KM, Simmen RC: Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle. *J Anim Sci* 2003, 81(3):641-648.
53. Maj A, Snochowski M, Siadkowska E, Rowinska B, Lisowski P, Robakowska-Hyzorek D, Oprzadek J, Grochowska R, Kochman K, Zwierzchowski L: Polymorphism in genes of growth hormone receptor (GHR) and insulin-like growth factor-1 (IGF1) and its association with both the IGF1 expression in liver and its level in blood in Polish Holstein-Friesian cattle. *Neuro Endocrinol Lett* 2008, 29(6):981-989.
54. Burton JL, McBride BW, Block E, Glimm DR, Kennelly JJ: A Review of Bovine Growth-Hormone. *Can J Anim Sci* 1994, 74(2):167-201.
55. Etherton TD, Bauman DE: Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Rev* 1998, 78(3):745-761.

56. Etherton TD: Somatotropic function: the somatomedin hypothesis revisited. *J Anim Sci* 2004, 82 E-Suppl:E239-244.
57. 大森昭一郎: エネルギー代謝の変化. *農業技術体系畜産資料*. 農文協. 東京 2000, 40.

## VIII. 図および表

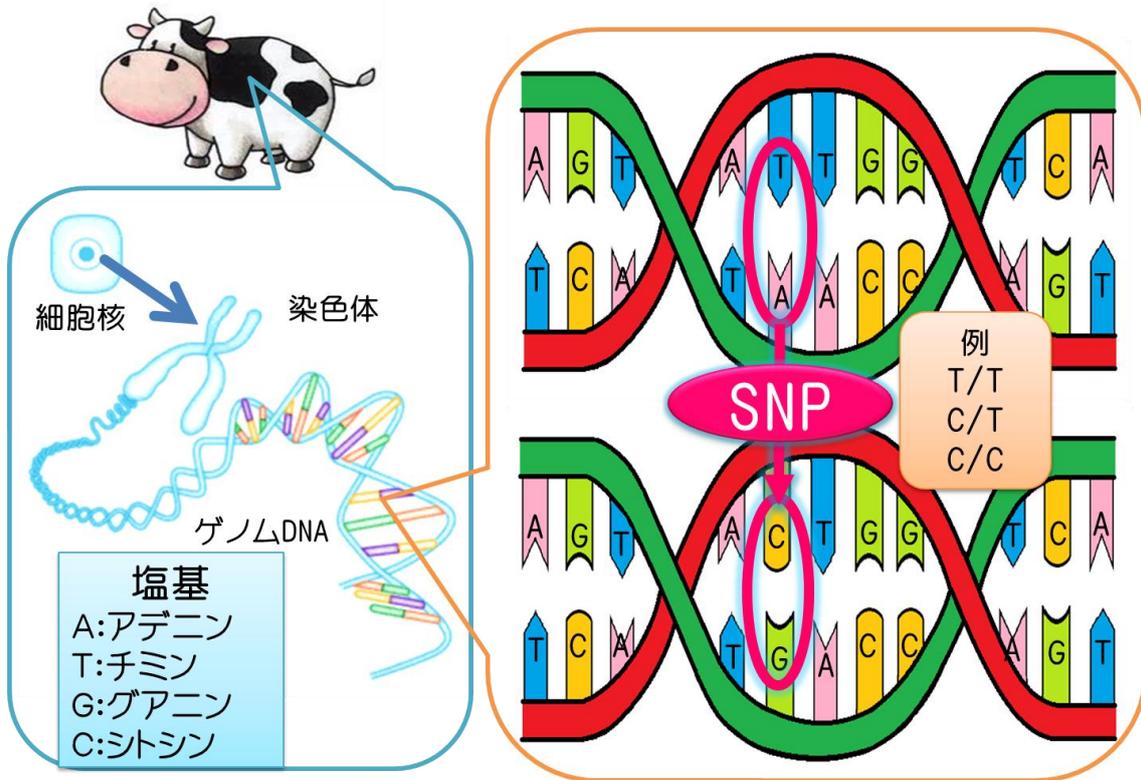


図1. 一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism ; SNP) の模式図

生物の細胞中の核内には2本1組で染色体が存在し、4種の塩基が並んだDNA分子が二重らせん構造をとっている。塩基配列を基にアミノ酸・タンパク質が合成される。SNPとは、その塩基配列のうち、1つの塩基が他の塩基に変異していることを言う。

