

黒毛和種供卵牛へのアスタキサンチン混合飼料の短期間給与

錫木淳・池本千恵美*

*現西部家畜保健衛生所

要 約

黒毛和種供卵牛の採卵成績の向上を目的として、抗酸化物質であるアスタキサンチン 1%混合飼料を 21 日間給与し、効果検証を行った。黒毛和種経産牛 8 頭の反転供試を行い、対照区の凍結可能受精卵数 9.4 個 (43.6%) に対して、試験区で 10.9 個 (54.0%) と給与により向上する傾向であったが、有意差は認めなかった。今回の試験設定では、アスタキサンチン給与量 (期間あるいは日量) が不足した可能性がある。また、アスタキサンチン給与有無にかかわらず、凍結可能受精卵率は血漿中 β カロテンおよび総コレステロールとの間で有意な正の相関を認めた (それぞれ $R=0.693$, $p<0.01$ 、 $R=0.545$, $p<0.05$)。

緒 言

採卵は広く普及した技術だが、採取された受精卵の数や質が十分でないために、利用可能な受精卵が期待したほど得られないことが多く、供卵牛の無為な空胎期間延長や受精卵単価の上昇により採卵実施農家の不利益となっている。

近年、酸化ストレス下での受精卵発育が抗酸化物質の添加によって改善することが知られてきている¹⁾。抗酸化物質の一つであるアスタキサンチンは、 β カロテンを超える抗酸化作用を持つとされ²⁾、向野らはアスタキサンチン混合飼料の 40 日間の給与による受精卵品質の改善効果について報告している³⁾。

今回、より短期間のアスタキサンチン給与による採卵成績改善効果について検討した。

材 料 及 び 方 法

1 供卵牛

当场繋養中の黒毛和種経産牛を供試した (表 1)。

供卵牛の飼養管理は当场慣行に従い、自給ラップサイレージ、購入乾草および購入配合飼料を適宜給与した。

表 1 供試牛の血統構成

番号	一代祖	二代祖	三代祖	備考
4653	安福久	美津照	糸北鶴	*4654と同性双子
4654	安福久	美津照	糸北鶴	*4653と同性双子
5462	福栄	第2平茂勝	糸北鶴	
6468	平茂勝	忠福	第20平茂	
7674	百合茂	金幸	平茂勝	
9070	金幸	平茂勝	神高福	
9433	勝忠平	美津照	平茂勝	
3893	金幸	平茂勝	神高福	

2 試験設定

1) アスタキサンチン混合飼料の給与有無により、試験区 (アスタキサンチン給与) および対照区 (無給与) を設けた。試験区では 0.1%アスタキサンチン混合飼料 (白石カルシウム、アスタプラスペレット) を基点発情日 (d0) から採卵前日 (d20) まで 21 日間、日量 50g 給与した。個体差の影響を考慮し、同一牛を対照区および試験区に反転して供試した。採卵間隔は 60 日間以上空けた。

2) 過剰排卵処置 (SOV) は当场慣行法に従い FSH (共立製薬、アントリン R10) 20AU の 3 日間漸減投与により行った。

3) 試験プログラムは図1のとおり設定し、基点発情日(d0)、SOV 開始日(d10)、初回人工授精日(d14)および採卵日(d21)の計4回、午前中の飼料摂取前に頸静脈から採血を行った。得られた血漿(ヘパリン)は分注し、-30℃以下で保存した(アンモニアのみ血漿分離直後に測定した)。

3 調査項目

1) 血液検査

(1) 一般栄養状態については基点発情日(d0)および採卵日(d21)の2点での評価とし、総蛋白(TP)、アルブミン(Alb)、血液尿素窒素(BUN)、総コレステロール(Tcho)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(GOT)、ガンマ-グルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)およびアンモニア(NH3)の7項目について、富士ドライケム5500Vにより血漿中濃度を測定した。

(2) ビタミン類についても同様に、基点発情日(d0)および採卵日(d21)の2点での評価とし、血漿中レチノール(Vit.A)、 α -トコフェロール(Vit.E)、 β カロテンの3項目について、高速液体クロマトグラフにより測定した(倉吉家畜保健衛生所に測定依頼)。

(3) 抗酸化能については、基点発情日(d0)、SOV 開始日(d10)、初回人工授精日(d14)、採卵日(d21)の4点での評価とし、血漿中の抗酸化能(銅イオン還元力)について、市販キットを用いて測定した。((株)日本老化学制御研究所、PAO 抗酸化能測定キット)

