

研究論文

離乳時のGnRH-A投与が経直腸超音波検査法でみた種雌豚の卵胞発育に及ぼす影響

笹倉春美¹⁾・日高良一²⁾・日高華奈子³⁾・日高真千子⁴⁾・北原 豪¹⁾・上村俊一^{1)†}

¹⁾ 宮崎大学農学部獣医臨床繁殖学講座, ²⁾ 山口大学大学院連合獣医学研究科, ³⁾ NOSAIみやざき,
⁴⁾ 日高動物診療所

(2008年11月28日 受理)

Effect of GnRH-A Treatment at Weaning on Follicular Growth Monitored by Transrectal Ultrasonography in Sows

Harumi SASAKURA¹⁾, Ryoichi HIDAHA²⁾, Kanako HIDAHA³⁾, Machiko HIDAHA⁴⁾,
Go KITAHARA¹⁾, Shunichi KAMIMURA^{1)†}

¹⁾ Theriogenology Laboratory, University of Miyazaki,
²⁾ United Graduate School of Veterinary Science, Yamaguchi University,
³⁾ NOSAI Miyazaki, ⁴⁾ Hidaka Animal Clinic

Summary : Therapeutic effect of GnRH-A (Buserelin 10 μ g) treatment at weaning on follicular growth was monitored by transrectal ultrasonography in sows. After GnRH-A treatment, plasma concentrations of estradiol-17 β and IGF-1 have increased, and the diameter of ovulatory follicles has enlarged compared to those in the controls. There was neither difference in the interval to the estrus after weaning nor litter size between GnRH-A treatment and controls. GnRH-A treatment stimulates the ovarian function after weaning and enhances conception rates in sows.

Key words : GnRH-A, Ovarian finding, Plasma estradiol concentration, Plasma IGF-1 concentration, Transrectal ultrasonography

緒言

養豚経営において、離乳後の早期の発情回帰とその後の受胎率、妊娠豚の産子数は重要である。しかし、現状では離乳後に卵巣静止などで発情が回帰しない種雌豚があり、それらに対して種々のホルモン処置が行われている (Rensis *et al.* 2002)。従来、離乳後の無発情豚の治療では馬絨毛性性腺刺激ホルモン (eCG) の投与が行われてきたが (岩村 他 1999)、3産以上の種雌豚では無投与対照

豚に比べeCG投与後発情までの間隔に差がみられず、eCGの投与効果は一定しない (Sechin *et al.* 1999)。一方、離乳前の性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH-A) の投与は、離乳後種雌豚の早期卵巣賦活に有用とされる (Mao *et al.* 1999)。通常、獣医臨床で応用される合成GnRH-Aには酢酸フェルチレリンと黄体形成ホルモン (LH) の分泌時間が長い酢酸ブセレリンの2種類があり、視床下部一下垂体の賦活に対する効果は両者で異な

[†]責任著者：上村 俊一
宮崎大学農学部獣医臨床繁殖学講座
〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1

[†]Corresponding author : Shunichi Kamimura
Theriogenology Laboratory
Faculty of Agriculture, University of Miyazaki
1-1 Gakuen Kibana-dai Nishi, Miyazaki-shi, 889-2192, Japan

る (Chenault *et al.* 1990).

GnRH投与は下垂体からの卵胞刺激ホルモン (FSH) と黄体形成ホルモン (LH) の分泌をともに促進し、離乳後の種雌豚の発情回帰と卵胞の発育に影響を及ぼす。一般に授乳中の種雌豚は泌乳刺激によりプロラクチンが分泌され、視床下部からのGnRHの分泌が抑制されるために、成熟卵胞の発育や発情徴候はみられない。一方、種雌豚は牛や馬と異なり、直腸検査法による生殖器の検査が難しく、これまで離乳前後の卵巣や子宮の動態については不明な点が多い (Kauffold *et al.* 2004)。

今回、種雌豚の離乳時に合成GnRH-A (酢酸ブセレリン) を投与し、卵巣動態を経直腸超音波検査法で連日観察するとともに、頸静脈より血液を採取して血中性ホルモン濃度を測定し、その後の繁殖成績を検討した。