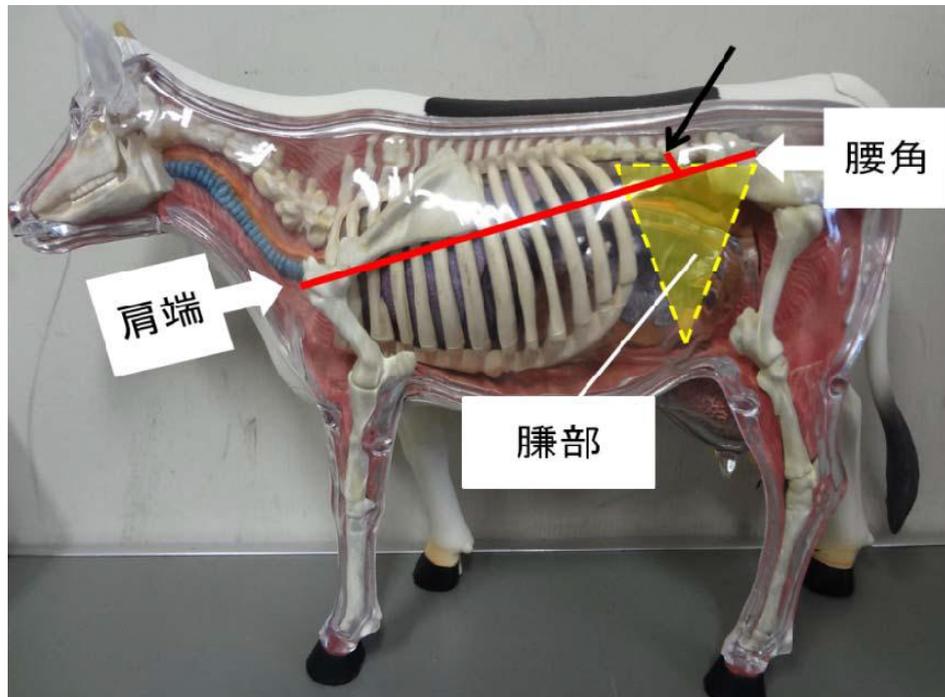


図 2. 膝部の深さの測定部位（上）および測定している所（下）

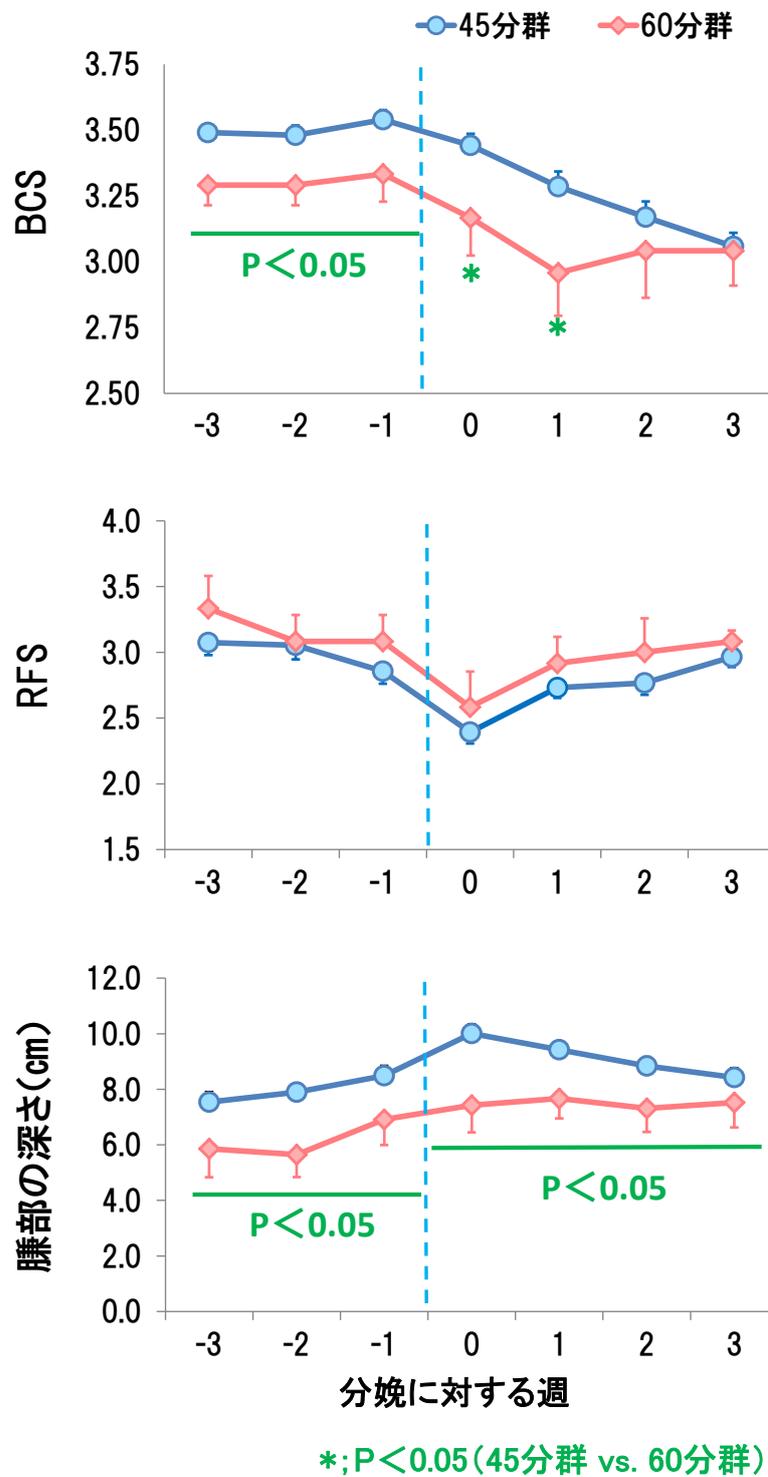


図 3. インスリン感受性（反応の速さ）と BCS, RFS, 膵部の深さ

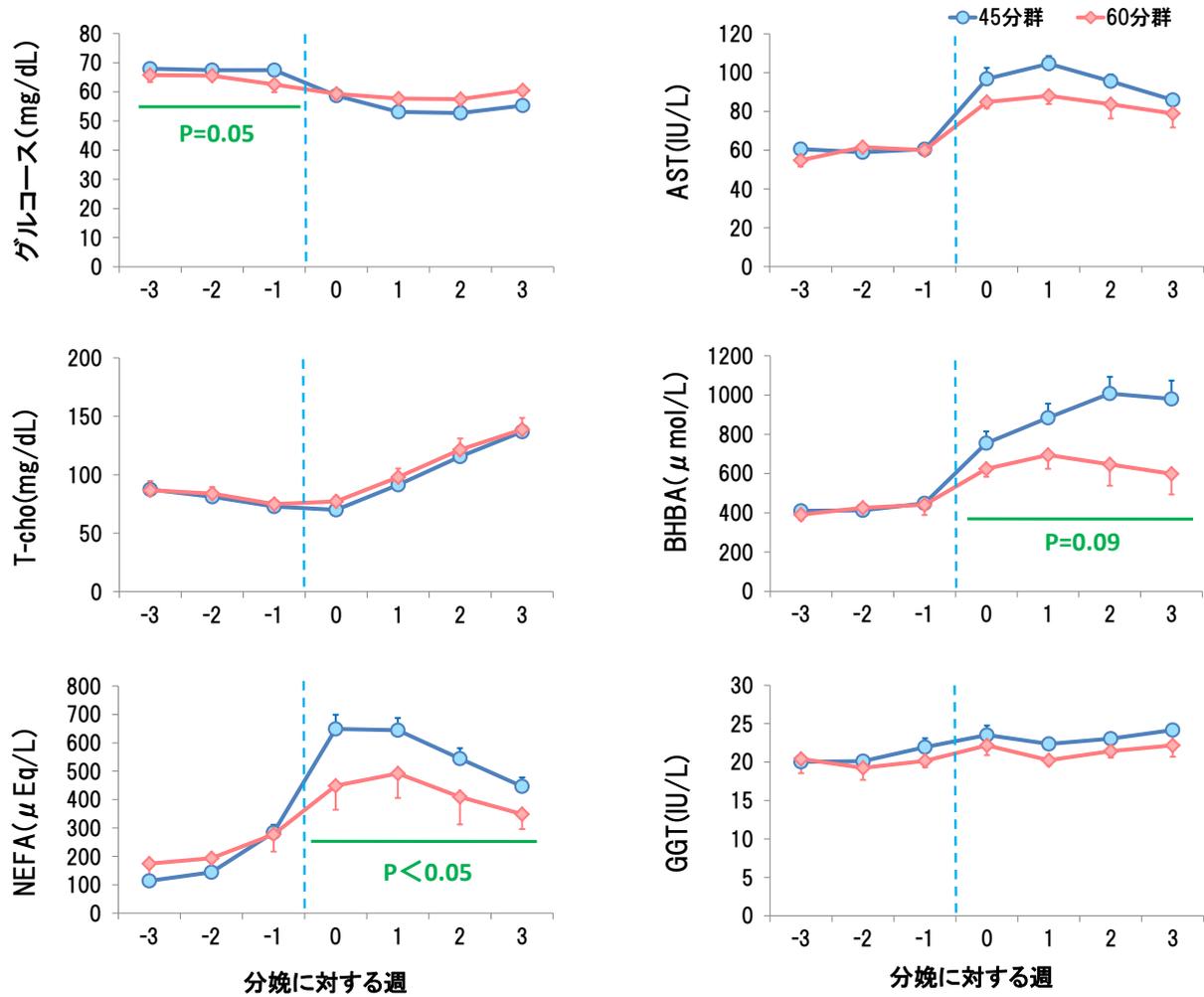