2) 超音波検査

基点発情後7日目(d7)からSOV 開始日(d10)までの4日間毎日、超音波診断装置(本多電子、HS2100V)により左右卵巣の卵胞径、大・中・小卵胞数、黄体径の各項目の経時的観察を行い記録した。なお、卵胞の大きさについて、小卵胞は直径2mm以上5mm未満、中卵胞は5mm以上8mm未満、大卵胞は直径8mm以上、と定義した。

採卵日(d21)には、左右卵巣の超音波によるスキャン動画を保存し、推定黄体数および遺残卵胞数の計数を行った。

3) 栄養度調査

供卵牛の栄養度について、公益社団法人全国和牛登録協会の方法に従い、き甲、背骨、肋骨、腰角、臀部、尾根部の6部位を評価した。

また、採卵日(d21)に岡田らの方法⁴⁾に従い、超音波診断装置を用いて臀部皮下脂肪厚の計測を行った。

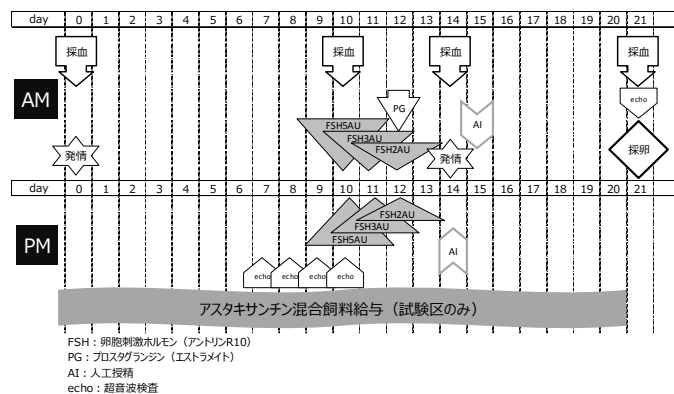


図1 試験プログラム

4 採卵成績の評価

採卵結果について、採卵総数、Bランク以上の凍結受精卵数および凍結受精卵率により評価を行った。また、試験区あるいは対照区で推定黄体数に対する採卵総数が70%未満となった供卵牛については、今回の試験結果には含めないこととした(8頭が評価対象)。

5 統計処理

試験区および対照区の間、あるいは区内での各項目の有意差検定について、t検定もしくはWilcoxonの符号付順位和検定により行った。また、各項目において相関係数(Pearson)を評価した。

結果

1 血液検査

1) 一般栄養状態

結果は表2のとおり。試験区および対照区の両区間での比較では、d21のBUN($p<0.01$)およびTcho($p<0.05$)で試験区が有意に高かった。一方、試験区において、Alb、GOTおよびNH3の各項目でd0とd21の間に有意差があり、AlbおよびGOTではd0が高く、NH3ではd21が

高かった（全て $p < 0.05$ ）。

表 2 血液検査結果（一般栄養状態およびビタミン類）

		TP	Alb	BUN	Tcho	GOT	GGT	NH3	Vit.A	Vit.E	βカロテン	
		g/dl	g/dl	mg/dl	mg/dl	U/L	U/L	μg/ml	IU/dl	μg/dl	μg/dl	
対照区	基点発情	平均	8.0	3.3	6.0	114.1	64.1	19.6	31.5	93.1	213.9	91.2
	(d0)	標準偏差	0.6	0.2	3.1	31.2	14.0	3.5	14.4	17.2	72.4	49.5
	採卵	平均	7.9	3.2	5.9 A	109.3 a	53.4	17.8	40.8	90.6	231.3	99.7
	(d21)	標準偏差	0.4	0.2	1.4	26.7	4.8	4.4	18.4	20.0	101.0	49.4
試験区	基点発情	平均	8.1	3.4 a	6.6	125.3	63.3 a	19.1	30.9 a	88.1	227.0 a	70.6 a
	(d0)	標準偏差	0.5	0.3	2.3	19.7	12.2	2.2	12.6	17.8	45.5	27.9
	採卵	平均	7.9	3.1 b	7.5 B	129.3 b	53.9 b	18.9	39.8 b	88.4	289.0 b	101.2 b
	(d21)	標準偏差	0.5	0.2	1.4	18.5	6.4	2.2	11.6	13.5	33.1	79.7

