

氏 名(本籍) 鎌 田 八 郎

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 645 号

学位授与年月日 平 成 14 年 3 月 7 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 牛におけるセレン栄養と繁殖機能の関連性に関する研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 小 原 嘉 昭
教 授 佐 藤 英 明
教 授 秋 葉 征 夫

論文内容要旨

第1章 序論

マイクロミネラルのひとつであるセレンは以前は毒物としてしか考えられていなかったが、ラット肝壊死を防ぐ因子として必須であることが証明されて以来、様々な生理機能が明らかになってきている。牛を含めて家畜においても、セレンは古くから白筋症を防ぐ因子として知られていたが、近年特にセレンが繁殖機能の維持に大きな役割を演じていることが報告されている。生化学的にもこれまでにセレン含有酵素が数種類同定されているほか、セレノシステインに対応する遺伝子暗号として終止コドン (UGA) が使われるなど、セレンはきわめて興味深いミネラルである。しかしながら、動物はセレンに対する恒常性機能を持っておらず、セレン摂取が狭い適正範囲を超えると中毒を起こすことが報告されている。このことからセレンの生理機能を家畜の飼育に積極的に利用する上で、厳密なセレン要求量を決めることが必要であり、また飼料中の正確なセレン含量を知ることが重要である。セレンの要求量に関しては、最近セレンの新しい生理機能が次々と明らかになってきていることから、特に日本飼養標準のセレン要求量の推奨値 (0.1 ppm) を見直すべきと考えられる。実際に乳牛の周産期における血漿中セレン濃度を測定してみると妊娠末期はきわめて低値であり (Fig.1)、セレンの後産停滞防止や受胎率の向上効果が期待できない状況にある。飼料中セレン含量に関しては、分析法が煩雑であるため、畜産現場で利用できるレベルの分析データ数は少ない。基本的には飼料中のセレン含量は生育した土壌中のセレン含量を反映しており、本研究においてもタイにおける試験で、その関係を明らかにした (第5章)。日本においては北海道が低セレン地帯として知られており、子牛の白筋症の発生が報告されている。また主要な穀物輸入先である米国においても、産地による土壌中セレン濃度の差が大きいことが知られている。しかし輸入穀物においてもセレン含量の分析はほとんど行われていないため、日本国内で飼養されている家畜が充分量のセレンを摂取していない場合があると推測されるにもかかわらず、実際の家畜のセレン摂取量については全く分かっていない。これらの状況を踏まえ、本研究では特に繁殖機能に対する効果を期待したセレンの積極的な利用を進めることを目的として、第2章では乳牛の周産期のセレン栄養状態について、第3章および第4章では繁殖機能におけるセレンの役割について、第5章では土壌・牧草・家畜間のセレン水準の相互関係について解明する実験を行った。

第2章 乳牛の分娩前後におけるセレン栄養状態の推定

はじめに乳牛が実際にどれくらいのセレンを摂取し、体内にどれくらいのセレンを蓄積しているかを知る目的で、セレンの出納試験を行った。試験は妊娠末期（妊娠 210 日及び 266 日：n = 9）と泌乳期（分娩後平均 67 日：n = 4）に全糞尿採取法により行い、胎児数が出納値に及ぼす影響についても検討を行った（Table 1）。妊娠末期の出納試験の結果、0.106ppm セレンを含む飼料を与えた場合、セレンの平均摂取量および蓄積量はそれぞれ 973.3 $\mu\text{g}/\text{日}$ および 136.9 $\mu\text{g}/\text{日}$ であった。また胎児 2 頭分増給区で 1 頭分増給区より蓄積量が多かった。双胎妊娠と単胎妊娠との間にはセレンの蓄積量には有意な差はなかったが、産子の血中セレン濃度は双子において有意に低かった（Table 2）。また飼料給与量の増加、単子、双子に関わらず産子の血中セレン濃度は適正水準より低く、セレン不足がうかがわれた。母牛の全血中セレン濃度についても適正水準を下回っていた。一方泌乳期では、飼料摂取量の増加および飼料の平均セレン含量の増加（0.226ppm）により、セレンの摂取量は妊娠期の 4.7 倍（4611 $\mu\text{g}/\text{日}$ ）に達し、蓄積量も 300 $\mu\text{g}/\text{日}$ と妊娠期の 2.2 倍であった（Table 3）。また血中セレン濃度は適正範囲にあった。これらの出納試験成績から妊娠末期におけるセレン供給不足が示唆された。

次に妊娠期のセレン給与水準の違いが母牛及びその産子に及ぼす影響について調べた。北海道産の低セレン濃度チモシー乾草を主体とした基礎飼料（平均セレン含量 0.018 ppm）を用い、添加区にはセレンとして 0.3 ppm 増となるように亜セレン酸ソーダを添加した。試験は人工授精前から分娩まで継続した（添加区 n = 5、無添加区 n = 5）。母牛の分娩時の血漿中セレン濃度は飼料中セレン濃度を反映し、セレン添加区の値が有意に高かった（Table 4）。その差はそのまま出生子牛の血中セレン濃度の差として現れ、処理区間に有意な差が見られた。また、無添加区の母牛及び両区の子牛血漿中セレン濃度は欠乏レベルにあったが、いずれの場合においても、白筋症時に増加することが報告されている血漿中酵素である GOT、GPT、LDH、CPK 活性に大きな変化はなく、白筋症の兆候は見られなかった（Table 5）。特に子牛血漿中ビタミン E 濃度は欠乏レベル以下であったにもかかわらず（Table 6）白筋症の発生は認められず、このことから本症の発生にはセレン、ビタミン E 以外の因子が関与していると推定された。また古くからセレンの胎盤停滯防止効果が知られているが、無添加区においても胎盤停滯は発生しなかった。これは飼料中にビタミン E が充足していたためと推定される。現在まで胎盤停滯防止におけ

るセレンの役割は全く不明である。しかし胎盤中セレン濃度に有意な差があること (Table 4) から、セレンが胎盤自体において作用を持ち、ビタミンE欠乏が併発した場合その障害により胎盤停滞が起こる可能性が考えられる。このことについては第4章で検討を行う。またセレンはサイロキシンデオデナーゼの必須成分であり、ラットではセレン欠乏によりT3濃度の減少が報告されているが、本試験ではT3の減少は確認できなかった (Table 7)。さらに最近セレンの経口投与が初乳中の免疫グロブリンG (I g G) 濃度を増加させると報告されているが、本試験の初乳中I g G濃度に差は見られなかった (Table 8)。