図 4. インスリン感受性（反応の速さ）と血清中代謝物濃度

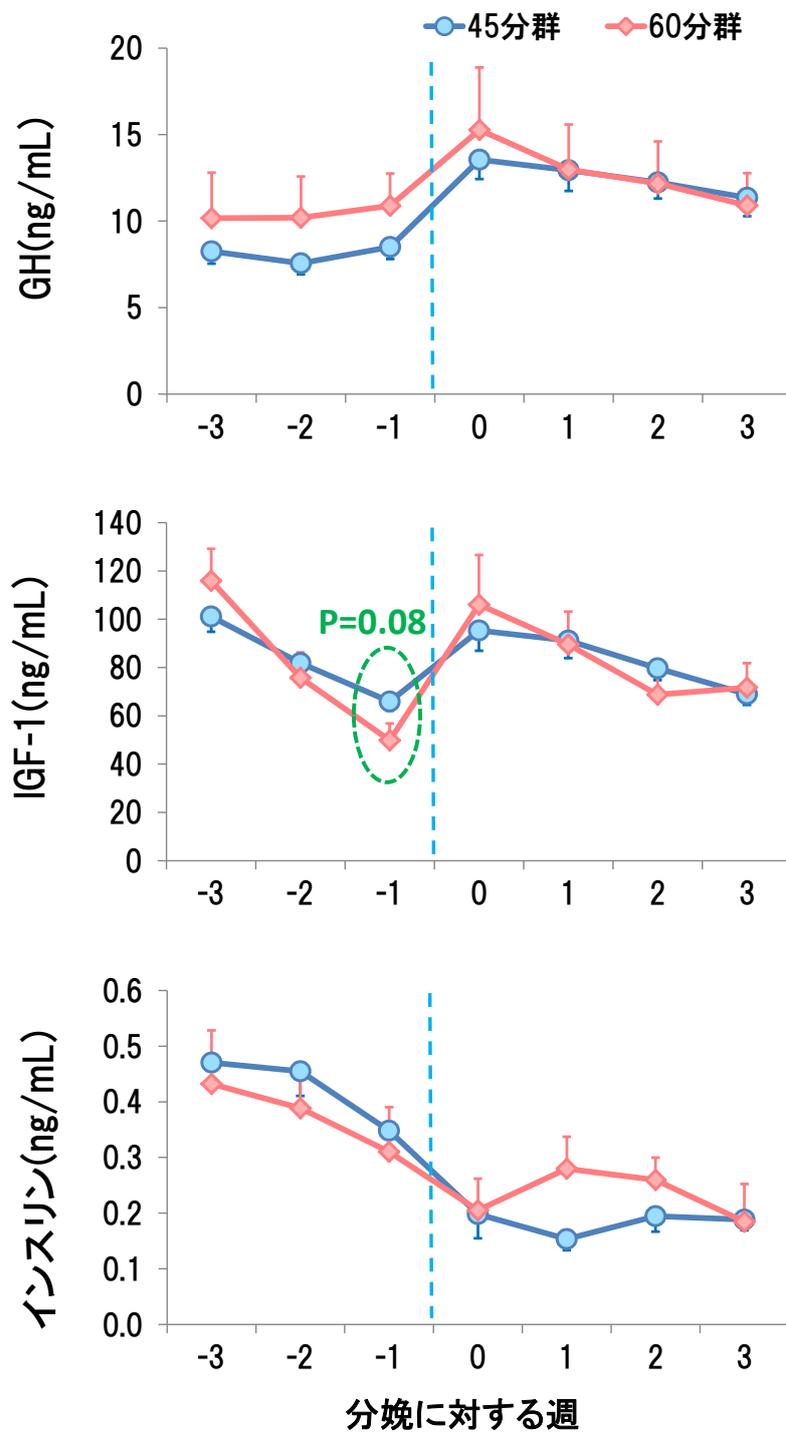


図 5. インスリン感受性（反応の速さ）と血漿中代謝ホルモン濃度

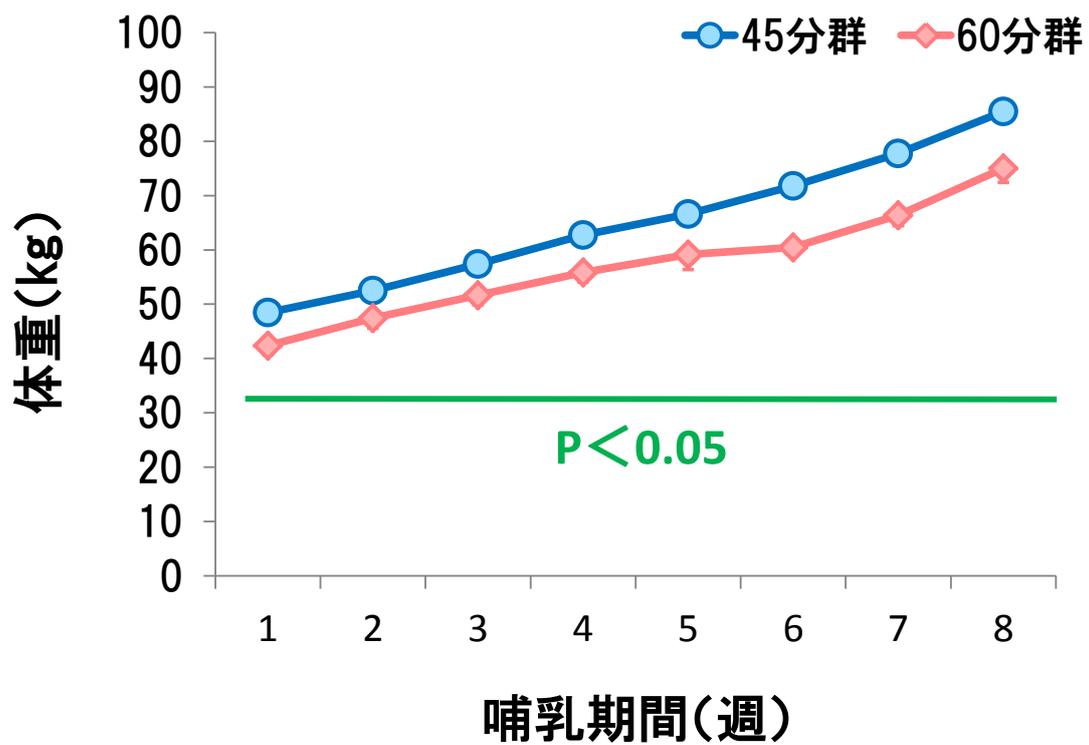


図 6. インスリン感受性（反応の速さ）と産子の哺乳期間の体重推移

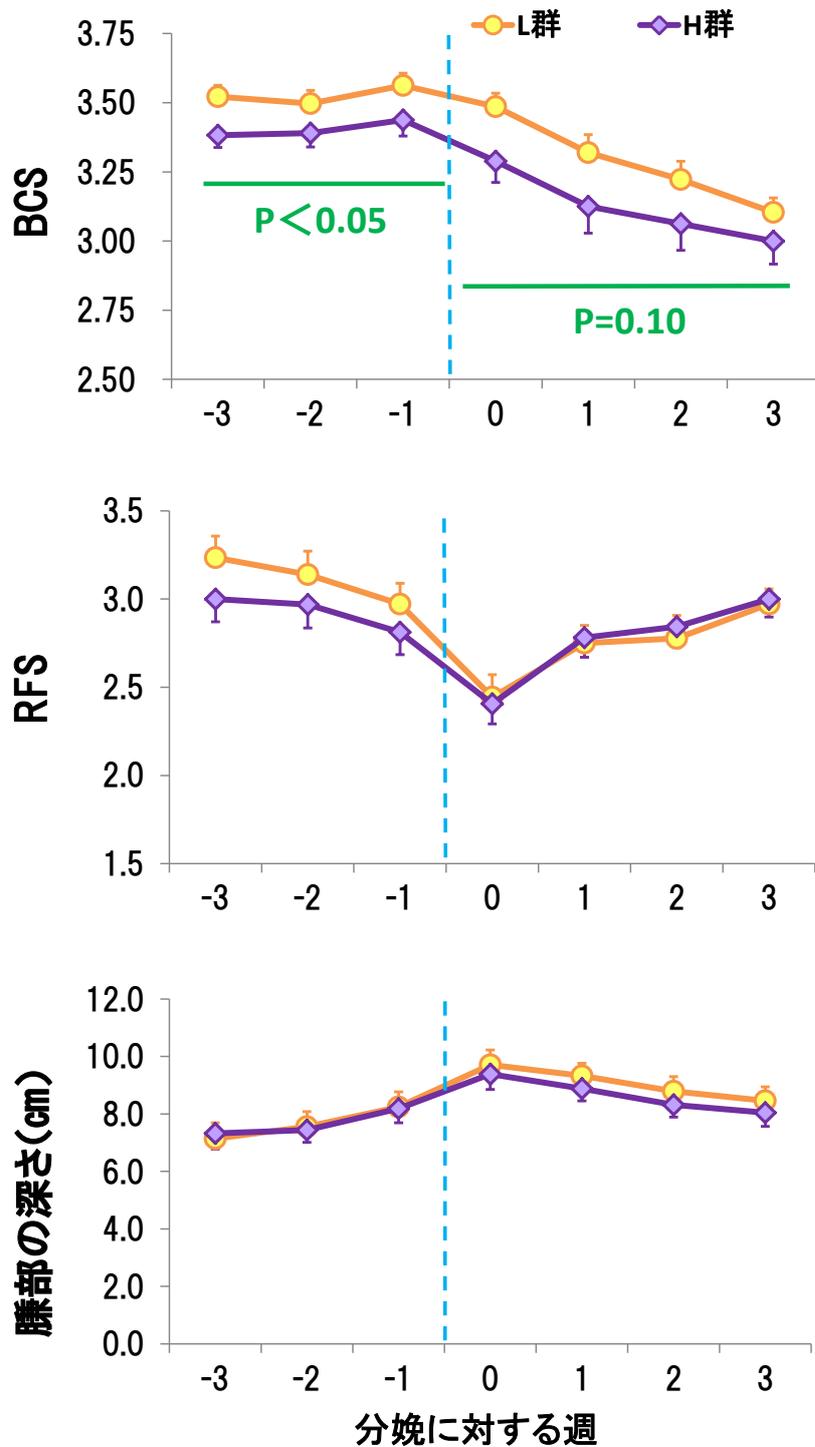


