

氏名(本(国)籍)	三浦 亮太郎(静岡県)
主指導教員氏名	帯広畜産大学 准教授 松井 基純
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	獣医博甲第440号
学位授与年月日	平成27年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学
学位論文題目	ウシ発情周期中に発育する第1卵胞波主席卵胞の生理学的性質—発育動態、機能および受胎性に及ぼす影響—
審査委員	主査 帯広畜産大学 教授 宮原 和郎 副査 帯広畜産大学 准教授 松井 基純 副査 岩手大学 教授 居在家 義昭 副査 東京農工大学 准教授 田中 知己 副査 岐阜大学 教授 村瀬 哲磨

学位論文の内容の要旨

近年の畜産現場における多頭化および乳牛の高泌乳化に伴い、発情発見率の低下および受胎率低下が問題となっている。この問題に対処するために、定時人工授精プログラムの開発を中心とする研究が盛んに行われているが、繁殖成績の向上は十分に達成できていない。このことは、ウシの受胎に関わる繁殖生理に対する理解が不十分であることを示している。そこで、未だ明らかにされていないウシの繁殖生理を明らかにすることを目的にウシの発情周期中に発育し、ほとんどが閉鎖してしまう第1卵胞波の主席卵胞に着目し研究を行った。

第1章では、ウシの発情周期、卵胞波の発育、主席卵胞の選抜に関わるメカニズムなどの基礎的な繁殖生理についてまとめた。その中でも第1卵胞波は、その発育動態やホルモン動態に関して詳細に調査されてはいるが、第1卵胞波主席卵胞(W1DF)特有の性質や、それが繁殖生理や受胎性に及ぼす影響に関しては十分に検討されていないことを述べ、W1DFに焦点を当てた研究を行う必要性を述べた。

第2章では、W1DF特有の性質や機能を明らかにするために、第2卵胞波主席卵胞(W2DF)の性質や機能と比較した。試験1として、Day 6 (Day 0 = 卵胞波発現日)までの卵胞発育動態および卵胞壁血流の比較を、非泌乳牛を用いて行った。その結果、Day 6における卵胞平均直径および卵胞壁血流はW1DFで高かった。また、卵胞発育期間中の血中プロジェステロン(P₄)濃度はW1DFの発育期間で低く推移した。試験2では、Day 6にPGF_{2α}、Day 8にGnRHを投与し、Day 6から9にかけての平均直径、卵胞壁血流および血中エストラジオール(E₂)濃度を測定し、主席卵胞を成熟・排卵誘起させた時の性質の差異を比較した。その結果、Day 8の血中E₂濃度、Day 9の卵胞直径および卵胞壁血流がW1DFで有意に高いことが観察された。さらに、試験3では、Day 8および9におけるLHサージ曝露前後での主席卵胞の卵胞液および顆粒層細胞を回収し、卵胞液中ステロイド濃度および顆

粒層細胞における mRNA 発現量を測定した。LH サージ曝露前 (Day 8) では、W1DF で LHr mRNA 発現量、卵胞液中 E₂ およびアンドロステジオン (A₄) 濃度が高かった。LH サージ曝露後 (Day 9) では、W1DF で血管新生因子およびステロイド合成酵素の mRNA 発現量が高かった。試験 4 では、W1DF と W2DF の排卵後に形成される黄体の性質を比較し、W1DF 排卵後の黄体で血中 P₄ 濃度、黄体断面積および黄体血流面積が有意に高いことを示した。これらの結果から、W1DF は発育、卵胞壁血流、ステロイド合成能および排卵後に形成される黄体の活力が高いことが明らかになった。

第 3 章では、W1DF の発育を制御する要因を検討するため、発育期間中の血中 P₄ 濃度と同一卵巣内での黄体の存在が W1DF の卵胞直径に影響を及ぼすのかを調べた。非泌乳牛を用いて、Day 6 における W1DF の直径と血中 P₄ 濃度の相関関係を調べたところ、有意な相関は見られなかった。一方、W1DF の直径を同一卵巣内に黄体が存在する (共存群) または存在しない (非共存群) で比較したところ、共存群で大きいことが明らかとなった。さらに、血中 P₄ 濃度を比較したところ、共存群は非共存群に比べ低い値を示すことが明らかになった。そのため、卵巣内局所環境が卵胞の性質に及ぼす影響を調べるため、共存群と非共存群との間で、主席卵胞の発育と卵胞液中ステロイドホルモンを比較した。Day 0 から Day 4 における血中 P₄ 濃度および主席卵胞直径推移に両群間で差はなかった。しかしながら、Day 4 における血中 E₂ 濃度は共存群で高い傾向を示した。さらに、卵胞液中のステロイドホルモン濃度を測定したところ、共存群の卵胞液中 P₄ 濃度は有意に高いことが明らかとなったが E₂ および A₄ 濃度に差はなかった。これらのことから、W1DF の発育や性質を制御する要因として卵巣内での黄体との位置関係が大きく関与することが示唆された。

第 4 章では、第 3 章で得られた現象が泌乳牛においても同様に観察されるのかを調べるため、血中 P₄ 濃度と主席卵胞の平均直径の推移を調べた。さらに、共存群と非共存群との間で人工授精後の受胎率を比較した。血中 P₄ 濃度は両群で差なかったが、卵胞直径は Day 8 において共存群で大きくなった。受胎率は共存群で低かった。さらに、未經産牛と経産牛で分けて受胎率を比較したところ、どちらも共存群で低かった。これらの結果から、W1DF と黄体の位置関係は受胎性に強く影響を与えることが明らかとなった。