第3章 黄体機能に対するセレンの効果

先に述べたように、セレンは繁殖機能の正常な維持に必須なミネラルであるが、どの臓器で、どのような作用をしているかに関してはほとんど明らかになっていない。このことはセレンの要求量を精密に知るうえで致命的な問題となっている。一方、繁殖機能を担う臓器のひとつである黄体が積極的にセレンを取り込む臓器のひとつであることが報告されており、セレン欠乏による受胎率の低下が黄体機能と関連している可能性が予想される。本章では、黄体におけるセレンの機能をインピボ及びインピトロの実験系を用いて検討した。

はじめに、非妊娠牛に対するセレン添加を行い、性周期におけるプロジェステロン合成へのセレンの影響を調べる実験を行った。非妊娠ホルスタイン種牛4頭を用い、本試験120日の試験を、セレン添加区5回、セレン無添加区7回、処理を入れ替えて行った。飼料はイタリアンライグラスウエファと濃厚飼料を95:5の比率で与え、セレン添加区には亜セレン酸ソーダをセレンとして0.5 ppm 増となるように添加した。採血は1日間隔で朝の給餌前に行い、血漿中のプロジェステロン濃度をエンザイムイムノアッセイを用いて測定した。試験期間中の血漿中平均セレン濃度は添加区で0.081 ppm、無添加区で0.047 ppm となり有意な差が見られた。セレン添加により血漿中プロジェステロン濃度が平均で22%高くなり、発情黄体の機能に対するセレンの効果が確認された (Fig. 2)。なお性周期の長さは両区で差がなく、また卵胞囊腫も観察されなかった。

次に妊娠期のプロジェステロン合成へのセレンの影響を調べるために、セレン水準に差をつけた飼料で馴致した未経産牛を人工授精し、妊娠期間中の血漿中プロジェステロン濃度の推移を観察した (試験方法は第2章と同じ)。妊娠前期は血漿中プロジェステロン

濃度の個体差が大きく有意な差は見られなかったが、妊娠後期においてセレン添加区で血漿中プロジェステロン濃度が高く推移した (Fig. 3)。しかし、同じ性ステロイドホルモンであるエストロン、エストラジオール 17β の妊娠末期の血漿中濃度には有意な差は見られなかった。

インビボの試験において、セレンが黄体機能を亢進している可能性が示されたことを受けて、インビトロで培養黄体細胞に対するセレンの効果を検討した。屠場で採取した開花期黄体を無菌環境下でコラゲナーゼ処理し細胞に分散した。得られた黄体細胞は10%胎児血清を含む199培地を用いて5%炭酸ガス、37℃で培養を行いモノレイヤーとした後、培養液に5~200 ppbのセレンを添加した。その結果、培養上清中へのプロジェステロン生産量がセレンの添加量に応じて増加した (Fig. 4)。この時、細胞内の過酸化脂質が減少しており、セレンは細胞に対して毒性のある過酸化脂質を分解することにより、黄体機能の維持に貢献していると推定された (Fig. 5)。また黄体細胞に黄体形成ホルモン (LH) を作用させてプロジェステロン合成を高めてやると、細胞内の過酸化脂質が増加することが示され (Fig. 6)、黄体では、プロジェステロンの生合成過程で酸素ラジカルが発生しやすく過酸化物ができやすいことが推測された。

インビボとインビトロの実験結果から、セレンは黄体機能の維持を介して繁殖機能に寄与していることが明らかになった。

第4章 培養細胞系を用いた胎盤剥離におけるセレンの役割

胎盤停滞は乳量の低下や子宮の回復の遅れに伴う受胎率の低下により農家に多大な損害を与える疾病である。その発生要因は複雑であり、難産や双子分娩といった分娩の難易度に関係するほか、分娩末期のプロジェステロン不足といった内分泌要因、さらにセレンを含めた栄養的要因の関与も推定されている。しかしながら、いずれの場合においても胎盤停滞発生機序の詳細は不明である。本章では胎盤停滞低減のためのセレンの積極的な利用を図る目的で、胎盤排出におけるセレンの役割の解明を試みた。

実験には培養胎盤細胞の系を用いた。セレン処理・無処理で継代培養した胎盤由来繊維芽細胞に、分娩時のホルモン刺激を想定してコルチゾールとプロスタグランジン (PG) の前駆体であるアラキドン酸を培地に添加した。その結果、セレン前処理細胞は添加後4時間でほとんどの細胞が培養皿から剥離して培養液中に浮遊したが、セレン未処理細胞は

細胞の形態が変化したものの培養皿に固着したままで、48時間後でも細胞の剥離は部分的であった (Fig. 7)。分娩後の胎盤の排出は胎児胎盤と母胎盤の剥離が必要であること (すなわち細胞間の接着が切れること) や、剥離がうまくゆかず12時間以内に排出されない場合を胎盤停滞と定義していることから、培養細胞を用いたインビトロの系が胎盤剥離のメカニズム及びその過程でのセレンの作用の解析に利用できると考えられる。

細胞外マトリックスを切断する酵素としてマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) が知られており、すでにある種のMMP活性が胎盤停滞牛と正常牛の胎盤で異なることが報告されている。そこでホルモン処理後の培養細胞のMMP活性をザイモグラフィを用いて測定したところ、セレン前処理細胞において高いMMP活性を示した (Fig. 8)。細胞の剥離はホルモン刺激を受けた細胞がMMPを活性化して、細胞外マトリックスを切断することにより起こることが明らかになった。この過程にセレンが関与しており、インビボにおけるセレン欠乏時の胎盤停滞の発生もMMPが活性化されないためにおこる可能性が示唆された。

今回観察されたアラキドン酸による細胞剥離の誘導は、PG合成阻害剤であるインドメタシン添加で阻害されず、またアラキドン酸の代わりにPGF 2α 、PGE 2 を用いても再現されなかった (Fig. 9)。このことはMMPの活性化のためのシグナルはPGではなく、アラキドン酸であることを示しており、胎児排出のためのシグナルと胎盤排出のためのシグナルが異なることを意味している。PGを用いた分娩誘起では胎盤停滞が頻発するが、胎盤排出のためのシグナルがないことによると考えられた。

セレンが分娩後のMMP活性化にどのように関与しているのかは今後の課題として残ったが、これまでに知られているセレンの機能 (抗酸化機能等) では説明できないことから、胎盤剥離のためのシグナル伝達を担う等の新しいセレンの作用機構が考えられる。