図 7. インスリン感受性（反応の強さ）と BCS, RFS, 膵部の深さ

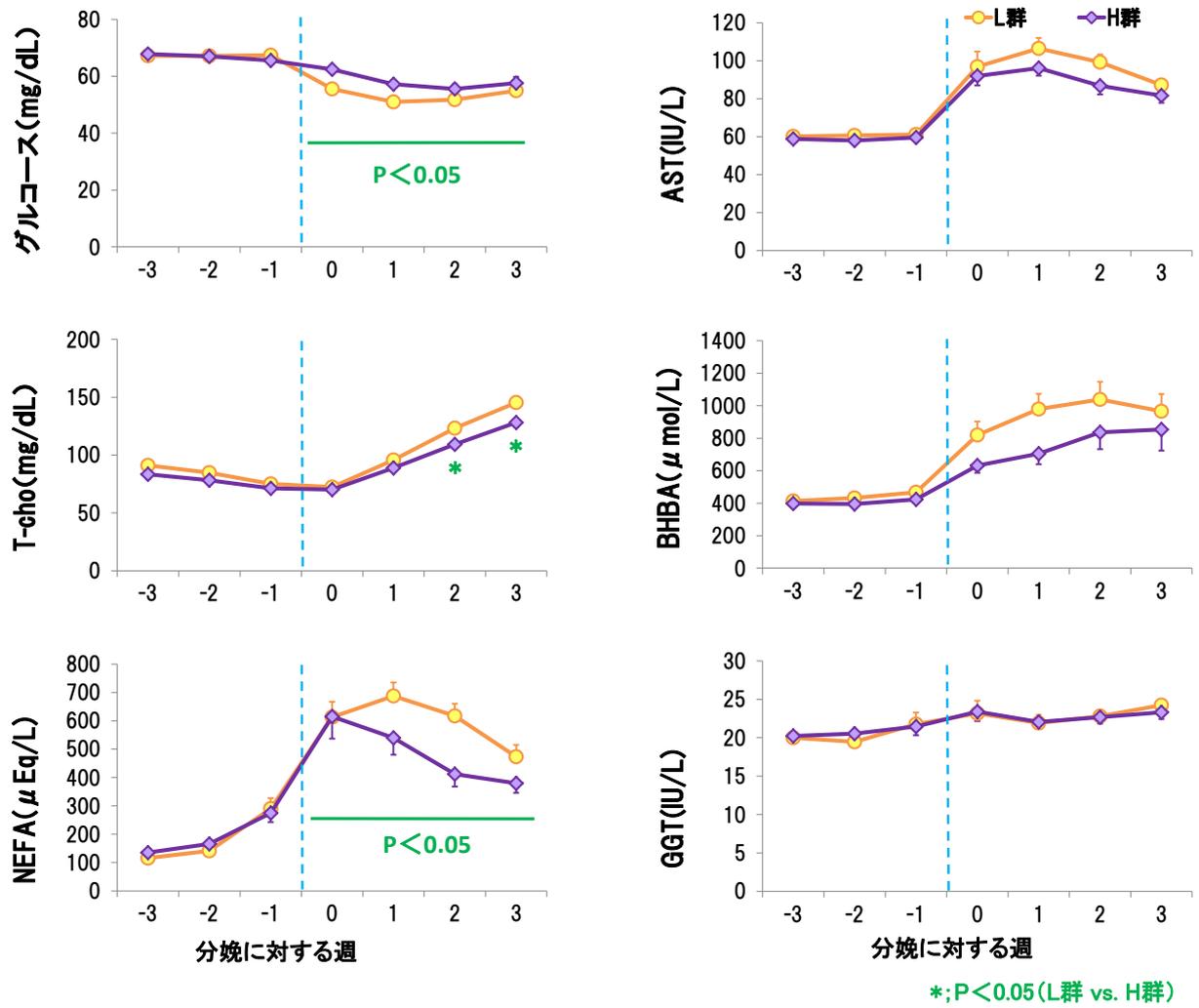


図 8. インスリン感受性（反応の強さ）と血清中代謝物濃度

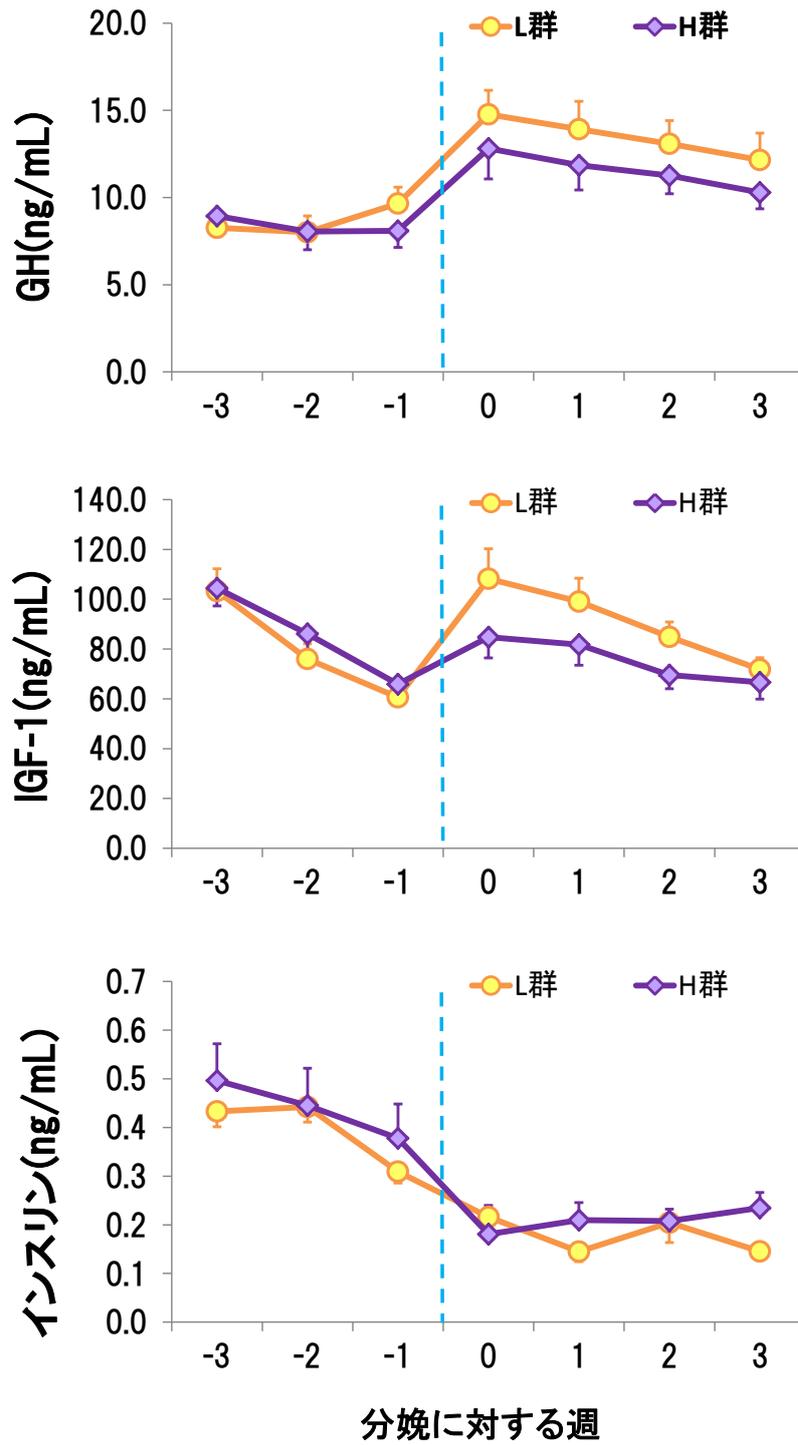


図 9. インスリン感受性（反応の強さ）と血漿中代謝ホルモン濃度