本研究より、1) W1DF は発育、卵胞壁血流、ステロイド合成能そして黄体形成に関して活力が高い、2) W1DF の発育や性質は黄体と同一卵巣内に共存する場合と共存しない場合とで異なる、3) 人工授精後の受胎率は W1DF が同一卵巣内で黄体と共存する場合に低下する、ということが明らかとなり、ウシの繁殖生理における W1DF の新たな役割に関する知見が得られた。

審査結果の要旨

本研究は、ウシの発情周期中に発育しながらほとんどが閉鎖してしまうために、今まで注目されることのなかった第 1 卵胞波の主席卵胞に着目し、その性質と繁殖生理や受胎性に及ぼす影響について明らかにすることを目的に行われた研究である。

第 1 章では、ウシの発情周期、卵胞波の発育、主席卵胞の選抜に関わるメカニズムなどの基礎的な繁殖生理についてまとめ、第 1 卵胞波主席卵胞 (W1DF) の発育動態やホルモン動態については報告されているが、W1DF の特有の性質や、それが繁殖生理や受胎性に及ぼす影響については十分に検討されていないことを述べ、W1DF に焦点を当てた研究を行う必要性を述べた。

第 2 章では、W1DF 特有の性質や機能を明らかにするために、第 2 卵胞波主席卵胞 (W2DF) の性質や機能と比較した。この結果、W1DF では W2DF に比較して発育、卵胞壁血流、ス

テロイド合成能が高く、さらに排卵後に形成される黄体の活力としての黄体の断面積、血流および血中プロゲステロン (P₄) 濃度が高いことを明らかにした。これらのことから、W1DF は機能的に活力の高い卵胞であることを示し、W1DF 特有の性質を明らかにした。

第3章では、W1DF の発育を制御する要因を検討するために、同一卵巣内における黄体の存在が W1DF の直径や機能に及ぼす影響について検討した。この結果、W1DF と同一卵巣内に黄体が共存すると、卵胞直径は大きく、卵胞液 P₄ 濃度が高いことを示し、W1DF の発育や性質を制御する要因として、同一卵巣内における黄体の有無が大きく関与することを明らかにした。

第4章では、W1DF が人工授精後の受胎性に及ぼす影響について検討した。受胎率は未経産牛でも経産泌乳牛においても W1DF と黄体が同一卵巣内に共存すると低いことを示し、人工授精後に黄体と同一卵巣内に共存する W1DF は受胎性に影響を与えることを明らかにした。

本研究より、W1DF は発育、卵胞機能そして黄体形成に関して活力が高く、W1DF の発育や性質は黄体と同一卵巣内に共存する場合と共存しない場合とでは異なること、さらに人工授精後の受胎率は W1DF が同一卵巣内で黄体と共存する場合に低下することを明らかにした。これらの新たな知見を明らかにしたことはウシの繁殖生理学の進展に寄与するものであり、今後のウシの繁殖成績改善につながる基礎的な情報として期待される。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Evidence that the dominant follicle of the first wave is more active than that of the second wave in terms of its growth rate, blood flow supply and steroidogenic capacity in cows
著 者 名 : Miura, R., Haneda, S., Lee, H.H., Miyamoto, A., Shimizu, T., Miyahara, K., Miyake, Y.I. and Matsui, M.
学術雑誌名 : Animal Reproduction Science
巻・号・頁・発行年 : 145 (3-4) : 114-122, 2014

- 2) 題 目 : Development of the first follicular wave dominant follicle on the ovary ipsilateral to the corpus luteum is associated with decreased conception rate in dairy cattle
著 者 名 : Miura, R., Haneda, S., Kayano, M. and Matsui, M.
学術雑誌名 : Journal of Dairy Science
巻・号・頁・発行年 : 98 (1) : 318-321, 2015

既発表学術論文

- 1) 題 目 : 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
著 者 名 : Lee, H.H., Kida, K., Miura, R., Inokuma, H., Miyamoto, A., Kawashima, C., Haneda, S., Miyake, Y.I. and Matsui, M.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 74 (4) : 457-464, 2012

- 2) 題 目 : Differences in apoptotic status in the bovine placentome between spontaneous and induced parturition
著 者 名 : Hirayama, H., Ushizawa, K., Takahashi, T., Sawai, K., Moriyasu, S., Kageyama, S., Miura, R., Matsui, M., Fukuda, S., Naito, A., Fujii, T. and Minamihashi, A.
学術雑誌名 : The Journal of Reproduction and Development
卷・号・頁・発行年 : 58 (5) : 585-591, 2012
- 3) 題 目 : Effects of exogenous oxytocin on uterine blood flow in puerperal dairy cows: The impact of days after parturition and retained fetal membranes
著 者 名 : Magata, F., Hartmann, D., Ishii, M., Miura, R., Takahashi, H., Matsui, M., Kida, K., Miyamoto, A. and Bollwein, H.
学術雑誌名 : The Veterinary Journal
卷・号・頁・発行年 : 196 (1) : 76-80, 2013
- 4) 題 目 : Lipopolysaccharide in ovarian follicular fluid influences the steroid production in large follicles of dairy cows
著 者 名 : Magata, F., Horiuchi, M., Echizenya, R., Miura, R., Chiba, S., Matsui, M., Miyamoto, A., Kobayashi, Y. and Shimizu, T.
学術雑誌名 : Animal Reproduction Science
卷・号・頁・発行年 : 144 (1-2) : 6-13, 2014