第5章 土壌・牧草・家畜間のセレン水準の相互関係

砂質土壌、熱帯性泥炭土壌、ラテライト土壌という3種の異なる土壌が見られるタイ南部ナラチワット県において、土壌・牧草・家畜間のセレン水準の相互関係について調査した。それぞれの草地から土壌、牧草、牛血漿試料を採取しセレン含量を測定した結果、土壌のセレン含量は牧草を通して牛血漿中セレン濃度に反映しており、ラテライト土壌の試料が他の2地域よりセレン含量が高い傾向が見られた (Table 9)。また牧草中のセレン含

量はNRCの推奨値（0.3 ppm）より低く、血漿中セレン濃度も充足レベルになかったことから、牛群の慢性的なセレン欠乏が予測された。しかしながら典型的なセレン欠乏症である白筋症はこの地域では見られず、その理由として、牛群の栄養状態を示すBCS（ボディコンディションスコア）の平均が2～3であったように家畜の生産性自体が低くセレンの必要量が低くなっている可能性や部分的にセレンの機能を補完することが知られているビタミンEが充足している可能性が推測された。

第6章 まとめ

本研究により、以下の点が明らかとなった（Figure 10）。

1. 妊娠末期及び泌乳期の乳牛を用いたセレンの出納試験成績から、泌乳期の値が妊娠期の値を大きく上回ることが示され（セレン摂取量で4.7倍、蓄積量で2.2倍）、この差が血液中のセレン濃度に反映していると考えられた。また母牛及び子牛の血中セレン濃度から妊娠期のセレン供給不足が示唆された。
2. 妊娠期間中の給与セレン水準の差は母牛、子牛の血漿中セレン濃度及び初乳中、胎盤中セレン濃度に反映した。無添加区の血漿中セレン水準は極端な欠乏域にあったが、白筋症の兆候は見られず、また胎盤停滞も発生しなかった。さらに血漿中甲状腺ホルモン濃度、初乳中IgG濃度にも差は見られなかった。
3. 培養黄体細胞を用いた実験から、セレンは黄体がプロジェステロン産成に伴って発生する過酸化物を解毒することにより、黄体機能を正常に維持していることが推定された。
4. 乳牛へのセレンの投与は、発情黄体および妊娠黄体の機能を亢進し、血漿中プロジェステロン濃度を高めることが示された。
5. 培養胎盤細胞を用いた実験から、分娩シグナルが胎盤剥離のためのMMP活性化に至る過程でセレンが機能している可能性が示された。
6. 3種（砂質、熱帯性泥炭、ラテライト）の異なった土壌地域において土壌・牧草・家畜間のセレン水準の相互関係について調査したところ、放牧牛の血漿中セレン濃度が牧草及び土壌中のセレン含量を反映することが示された。

本研究で得られた出納試験を中心としたデータから、現在の日本におけるセレン給与システムには問題があることが示された。すなわち、セレンの充足状況を示す牛血漿中セレン濃度は、セレンが特に必要と考えられる分娩前（妊娠期）に低レベルであり、泌乳期に

なると充足レベルに達した。これはセレンの要求量が飼料中の一律な濃度表示であるため、セレンの摂取量が採食量に大きく依存し、その結果飼料摂取量が大きく異なる妊娠期と泌乳期でセレン摂取量が大きく異なることに帰因する。さらに第1章で述べたように、日本ではセレンが有効に利用されているとは言えない状況にある。本研究及び他の研究者の報告においてセレンの新しい機能が次々と明らかになってきていることから、周産期の飼養管理技術としてセレンの積極的な利用を提案できるものと考えられる。妊娠期のセレンの補給を効果的に行うことにより、セレンの機能を利用した生産性の向上が期待できる。ただし、米国のように一律に0.3 ppmの添加では泌乳期において過剰になるのは明白であるので、添加は妊娠期に限るべきと考えられる。窒素やリンに限らずセレンにおいても環境問題は避けられない問題であるので、不必要なセレンを与えて、いたずらにセレン排泄量を増加させることは避けなければならない。

セレンの繁殖機能における役割については、黄体におけるプロジェステロン合成の際に副産物として生成される過酸化物を解毒することにより、セレンが黄体機能の維持に寄与していることを明らかにした。セレンの受胎率向上のメカニズムや妊娠維持における貢献が解明された。胎盤停滞の防止機能については、分娩後の胎盤剥離に至るシグナル伝達をセレンが仲介している可能性を示した。これらの作用は、子牛の白筋症の予防を含めて、先に述べた妊娠期のセレン補給の重要性を支持する知見となった。