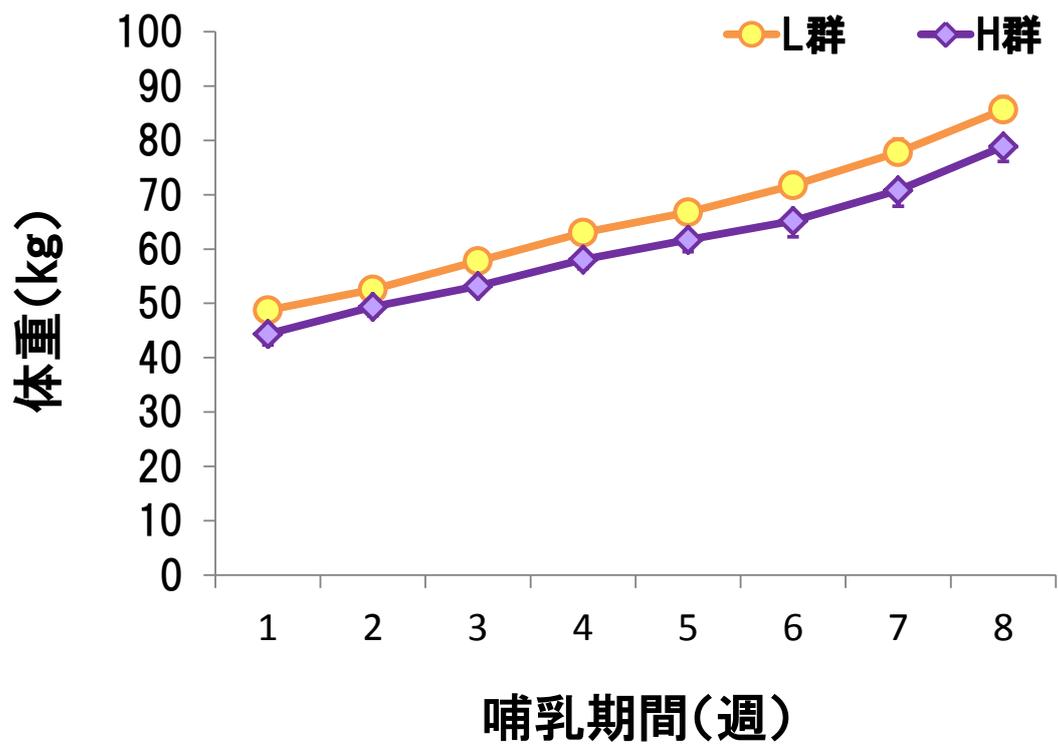


図 10. インスリン感受性（反応の強さ）と産子の哺乳期間の体重推移

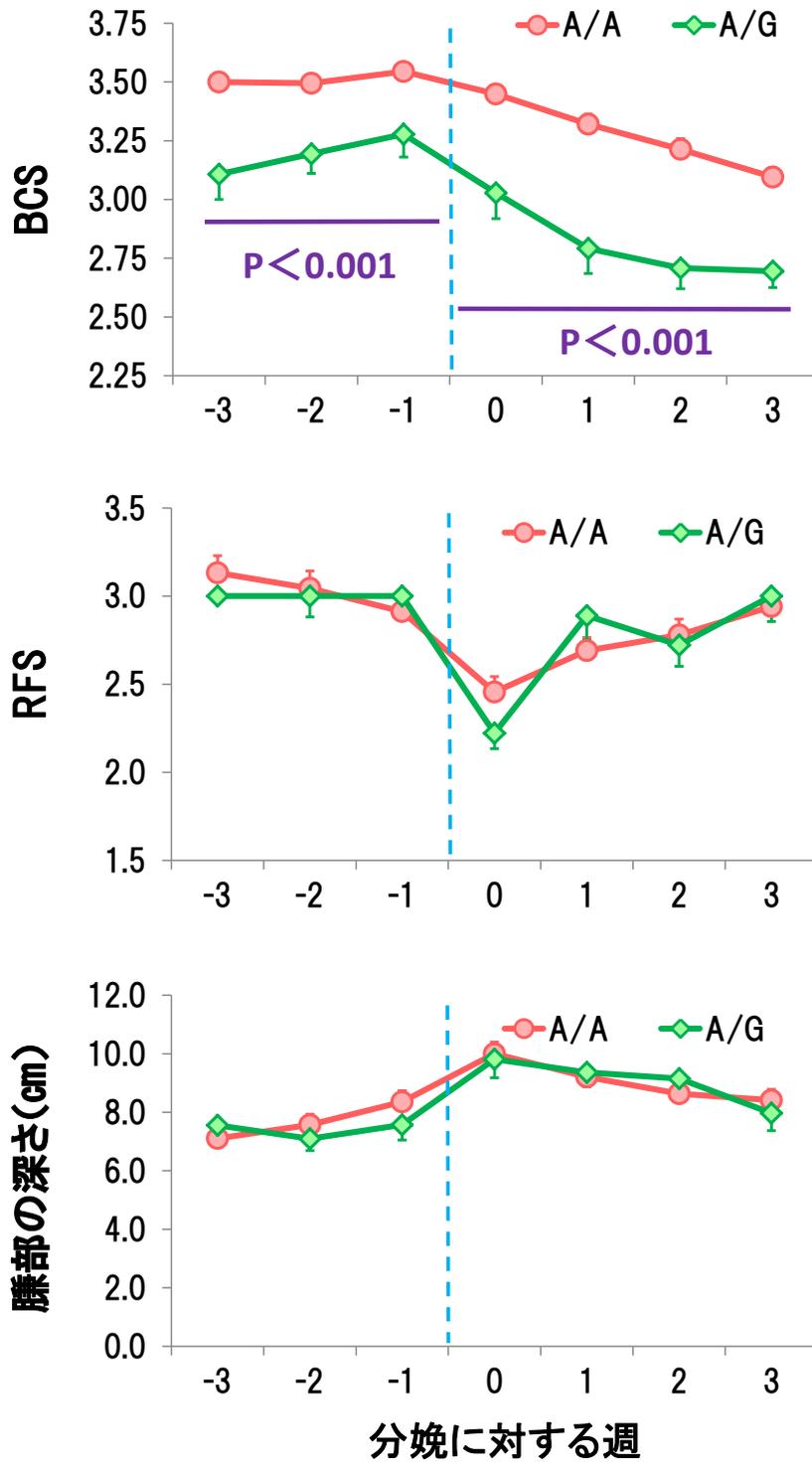


図 11. 母牛 GHR-SNP と BCS, RFS, 膵部の深さ

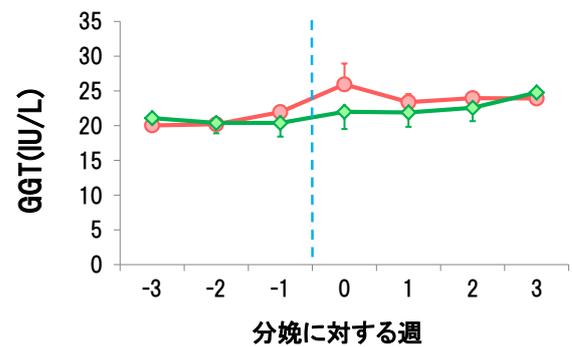