材料および方法

供試豚として、宮崎県内の養豚場で、2007年1月～2007年8月に正常分娩した種雌豚18頭を用いた。種雌豚はストール内で飼養され、繁殖用飼料としてTDN 73%、CP 15%の配合飼料を1日2回1.5 kgずつ給餌した。品種はランドレースと大ヨークシャーの第1代雑種であるLWとコツワルド合成豚であり、産次は3～5産 (3.7±0.8産; 平均±標準偏差)、授乳期間は22日～27日 (23.7±1.8日) であった。

1. 前試験

食肉センターで解体後の種雌豚の卵巣を水浸し、超音波検査法により卵胞数と黄体の形状を観察して、その観察精度について、同じ卵巣を肉眼的に直接検査した場合と比較した。宮崎県高崎食肉センターより種雌豚の生殖器 (n=20) を入手し、水浸して卵巣を7.5 MHzのマикроコンベックス型探触子を装着した超音波診断装置 (EUB405, 日立メディコ, 東京) で観察した。その後、卵巣全体を10%ホルマリン液で1週間固定し、厚さ2 mmで連続的に薄切し、各断面における卵胞と黄体の最大直径と数を調査した。

2. ホルモン投与試験

供試豚は、離乳日 (Day 0) の処置により酢酸ブセレリン10 µg (イトレリン, あすか製薬, 東京) を頸部筋肉内に投与したGnRH群 (n=9, 3.7±0.7産) と無処置群 (n=9, 3.9±0.9産) に無作為に分けた。種雌豚をストール内で無保定とし、Day -1より排卵終了日まで連日およびDay 16の黄体確認日に、直腸検査により子宮と卵巣を触診した。その後、卵胞数を調査するために経直腸超音波検査を行い、卵巣の複数の断面を観察した。Knox (2005) の方法に基づき、卵胞は最大直径により4段階 (クラスI: 2～5 mm, クラスII: 5～7 mm, クラスIII: 7～10 mm, クラスIV: 10 mm以上)、黄体は最大直径により2段階 (クラスI: 10 mm未満, クラスII: 10 mm以上) に分類した。

また、種雌豚をストール内で鼻保定し、Day -1, 0, 2, 4, 6, 排卵終了日およびDay 16に頸静脈よりヘパリン加血として採血し、4℃, 3000 rpm, 15分間で血漿を分離した後、測定まで-30℃で保存した。その後、自動免疫蛍光測定装置 (Mini-VIDAS, 日本ビオメリュー, 東京) にて、血中エストラジオール-17β (E₂) 濃度と血中プロジェステロン (P₄) 濃度を測定した。また、血中インスリン様成長因子-1 (IGF-1) 濃度を、ELISAキット (DSL IGF-1 ELISA「セティ」, DSL, USA) にて測定した。本試験での測定範囲と感度は、E₂濃度で9～3,000 pg/mL, 9 pg/mL, P₄濃度で0.25～80 ng/mL, 0.25 ng/mL, IGF-1濃度で7.5～580 ng/mL, 7.5 ng/mLであった。

発情発見は1日2回朝方と夕方に、外陰部の腫脹と不動反応により行い、許容期に24時間間隔で2～3回人工授精を行った。人工授精に用いた液状精液は、8頭のデュロック種雄豚から2回/週、用手法により採取したものを用いた。精液は採取時に検査し、それらの精液性状は試験期間中の平均で精子数30億/80 ml, 活力70%+++であった。また、授精後25日目に5.0 MHzのコンベックス型探触子を装着した携帯型超音波診断装置 (アグロスキャン, すみれ医療, 東京) を用い、左右側腹部から下腹部の経腹部走査により子宮角内にエコーレベルの低い妊娠腔とエコージェニックな胚を確認することにより妊娠診断を行った。

統計的な解析として、各クラスの卵胞数と黄体数、最大卵胞直径、血中E₂濃度、P₄濃度、IGF-1

濃度, 離乳後発情までの日数, 産子数はStudent's-*t*検定を, 受胎率は χ^2 検定を用いて, GnRH群と無処置群の2群間で比較を行った.