以上の結果から、妊娠末期のセレン補給が繁殖成績の向上を介して牛の飼養管理技術及び生産性の向上に貢献できる可能性が示唆された。

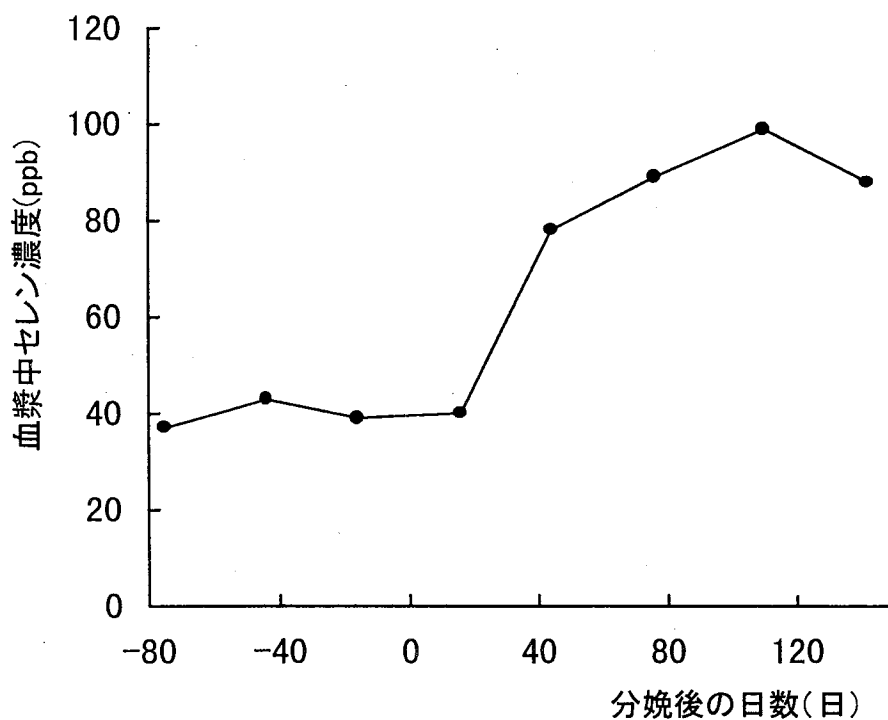


図1. 分娩前後における血漿中セレン濃度の変化

表1. 妊娠末期のセレン出納成績

		胎児数		給与水準			妊娠週齢		
		単胎	双胎	H	L	SE	30	38	SE
n	(頭)	5	4	4	5		9	9	
体重	(kg)	688	654	701	641	45	652	689	3
DM 摂取量	(g)	9565	9153	10297 ^a	8421 ^b	331	9310	9409	47
消化率	(%)	69.2	62.1	64.7	66.6	2.3	65.8	65.5	0.5
セレン									
摂取量	(μ g)	1092.1 ^a	864.1 ^b	1071.5	884.7	59.8	973.2	982.9	5.2
糞中排泄量	(μ g)	756.3 ^a	636.5 ^b	744.5	648.3	32.5	689.3	703.4	10.7
	(%)	69.8	73.8	70.2	73.4	1.4	71.5	72.2	1.1
尿中排泄量	(μ g)	186.4 ^a	98.3 ^b	165.5	119.3	23.7	139.1	145.7	4.7
	(%)	16.6	11.4	14.7	13.3	1.5	13.7	14.2	0.4
蓄積量	(μ g)	149.4	129.2	161.5 ^a	117.1 ^b	12.7	144.8	133.8	11.1
	(%)	13.6	14.9	15.1	13.3	0.9	14.8	13.7	1.2

H : 胎児 2 頭分増給 L : 胎児 1 頭分増給

a, b: P<0.05

表2. 母牛およびその産子の血中セレン濃度

		胎児数		給与水準		SE
		単胎	双胎	H	L	
子牛						
血漿中 Se	(ppb)	51.4 ^a	36.5 ^b	45.2	42.7	4.1
全血中 Se	(ppb)	221.9 ^A	149.0 ^B	199.8	171.1	13.7
体重	(kg)	39.6 ^a	28.8 ^b	33.6	34.8	2.7
合計体重	(kg)	39.5 ^a	57.6 ^b	47.7	49.4	3.2
母牛						
(妊娠期)						
血漿中 Se	(ppb)	68.9	62.3	67.4	63.7	3.1
全血中 Se	(ppb)	168.1	166.6	179.8	155.0	12.1
(分娩時)						
血漿中 Se	(ppb)	54.1	54.6	56.1	52.6	3.8
全血中 Se	(ppb)	164.3	160.8	179.8	145.3	21.2

H : 胎児 2 頭分増給 L : 胎児 1 頭分増給
 a, b: P<0.05 A, B: P<0.01

表3. 妊娠末期と泌乳期のセレン出納値の比較

		妊娠末期	泌乳期
体重	(kg)	668±21	642±44
DM摂取量	(kg)	9282±1126 ^A	20373±970 ^B
セレン			
摂取量	(μg)	973.3±177.3 ^A	4611.1±250.4 ^B
糞中排泄量	(μg)	695.3±9.6 ^A (71.4%)	2463.5±95.4 ^B (53.4%)
尿中排泄量	(μg)	141.2±64.0 ^A (14.5%)	825.4±164.7 ^B (17.9%)
乳中移行量	(μg)		1022.6±92.6 ^B (22.2%)
蓄積量	(μg)	136.9±40.5 ^A (14.1%)	299.7±171.8 ^B (6.5%)

A, B: P<0.001

表4. 妊娠期のセレン給与量の違いが分娩時の母牛・子牛の血漿、
初乳および胎盤中のセレン濃度に及ぼす影響

		+Se	-Se
血漿(分娩時)			
	(ppb)		
母牛		67.2±15.2 ^A	15.0±2.1 ^B
子牛		38.2±3.2 ^A	19.6±1.7 ^B
初乳	(ppb)	87.4±5.3 ^A	25.6±3.1 ^B
胎盤	(ppb)	90.4±18.6 ^A	54.6±12.4 ^B

+Se: 0.3 ppm セレン添加

-Se: 無添加

A, B: P<0.01

表5. 妊娠期のセレン給与量の違いが出生後の子牛血漿中GOT、GPT、LDH、
CPK活性に及ぼす影響

酵素	処理	出生後の採血時間			
		0hr	24hr	48hr	1week
GOT (Karmen unit)	+Se	14.4±2.1	44.7±12.8	42.4±11.7	25.6±1.7
	-Se	18.6±2.1	56.0±13.3	47.4±11.2	30.3±6.8
GPT (Karmen unit)	+Se	7.4±3.3	12.4±3.8	9.7±3.0	7.3±3.6
	-Se	6.0±3.6	10.3±4.5	9.2±2.8	5.0±3.9
LDH (wroblewski unit)	+Se	1252±35	1960±184	2013±169	2049±188
	-Se	1289±172	2244±361	2141±90	2213±153
CPK (IU/l. 30°C)	+Se	57.7±4.2	32.4±15.9	14.9±5.9	11.1±2.7
	-Se	69.1±37.4	41.9±20.8	23.7±25.7	10.7±8.6

+Se, -Se: 前表参照

GOT: glutamic oxaloacetic transaminase

GPT: glutamic pyruvic transaminase

LDH: lactate dehydrogenase

CPK: creatine phosphokinase

表6. 分娩時血漿中および初乳中の α トコフェロール濃度

		+Se	-Se
血漿(分娩時)			
	(μ g/ml)		
母牛		0.89 \pm 0.19	1.30 \pm 0.30
子牛		0.27 \pm 0.17	0.23 \pm 0.18
初乳			
	(μ g/ml)	4.88 \pm 2.34	5.80 \pm 1.60

+Se, -Se: 前表参照

表7. 妊娠期のセレン給与量の違いが出生後の子牛血漿中T3、T4、インシュリン濃度に及ぼす影響

処理		出生後の採血時間			
		0hr	24hr	48hr	1week
T3 (ng/dl)	+Se	647 \pm 227	1385 \pm 225	1418 \pm 257	900 \pm 228
	-Se	593 \pm 217	1516 \pm 283	1328 \pm 297	912 \pm 167
T4 (μ g/dl)	+Se	26.6 \pm 10.8	36.7 \pm 10.5	29.2 \pm 10.1	16.5 \pm 4.3
	-Se	18.0 \pm 4.6	28.8 \pm 5.7	23.3 \pm 3.9	15.6 \pm 5.2
T3/T4	+Se	25.4 \pm 8.2	40.1 \pm 11.6	50.9 \pm 10.2	55.36 \pm 10.
	-Se	35.5 \pm 14.0	52.8 \pm 5.5	57.1 \pm 10.8	60.72 \pm 8.7
Insulin (μ IU/ml)	+Se	8.33 \pm 6.53 ^a			
	-Se	2.63 \pm 2.95 ^b			