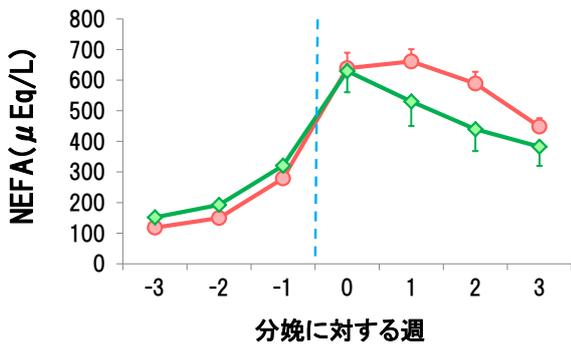
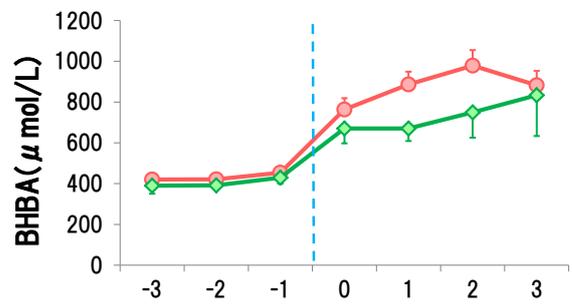
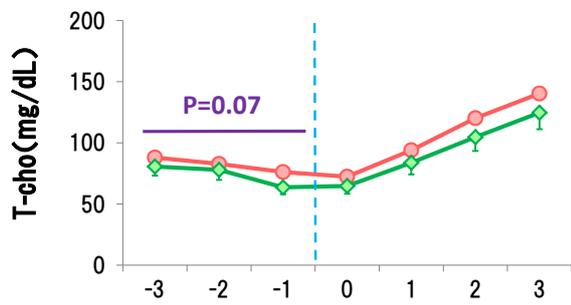
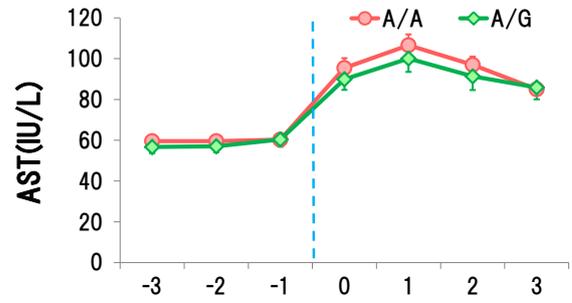
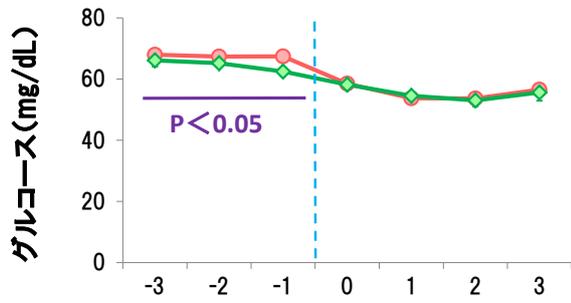