※ a-b : $p < 0.05$ 、A-B : $p < 0.01$ で有意差あり

2) ビタミン類

結果は表 2 のとおり。試験区において Vit.E および βカロテンで d0 と d21 の間に有意差があり、ともに d21 で高い数値となった ($p < 0.05$)。

3) 抗酸化能

結果は表 3 のとおり。d0、d10、d14、d21 の 4 点について測定したが、両区ともに大きな変化なく推移し、区間あるいは区内での有意差は認めなかった。

表 3 血液検査（抗酸化能）

		基点発情日 (d0)	SOV開始日 (d10)	人工授精日 (d14)	採卵日 (d21)
対照区	平均	380.8	359.8	359.8	363.4
	標準偏差	29.9	72.9	53.1	27.4
試験区	平均	383.5	353.4	393.6	346.1
	標準偏差	79.9	60.3	57.2	47.4

2 超音波検査

1) SOV 時卵巣動態

小卵胞数は d7 から d10 の 4 日間を通じて対照区が多く推移したが、区間の有意差は認めなかった（表 4）。

黄体径については、両区ともに同様に推移し、有意差を認めなかった。

表 4 超音波による卵巣動態

			d7	d8	d9	d10 (SOV)
対照区	小卵胞数	平均	33.4	39.0	44.4	43.9
		標準偏差	8.1	11.5	13.6	13.4
	黄体径	平均	20.7	20.4	21.3	21.3
		標準偏差	3.3	4.2	6.2	6.1
試験区	小卵胞数	平均	30.0	32.9	33.7	31.9
		標準偏差	10.2	11.9	11.4	8.6
	黄体径	平均	20.8	20.6	21.0	19.9
		標準偏差	3.0	3.1	3.2	2.8

2) 採卵時卵巣所見

採卵時黄体数および遺残卵胞数に区間の差は認めなかった（表 5）。

3 栄養度調査

栄養度と超音波により計測した臀部皮下脂肪厚の間に有意な相関を認めた ($R=0.684$, $p < 0.05$)。

4 採卵成績

凍結可能受精卵数および率で試験区が対照区を上回ったが、有意差は認めなかった（表 5）。供試牛個別では凍結可能受精卵数が 8 頭中 5 頭で向上、凍結可能受精卵率が 8 頭中 6 頭で向上した（表 6）。

表 5 採卵成績 (区)

		採卵時	遺残	採卵	凍結可能	凍結可能
		黄体数	卵胞数	総数	受精卵数	受精卵率
対照区	平均	25.0	8.8	21.5	9.4	43.6%
	標準偏差	5.2	6.3	5.7	2.4	
試験区	平均	23.5	7.4	20.1	10.9	54.0%
	標準偏差	5.5	4.8	4.4	5.2	

表 6 採卵成績 (供試牛個別)

番号	対照区		試験区		凍結可能	凍結可能
	採卵総数	凍結可能受精卵数	採卵総数	凍結可能受精卵数	受精卵数の増減	受精卵率の改善
4653	16	11	13	13	2	あり
4654	25	6	25	9	3	あり
5462	14	10	20	18	8	あり
6468	19	6	24	7	1	なし
7674	26	12	24	18	6	あり
9070	25	9	15	7	-2	あり
9433	17	9	19	4	-5	なし
3893	30	12	21	11	-1	あり

5 相関関係

血液検査関連では、試験区、対照区にかかわらず、d21 の β カロテン ($R=0.693$, $p<0.01$) および Tcho ($R=0.545$, $p<0.05$) で凍結可能受精卵率と有意な正の相関を認めた。また、d21 の Tcho では、同日の平均気温 (西伯郡大山町塩津、気象庁ホームページより) との間に有意な負の相関を認めた ($R=-0.660$, $p<0.01$)。

採卵成績について、採卵総数と凍結可能受精卵率で負の相関を認めた ($R=-0.506$, $p<0.05$)。

考 察

種々の酸化ストレスが卵子あるいは受精卵に悪影響を及ぼすことは明らかであり¹⁾、その影響を効率よく緩和することが畜産現場では求められる。アスタキサンチンは、 β カロテンよりも大きな抗酸化活性を持ち脂質ペルオキシラジカルとの直接反応するため²⁾、脂質代謝と関連深い繁殖性の向上に強い効果があると考えられる。