+Se, -Se: 前表参照

a, b: P<0.05

表8. 妊娠期のセレン給与量の違いが初乳および母牛血漿中IgG濃度に及ぼす影響

		+Se	-Se
血漿	(mg/ml)	20.8 \pm 3.9	22.3 \pm 9.6
初乳	(mg/ml)	60.8 \pm 32.7	55.4 \pm 38.8

+Se, -Se: 前表参照

表 9. 三種類の草地における土壌、牧草および放牧牛血漿中セレン濃度

	砂質土壌	泥炭土壌	ラテライト土壌
牧草 (ppb)			
Ruzi grass (<i>Brachiaria ruziziensis</i>)	33±26	125	200±123
Creeping signal grass (<i>Brachiaria humidicola</i>)	96		
Torpedo grass (<i>Panicum repens</i>)	107	51	
Cori grass (<i>Brachiaria milliformis</i>)	44±8		
Hamata (<i>Stylosanthes hamata</i>)	134		
Orientalis (<i>Chrysopogon orientalis</i>)	171		
Carpet grass (<i>Axonopus compressus</i>)		23	300
Native grass			271
土壌 (ng/g)	13±14	25	40±1
(1NHC1 可溶性セレン)			
牛血漿 (ppb)	30±4 ^A	25±14 ^A	50±5 ^B

A, B:P<0.01

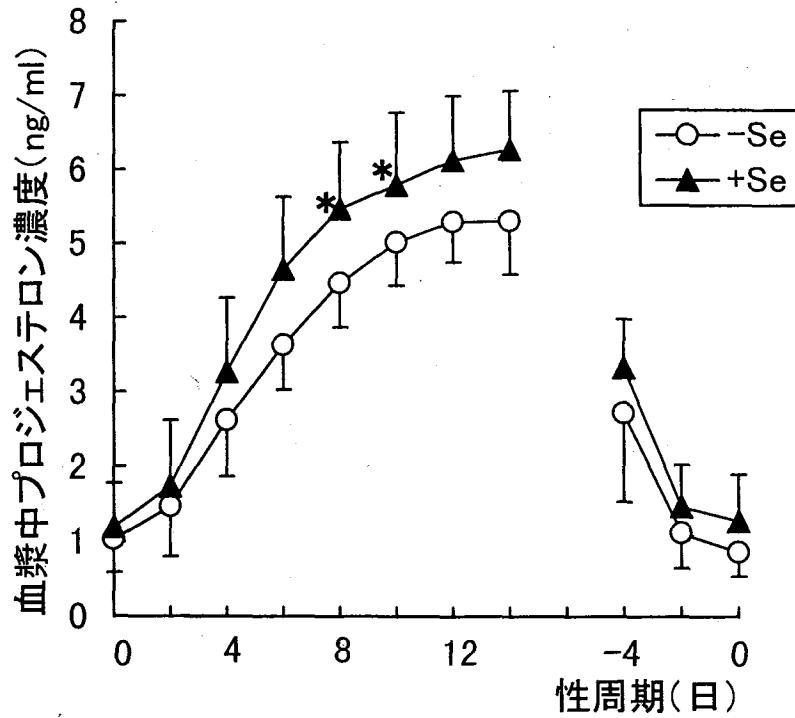


図2. 性周期における血漿中プロジェステロン濃度に対するセレン添加効果.

* : P < 0. 05.

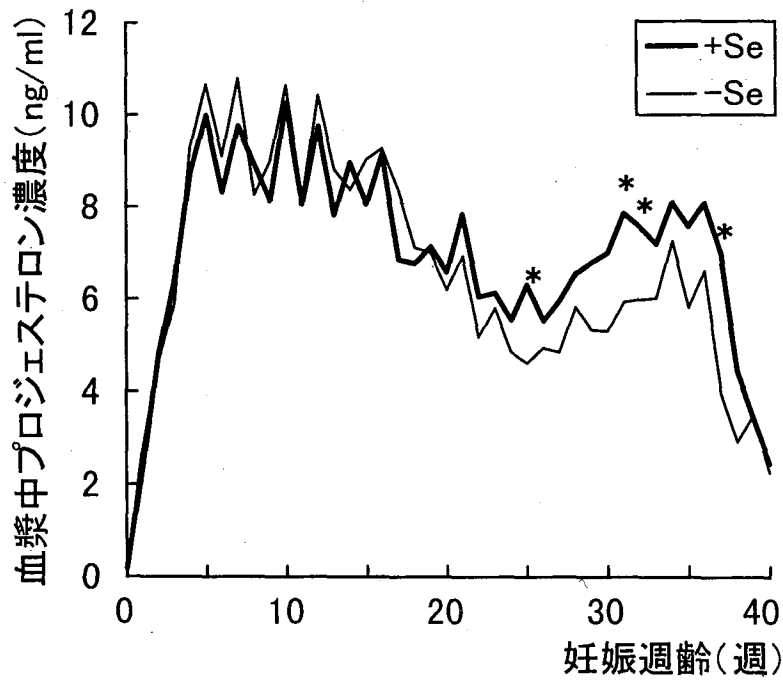


図3. 妊娠牛の血漿中プロジェステロン濃度に対するセレン添加効果

* : P < 0. 05.