図 12. 母牛 GHR-SNP と血清中代謝産物濃度

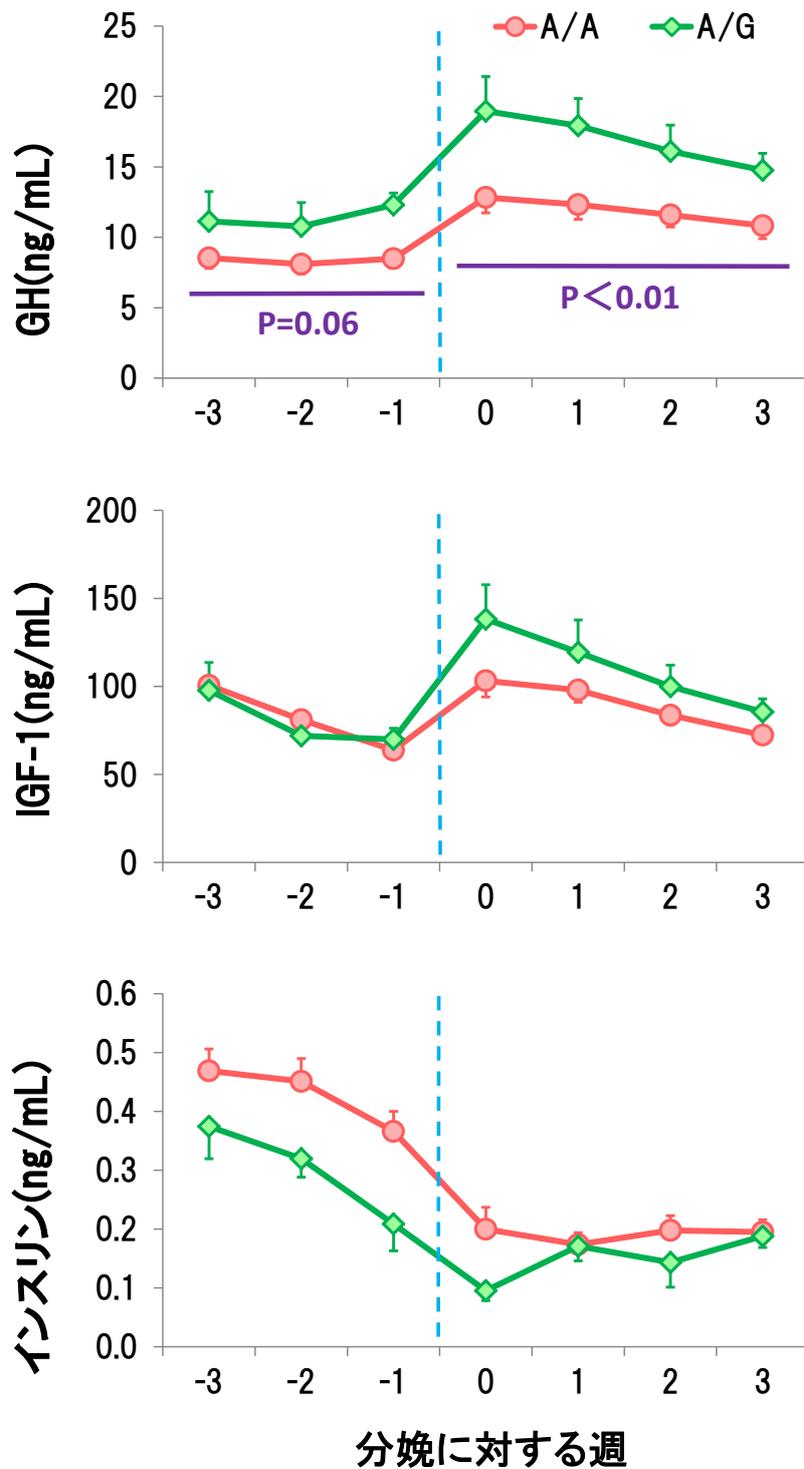


図 13. 母牛 GHR-SNP と血漿中ホルモン濃度

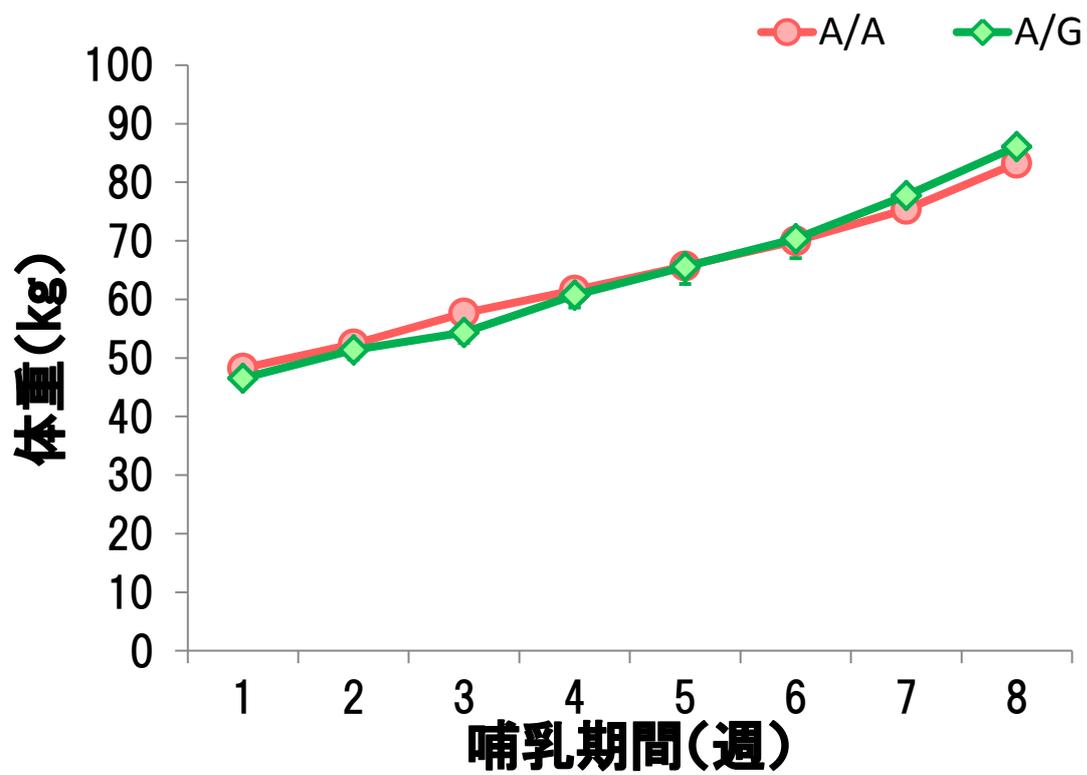


図 14. 子牛 GHR-SNP と哺乳期間の体重の推移

表1.妊娠末期のインスリン反応の速さと分娩状況および繁殖成績との関係

	45分群 (n=28)	60分群 (n=6)	有意差
産歴	2.4 ± 0.2	2.2 ± 0.7	ns
分娩予定日とのずれ (日)	-0.1 ± 0.7	0.8 ± 2.0	ns
分娩難易度	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.0	ns
分娩後の卵巣機能回復日数 (日)	38.3 ± 3.8	20.3 ± 3.6	P<0.05
初回AI日数 (日)	76.4 ± 3.3	76.0 ± 6.3	ns
初回AI受胎率 (%)	28.6%	50.0%	ns

平均±S.E.M (初回AI受胎率除く)

ns ; 有意差なし

表2.妊娠末期のインスリン反応の速さと乳量との関係

	45分群 (n=28)	60分群 (n=6)	有意差
7-100日平均日乳量 (kg)	41.4 ± 0.9	35.9 ± 2.0	P<0.05
7-100日総乳量 (kg)	3888.1 ± 81.2	3375.5 ± 185.9	P<0.05

平均±S.E.M

表3.妊娠末期のインスリン反応の速さと産子の生時体重および血液性状との関係

	45分群 (n=28)	60分群 (n=6)	有意差
生時体重 (kg)	47.2 ± 0.9	42.1 ± 1.7	P<0.05
インスリン濃度 (ng/mL)	0.3 ± 0.0	0.7 ± 0.2	P<0.05
GH濃度 (ng/mL)	13.6 ± 1.3	15.2 ± 4.8	ns
IGF-1濃度 (ng/mL)	121.5 ± 6.3	69.8 ± 5.6	P<0.01
グルコース濃度 (mg/dL)	77.4 ± 5.2	72.1 ± 14.8	ns

平均±S.E.M

ns ; 有意差なし

表4. 妊娠末期のインスリン反応の速さと産子（雌）の発育との関係

	45分群 (n=14)	60分群 (n=3)	有意差
雌子牛の生時体重 (kg)	44.5 ± 0.8	39.5 ± 2.4	P<0.05
離乳時体重 (kg)	95.6 ± 2.3	91.3 ± 6.2	ns
哺乳日数 (日)	69.1 ± 3.1	72.7 ± 3.5	ns
哺乳期間の日増体量(kg)	0.76 ± 0.05	0.71 ± 0.02	ns

平均±S.E.M

ns ; 有意差なし

表5.妊娠末期のインスリン反応の強さと分娩状況および繁殖成績との関係

	L群 (n=18)	H群 (n=16)	有意差
産歴	2.4 ± 0.2	2.3 ± 0.3	ns
分娩予定日とのずれ (日)	0.3 ± 0.8	-0.3 ± 1.1	ns
分娩難易度	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.0	ns
分娩後の卵巣機能回復日数 (日)	35.1 ± 4.6	34.9 ± 5.2	ns
初回AI日数 (日)	78.8 ± 4.8	73.5 ± 3.1	ns
初回AI受胎率 (%)	33.3%	31.3%	ns

平均±S.E.M (初回AI受胎率除く)

ns ; 有意差なし

表6.妊娠末期のインスリン反応の強さと乳量との関係

	L群 (n=18)	H群 (n=16)	有意差
7-100日平均日乳量 (kg)	42.5 ± 1.1	38.1 ± 1.1	P<0.01
7-100日総乳量 (kg)	3993.4 ± 104.3	3577.5 ± 102.5	P<0.01

平均±S.E.M

表7.妊娠末期のインスリン反応の強さと産子の生時体重および血液性状との関係

	L群 (n=18)	H群 (n=16)	有意差
生時体重 (kg)	45.7 ± 1.4	47.0 ± 1.0	ns
インスリン濃度 (ng/mL)	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.1	P<0.05
GH濃度 (ng/mL)	14.2 ± 1.3	13.6 ± 2.4	ns
IGF-1濃度 (ng/mL)	117.1 ± 9.0	107.0 ± 8.8	ns
グルコース濃度 (mg/dL)	79.7 ± 6.5	72.9 ± 7.6	ns

平均±S.E.M

ns ; 有意差なし

表8. 妊娠末期のインスリン反応の強さと産子（雌）の発育との関係

	L群 (n=11)	H群 (n=6)	有意差
雌子牛の生時体重 (kg)	44.0 ± 0.9	42.8 ± 2.1	ns
離乳時体重 (kg)	97.5 ± 2.1	89.2 ± 4.2	ns
哺乳日数 (日)	68.7 ± 3.6	72.0 ± 2.5	ns
哺乳期間の日増体量 (kg)	0.80 ± 0.05	0.66 ± 0.04	ns

平均±S.E.M

ns ; 有意差なし

表9.母牛のGHR-SNP (NsiI) と分娩状況および繁殖成績との関係

	A/A群 (n=34)	A/G群 (n=9)	有意差
産歴	2.5 ± 0.2	1.8 ± 0.4	P<0.01
分娩予定日とのずれ (日)	2.0 ± 0.8	-1.9 ± 1.7	ns
分娩難易度	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.2	ns
分娩後の卵巣機能回復日数 (日)	33.6 ± 3.5	46 ± 8.3	ns
初回AI日数 (日)	76.8 ± 3.2	79.6 ± 5.5	ns
初回AI受胎率 (%)	32.4%	33.3%	ns