また、Namekawa らは、体外受精後 1～2 日に暑熱暴露された受精卵は発生阻害され、アスタキサンチンの培地添加により緩和されると報告しており³⁾、アスタキサ

ンチンの短期間作用によっても受精卵品質が向上する可能性が考えられた。

これらのことから、向野ら³⁾ よりも短い 21 日間のアスタキサンチン混合飼料給与の検討を行い、試験区において凍結可能受精卵数および率において改善傾向がみられたが、有意差は認めなかった。これは、体外環境と体内環境の相違により、アスタキサンチンによる卵子あるいは受精卵への抗酸化作用が不足した可能性がある。また、今回使用した混合飼料は、向野らの使用したものと同等規格ではあるが異なる製品であり、消化・吸収動態あるいは体内分布に若干の差異を生じたのかもしれない。血中抗酸化能が試験区で上昇しなかった点からも、アスタキサンチン給与量の不足が示唆されるが、今回使用した抗酸化能測定キットが直接ラジカル除去活性を評価できないため、アスタキサンチンの存在とその効果を直接証明できているかどうかは判然としない。ただ、血液検査で Vit.E および β カロテンが試験区内の d0 と d21 の間で有意な上昇が認められており、Vit.E でやや機序が異なるものの両者とも抗酸化物質であることから、アスタキサンチン給与により体内の酸化還元環境が変化し、抗酸化物質の間で何らかの補完作用が起こった可能性もある。

試験区 (d21) で BUN、Tcho が対照区より有意に高くなったが、原因は特定できていない。ただ、BUN については、向野らも同様に試験区で上昇したと報告しており、第一胃微生物の代謝が活性化した可能性について言及している。Tcho については、アスタキサンチン混合飼料に第一胃バイパスを目的として含まれている脂肪酸カルシウムが影響していると考えられるが、前述した Vit.E および β カロテンの上昇とも関連しているかもしれない。Alb、GOT および NH₃ の各項目で試験区のみには区内で有意差を認めたが、原因については特定できていない。

試験区、対照区を問わず、d21 の β カロテンおよび Tcho で採卵成績と強い相関を示したが、これは過去の多数の報告と一致する。つまり、農家段階での採卵に向かった対応としては、青草あるいは飼料添加物による β カロテンの充足と、特に冬期における摂取カロリーの維持がやはり重要であると考えられる。ただ、今回 d21 の平均気温と Tcho の間に有意な負の相関が認められて

おり、冬期の熱産生のための脂質代謝による影響も考えられるものの、夏期の食欲不振への対応も必要と考えられる。

栄養度と超音波による臀部皮下脂肪厚は既報のとおり有意な正の相関を示したが、臀部皮下脂肪厚と採卵成績（採卵総数および凍結可能受精卵率）の間で相関は認めず、極端な過肥あるいは消瘦でなければ採卵成績への影響は少ないものと考えられる。

最近、Sugimoto らにより採卵数に関わる原因遺伝子 AMPA1 が特定されている⁶⁾。また、Hirayama らは AMPA1 に加えて血漿中の AMH（抗ミュラー管ホルモン）濃度を用いた供卵牛の採卵数予測方法について提案している⁷⁾。供卵牛からの採卵数については、これらの新しい技術が今後の和牛改良の点からも有用であると考えられるが、利用可能な受精卵を増やすという目的のためには、受精卵の品質を左右する部分についても遺伝的な関与を調査することが期待される。当面は、抗酸化物質等の飼料添加物を利用し、低価格で効率的な添加物を模索する必要があると思われる。また、SOV への反応不良牛の存在が依然として大きな課題として残されており、今後検討する必要がある。

参 考 文 献

- 1) Takahashi ら、Journal of Reproduction and Development, Vol.58, No 1 (2012)
- 2) 石川ら、食品素材・成分の抗酸化性、H20 年度農水産物機能性活用推進事業報告書(2009)
- 3) 向野ら、石川県畜産総合センター研究報告第 41 号(2009)
- 4) 岡田ら、愛媛県畜産試験場研究報告第 21 号 (2006)
- 5) Namekawa ら、Reprod Domest Anim.Dec, 45 (2010)
- 6) Sugimoto ら、PLos ONE,5 ,11 ,e13817 (2010)
- 7) Hirayama ら、Journal of Reproduction and Development, Vol.58, No 3 (2012)