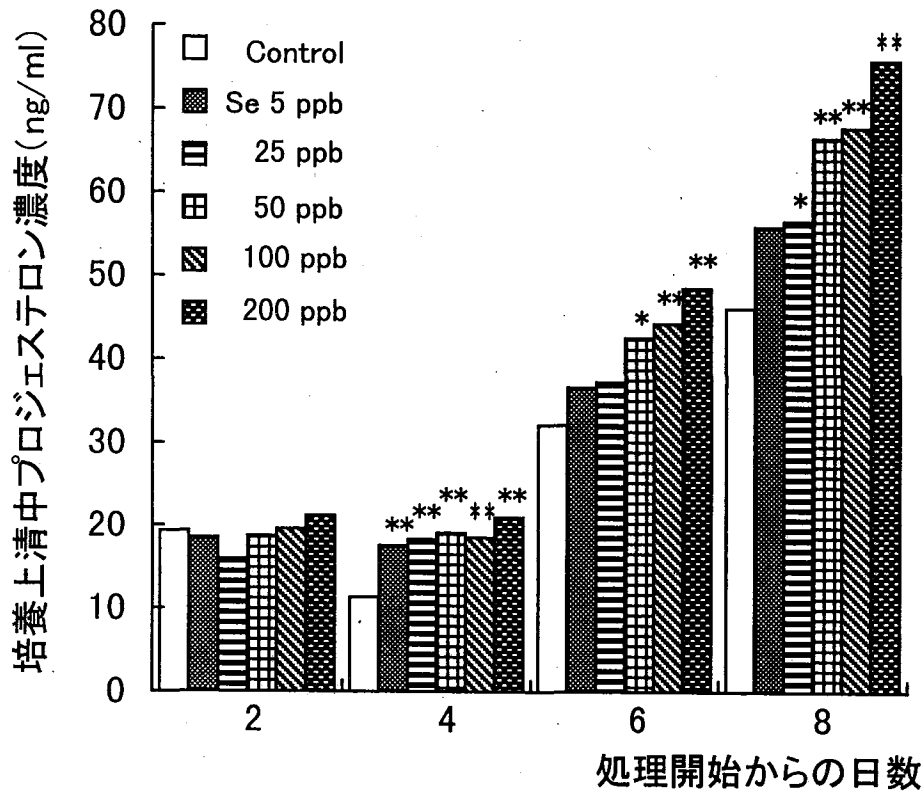


図4. 黄体細胞による培養上清へのプロジェステロン産生に対するセレン添加効果.

*, **: P < 0.05, P < 0.01 (無添加に対する有意差)

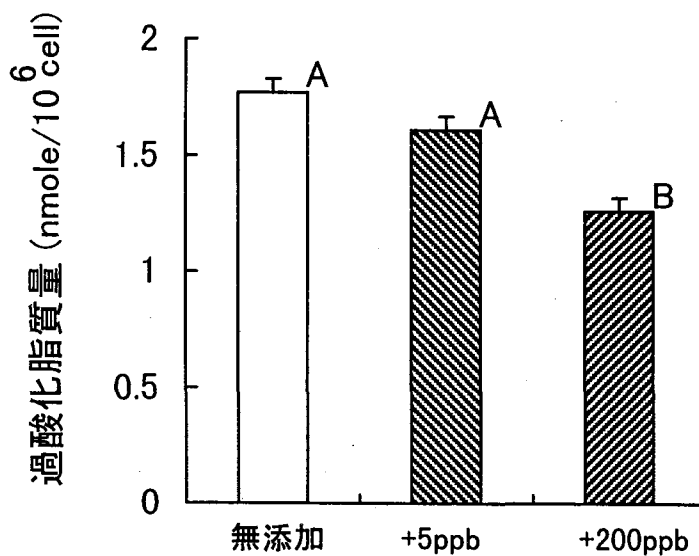


図5. 黄体細胞中の過酸化脂質量に対するセレン添加効果

A, B: P < 0.01 (無添加に対する有意差)

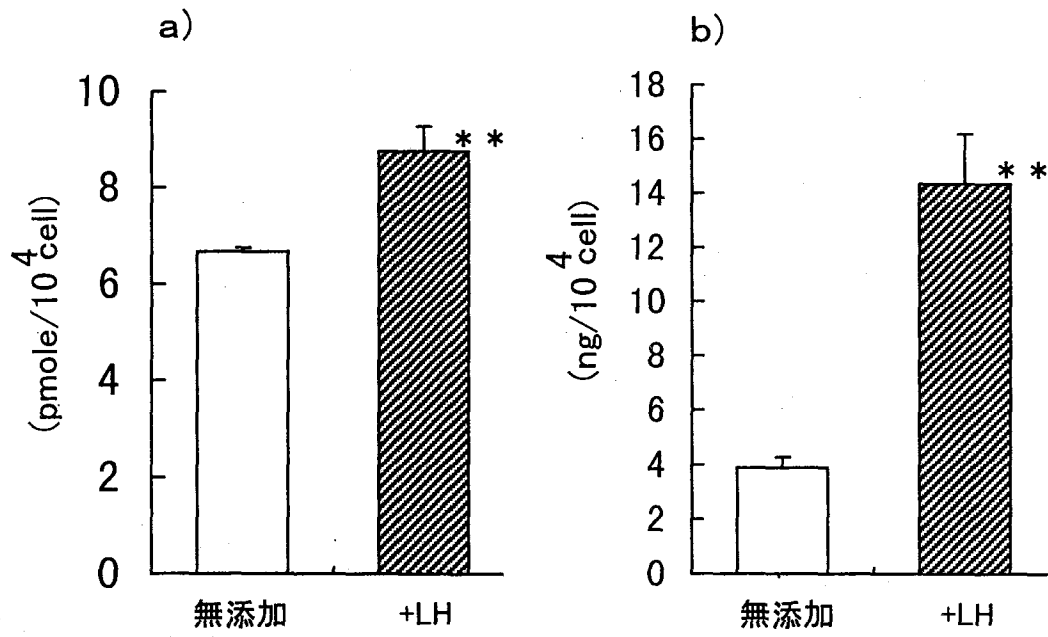


図6. 培養黄体細胞へのLH添加効果.

a)細胞内過酸化脂質量. b)細胞当たりのプロジェステロン合成量.