平均±S.E.M (初回AI受胎率除く)

ns ; 有意差なし

表10. 母牛のGHR-SNP (NsiI)と乳量との関係

	A/A群 (n=34)	A/G群 (n=9)	有意差
7-100日平均日乳量 (kg)	41.7 ± 0.9	37.8 ± 1.6	P<0.05
7-100日総乳量 (kg)	3920.1 ± 81.9	3555.1 ± 150.0	P<0.05

平均±S.E.M

表11.母牛のGHR-SNP (NsiI) と産子の生時体重および血液性状との関係

	A/A群 (n=34)	A/G群 (n=9)	有意差
生時体重 (kg)	46.8 ± 0.9	46.4 ± 1.5	ns
インスリン濃度 (ng/mL)	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.2	ns
GH濃度 (ng/mL)	14.1 ± 1.2	14.9 ± 3.6	ns
IGF-1濃度 (ng/mL)	110.9 ± 6.4	111.2 ± 14.0	ns
グルコース濃度 (mg/dL)	77.3 ± 5.2	78.5 ± 12.1	ns

平均±S.E.M

ns ; 有意差なし

表12.子牛のGHR-SNP (NsiI)と生時体重および血液性状との関係

	A/A群 (n=15)	A/G群 (n=6)	有意差
生時体重 (kg)	44.2 ± 1.0	43.2 ± 1.4	ns
インスリン濃度 (ng/mL)	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.3	ns
GH濃度 (ng/mL)	11.4 ± 1.3	18.6 ± 4.8	P=0.06
IGF-1濃度 (ng/mL)	116.5 ± 9.1	107.8 ± 16.2	ns
グルコース濃度 (mg/dL)	82.1 ± 6.6	79.2 ± 11.9	ns

平均±S.E.M

ns ; 有意差なし

表13. 子牛のGHR-SNP (NsiI) とその個体の発育との関係

	A/A群 (n=14)	A/G群 (n=6)	有意差
雌子牛の生時体重 (kg)	43.9 ± 1.0	43.2 ± 1.4	ns
離乳時体重 (kg)	94.8 ± 1.9	96.4 ± 4.0	ns
哺乳日数 (日)	68.6 ± 2.7	73.3 ± 1.8	ns
哺乳期間の日増体量 (kg)	0.76 ± 0.04	0.73 ± 0.05	ns

平均±S.E.M

ns ; 有意差なし

## **IX. Abstract**

### **Background**

Insulin resistance (IR) is a physiological condition in which body tissues have a lower response to insulin. Female mammals usually have IR for fetal growth and lactation; however, severe IR induces some metabolic disorders and lower performance after parturition. On the other hand, Insulin-like growth factor (IGF) - 1 is one of the important factors for growth, milk production and fertility, and mainly released from the liver in response to growth hormone (GH) via GH receptor (GHR) in cows. Recently, some SNPs were identified in the bovine GHR gene. The association of some GHR-SNPs with milk yield was examined; however the relationship between GHR-SNPs and growth, metabolic status and fertility remains unknown.

### **Objective**

The study aims to investigate the effect of IR during late gestation in pregnant cows (Exp.1) or GHR-SNP (Exp.2) on postpartum (pp) performance in them and growth in their calf.

### **Methods:**

Exp.1) 34 pregnant dairy cows and their calf were used in Exp.1. Insulin tolerance test was carried out at 3 wk prepartum, and divided into two groups in the time when serum glucose concentration was to

minimum after insulin injection (45min = non-IR (NIR) group; n = 28, 60min = IR group; n = 6). Blood samples were obtained twice a week from 3 wk prepartum to 3 wk pp and body condition (BCS), rumen fill score (RFS) and depth of the left flank (DLF) were measured at the same time. Daily milk yield by 100 days pp and fertility by days to first artificial insemination were recorded.

Exp.2) 44 pregnant dairy cows and 21 their female calves were used in Exp. 2. Genomic DNA was extracted from their blood sample, and PCR products were digested with specific restriction enzymes (NsiI; AA and AG). Sampling and data analysis were same as Exp.1.

## **Results**

Exp.1) In IR group, prepartum BCS and DLF were lower ( $P < 0.05$ ) and serum glucose level tended to be lower ( $P = 0.05$ ) than in NIR group. After calving, NIR group showed greater lipid mobilization and milk yield and later first ovulation pp when compared with IR group ( $P < 0.05$ ). Additionally, calves of NIR group showed greater body weight, higher plasma IGF-1 level and lower plasma insulin level ( $P < 0.05$ ).

Exp.2) GHR-SNP type had little effect on peripartum metabolic status, milk yield and fertility in dairy cows and growth and metabolic status in female calves.

## **Conclusion**

The present study provides that IR level at late gestation in dairy

cows, in preference to GHR-SNP type affect the pp performance in them and growth in their calf.

## IX. 要約

### 背景

インスリン抵抗性 (IR) は、体内組織がインスリンへの低い反応を持つ生理状態である。雌の哺乳類は大抵、胎子成長と泌乳のために IR を持つ；しかし、極度の IR はいくつかの代謝障害と分娩後の低生産能力を引き起こす。一方、インスリン様成長因子 (IGF) -1 は、ウシにおいて成長、乳生産、繁殖性にとって重要な因子の 1 つであり、主に肝臓で成長ホルモン (GH) の刺激により GH 受容体 (GHR) を介して放出される。近年、ウシ GHR 遺伝子にいくつかの SNP が発見されている。いくつかの GHR-SNP と乳量との関連性は明らかになっている；しかし、GHR-SNP と成長、栄養代謝状態、繁殖性との関連はまだ不明である。

### 目的

本研究の目的は、妊娠牛における妊娠末期の IR (試験 1) あるいは GHR-SNP (試験 2) が分娩後 (pp) の生産能力とその産子の発育に及ぼす影響を調査した。

### 方法

試験 1) 妊娠乳牛 34 頭とその産子を試験 1 で用いた。分娩予定の 3 週間前にインスリン感受性試験を行い、インスリン投与後、血清中グルコース濃度が最低値になった時間で 2 群 (45 分=non-IR (NIR) 群；n=28, 60 分=IR 群；n=6) に分けた。分娩 3 週間前から分娩後 3 週目まで週 2 回の採血を行い、同時にボディコンディションスコア (BCS) とルーメンフィルスコア (RFS)

と臍部の深さを測定した。分娩後 100 日までの乳量と初回人工授精までの日数を記録した。

試験 2) 妊娠乳牛 44 頭とその産子の 21 頭の雌子牛を試験 2 で用いた。ゲノム DNA は血液サンプルから抽出し、PCR 産物は特定の制限酵素を用いて処理した (NsiI ; AA と AG)。サンプリングとデータ分析は試験 1 と同様である。

## 結果

試験 1) IR 群は NIR 群と比べ、分娩前の BCS、臍部の深さは低く ( $P < 0.05$ )、血清中グルコース濃度は低い傾向があった ( $P=0.05$ )。分娩後、NIR 群は IR 群と比べ、体脂肪動員と乳量は多く、分娩後初回排卵は遅かった ( $P < 0.05$ )。さらに、NIR 群の子牛は生時体重が重く、血漿中 IGF-1 濃度が高く、血漿中インスリン濃度が低かった ( $P < 0.05$ )。

試験 2) GHR-SNP は分娩前後の栄養代謝状態、乳量、繁殖性、そして雌子牛の発育と栄養代謝状態に、ほとんど影響を及ぼさなかった。

## 結論

本研究では、乳牛の妊娠末期の IR レベルは、GHR-SNP 型よりも優先的に、分娩後の乳量および繁殖性とその産子の発育に影響を及ぼすことを示した。