** : P < 0. 01.

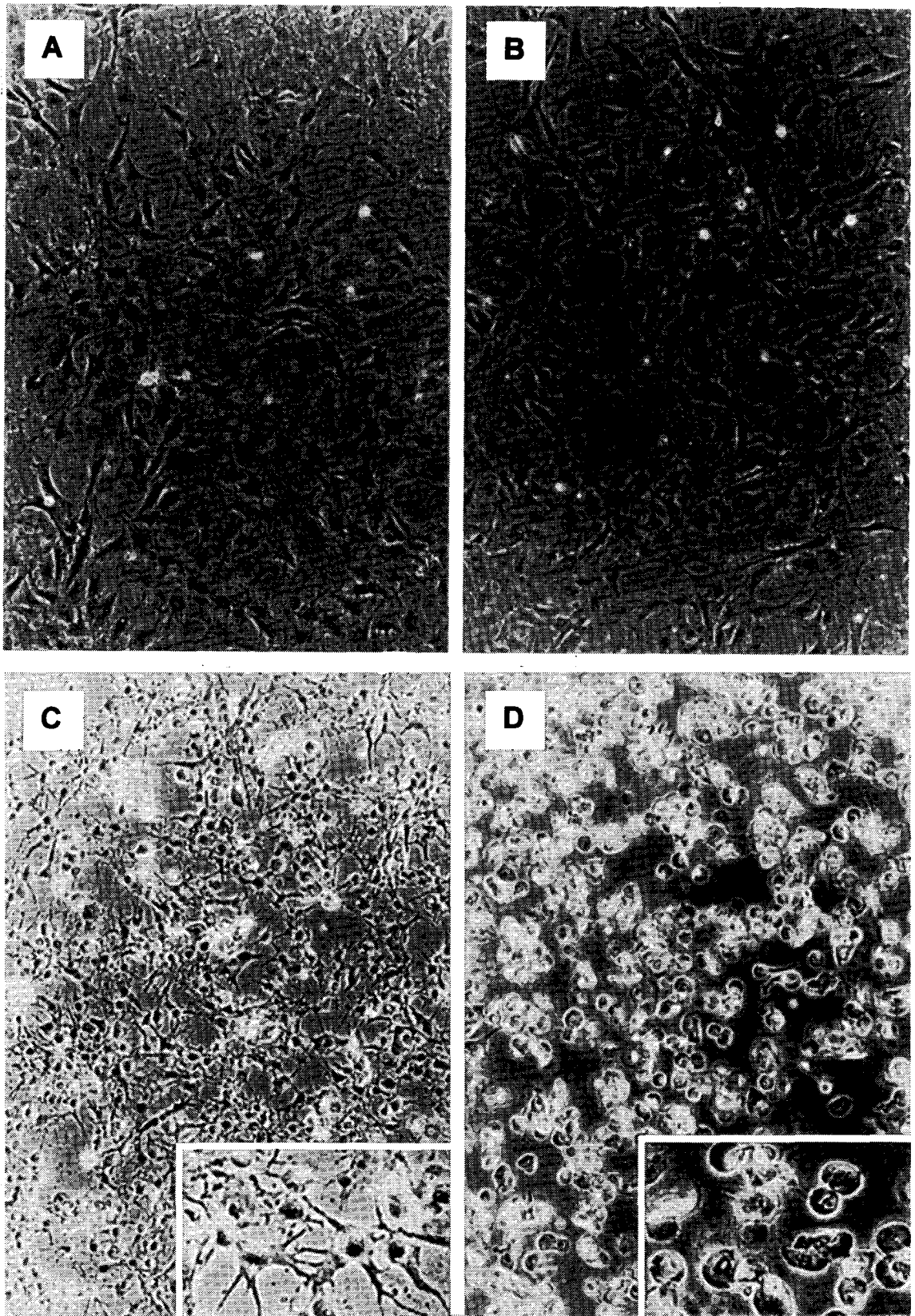


図7. セレン前処理細胞、無処理細胞のアラキドン酸 (Ara) 添加後の変化

A)-Se,-Ara; B)+Se,-Ara; C)-Se,+Ara; D)+Se,+Ara.

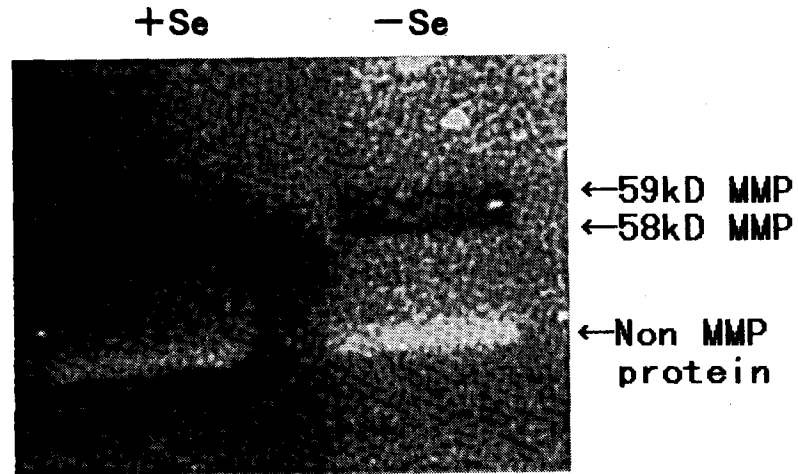


図8. ザイモグラフィーによるセレン添加・無添加細胞のマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)活性の検出
 +Se: セレン添加; -Se: 無添加 (白黒反転像)

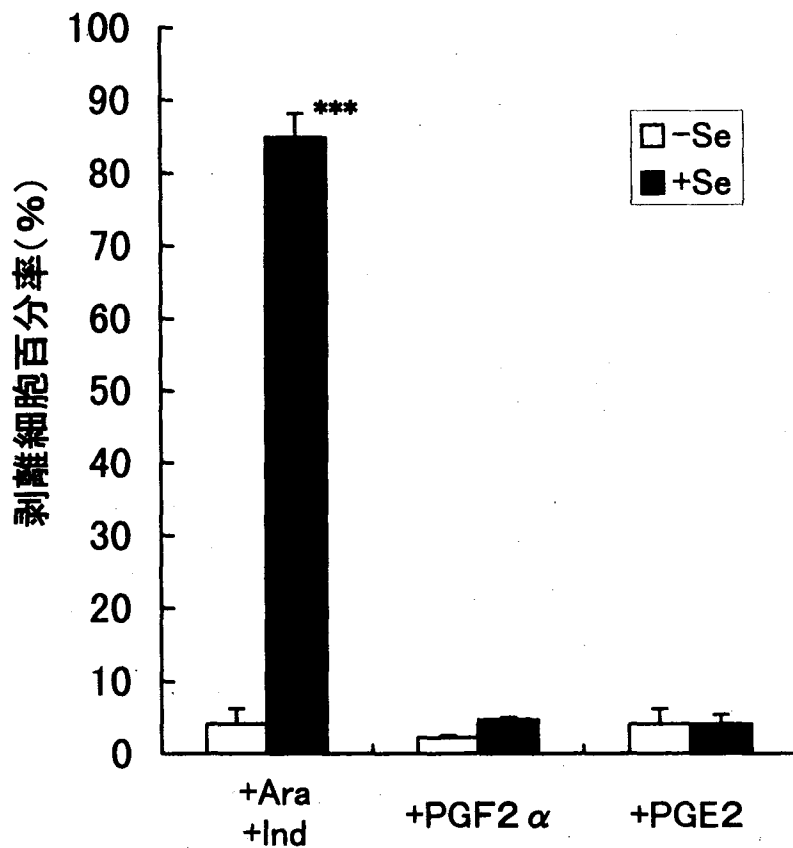


図9. 細胞剥離に対するインドメタシン(Ind)、プロスタグランジン(PGF2 α、PGE2)の添加効果

***: P<0.001(セレン無添加に対して有意差)

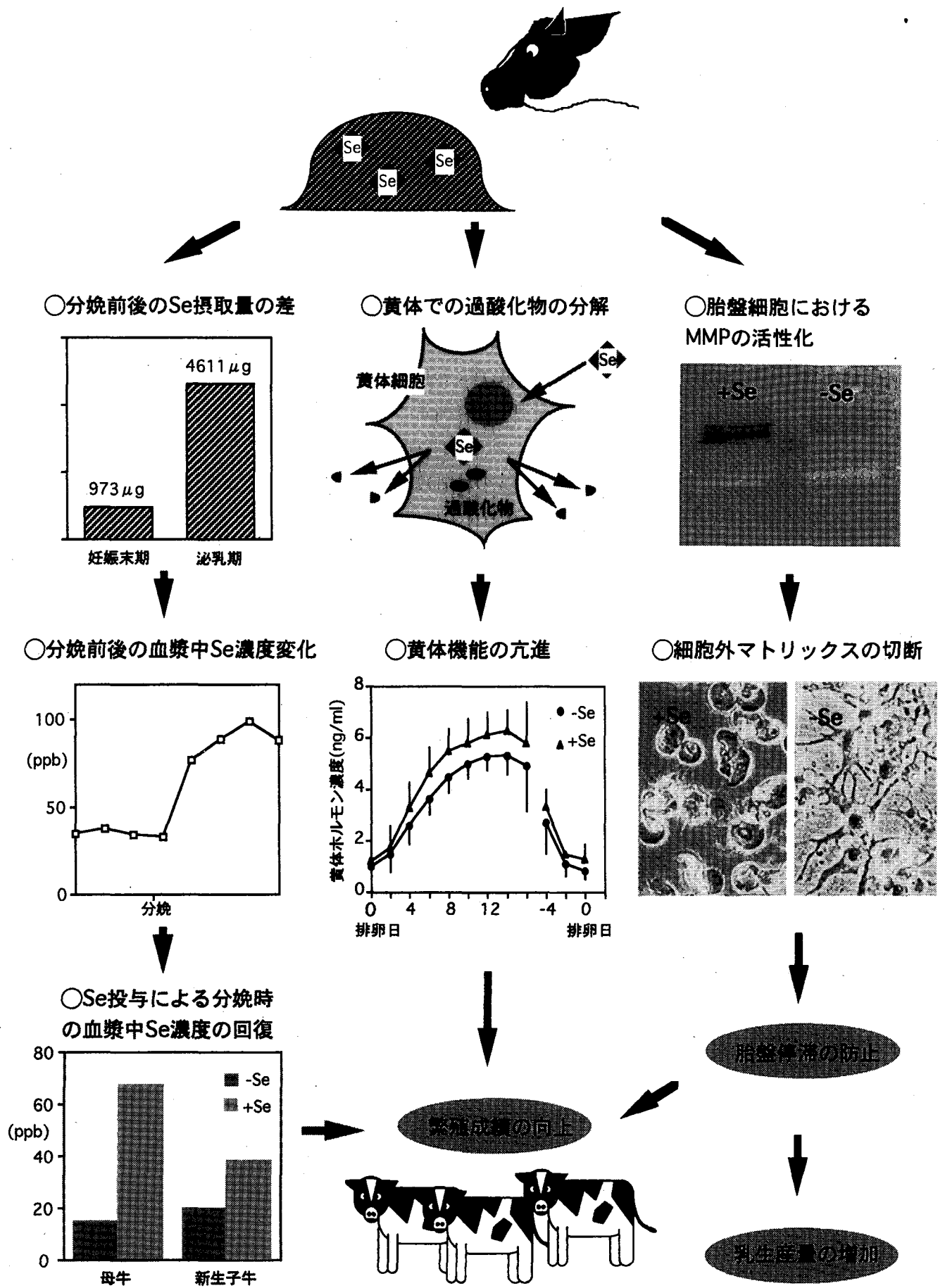


Fig.10 牛におけるセレン栄養と繁殖機能の関連性に関する研究

論文審査結果要旨

ウシを含めて家畜において、セレンは古くから白筋症を防ぐ因子として知られていたが、近年、セレンが繁殖機能の維持に大きな役割を演じていることが報告されている。セレンの生理機能を家畜の飼育に積極的に利用する上で、厳密にセレンの要求量を知ることが重要である。しかし日本国内で飼養されている家畜が充分量のセレンを摂取していない可能性があるにもかかわらず、家畜のセレン摂取量について全くわかっていない。実際に乳牛の終産期における血漿中のセレン濃度を測定してみると妊娠末期はきわめて低い値であり、セレンの後産停滞防止や受胎率の向上効果が期待できない状況にある。そこで、本研究では、繁殖機能の対する効果を期待したセレンの積極的な利用を進めることを目的として、1) 乳牛の終産期のセレン栄養状態について、2) 繁殖機能に対するセレンの役割について、3) 土壌・牧草・家畜間のセレン水準の相互関係について解明する実験を行い、以下に述べる知見を得た。

1. 妊娠末期及び泌乳期の乳牛を用いたセレンの出納試験から、泌乳期の値が妊娠期の値を大きく上回ることが示され（セレン摂取量で4.7倍、蓄積量で2.2倍）、この差が血液中のセレン濃度に反映していると考えられた。また母牛及び仔牛の血中セレン濃度から妊娠期のセレン供給不足が示唆された。

2. 妊娠期間中の給与セレン水準の差は、母牛、子牛の血漿セレン濃度及び初乳中、胎盤中セレン濃度に反映した。無添加区の血漿中セレン水準は極端な欠乏域にあったが、白筋症の兆候は見られず、また胎盤停滞も発生しなかった。更に血漿中甲状腺ホルモン濃度、初乳中IgG濃度にも差はみられなかった。

3. 培養黄体細胞を用いた実験から、セレンは黄体がプロジェストロン産出に伴って発生する過酸化物を解毒することにより、黄体機能を正常に維持していることが推定された。

4. 乳牛へのセレン給与は発情黄体及び妊娠黄体の機能を亢進し、血漿中プロジェストロン濃度を高めることが示された。

5. 培養胎盤細胞を用いた実験から、分娩シグナルが胎盤剥離のためのMMP活性化に至る過程でセレンが機能している可能性が示された。

6. 三種（砂質、熱帯性泥炭、ラテライト）の異なる土壌地域において土壌・牧草・家畜間のセレン水準の相互関係について調査したところ、放牧牛の血漿中セレン濃度が牧草及び土壌中のセレン含量を反映することが示された。

これらの結果は、終産期の飼養管理技術としてセレンの積極的利用を提案できるものと考えられる。妊娠期のセレンの補給を効果的に行うことにより、セレンの機能を利用した生産性の向上が期待できる。更に、セレンの受胎率向上の機構や妊娠維持における効果について解明している。

本論文の成果は、妊娠末期のセレン補給が繁殖成績の向上を介して牛の飼養管理技術及び生産性の向上に貢献できる可能性が高い。よって審査員一同は本論文の著者が博士（農学）の学位を授与されるにふさわしいものと判定した。