結果

水浸法による超音波検査法と直接観察した卵巣の薄切断面での卵胞数を比較したところ, クラス I 卵胞数は超音波検査法が3.2個少なかったが, クラス II 以上ではその差はほとんどなく, 黄体数についても有意な差はみられなかった. ($P > 0.05$, Table 1)

卵巣所見はDay-1では全ての種雌豚が小卵胞主体で, GnRH群でクラス I 卵胞数が 22.7 ± 1.7 個, クラス II 卵胞数が 0.6 ± 1.7 個, 無処置群で同様に 23.0 ± 6.8 個, 1.5 ± 3.4 個であった. 両群ともクラス III やクラス IV の卵胞はみられなかった. 一方, 子宮内腔に粘液貯留などの異常所見はみられなかった. Day 0では, GnRH群クラス I 卵胞数 21.1 ± 2.5 個, クラス II 卵胞数 3.0 ± 3.5 個, 同様に無処置群では 20.9 ± 2.1 個, 4.2 ± 1.7 個であり, Day-1とほとんど差がなかった ($P > 0.05$).

Day 0の処置以降, 両群でクラス I の卵胞数が減少し, クラス II と III の卵胞数が増加した. GnRH群では全頭 ($n=9$) が離乳後 5.2 ± 1.1 日で発情が回帰し, 発情前から発情開始のDay 4 以降にかけての卵胞はクラス II と III がほとんどであり, その他にDay 4 でクラス IV の卵胞数が 1.9 ± 2.7 個, Day 5 で 1.7 ± 2.0 個みられた. 無処置群では全頭

($n=9$) に離乳後 4.7 ± 0.9 日で発情が回帰し, 発情前から発情開始のDay 4 以降では卵胞はクラス II と III がほとんどであり, クラス IV はみられなかった. 両群で発情開始の翌日から排卵がみられ, クラス II, III, IV の卵胞数は徐々に減少した. 排卵終了日はGnRH群で離乳後 7.3 ± 1.7 日, 無処置群で 6.4 ± 0.7 日だった. 排卵直前の最大卵胞直径の平均はGnRH群 10.7 ± 2.3 mm (Day 6), 無処置群 7.9 ± 0.7 mm (Day 5) で, 両群間に有意差が認められた ($P < 0.05$, Table 2).

Day 16においては, 卵胞数はGnRH群でクラス I : 19.0 ± 7.8 個, クラス II : 1.1 ± 2.7 個, クラス IV : 0.6 ± 0.9 個であった. 黄体数はクラス I : 9.0 ± 5.2 個, クラス II : 12.9 ± 6.2 個であった. また, 黄体と共存した寡胞性卵胞嚢腫 (直径15 mm以上の大型卵胞が1~3個存在) が2頭でみられた. 無処置群では卵胞数がクラス I : 17.7 ± 7.7 個, クラス II : 0.9 ± 2.0 個, クラス IV : 0.4 ± 0.5 個であった. 黄体数はクラス I : 6.5 ± 4.3 個, クラス II : 14.4 ± 4.9 個であった. 黄体と共存した寡胞性卵胞嚢腫が1頭でみられた. 両群において各クラスの卵胞数や黄体数に差はみられなかった ($P > 0.05$).

血中 E_2 濃度はDay-1, 0 で両群間に差はなく, 発情前から発情期に相当するDay 4では, GnRH群で 48.3 ± 5.7 pg/mL, 無処置群で 38.5 ± 12.7 pg/mL, 同様にDay 16では, 35.3 ± 7.2 pg/mL, 24.8 ± 5.9 pg/mLであった ($P > 0.05$, Fig. 1). Day 16における血中 P_4 濃度はGnRH群で 108.3 ± 38.8 ng

Table 1 Mean number of follicles and corpora lutea classified by the largest diameter (average \pm s.d.)

	Follicle numbers				Corpora lutea numbers	
	I : 2-5 mm	II : 5-7 mm	III : 7-10 mm	IV : ≥ 10 mm	I : < 10 mm	II : ≥ 10 mm
Ultrasonography ¹⁾	19.1 ± 8.1	4.2 ± 3.8	0.8 ± 3.5	0.4 ± 1.4	11.9 ± 6.8	4.5 ± 3.1
Direct observation ²⁾	22.3 ± 11.9	4.8 ± 2.3	0.8 ± 3.1	0.4 ± 1.8	12.0 ± 5.8	4.2 ± 3.8

There was no significant difference in numbers of follicles and corpora lutea among the individual classes.

¹⁾ Ovaries soaked in the water was scanned by ultrasonography.

²⁾ Formalin embedded ovaries were sliced into 2 mm serial sections, and the number of follicles and corpora lutea on each cross section was counted.

Table 2 Diameter of the largest follicle after weaning (mm, average \pm s.d.)

	Day 0	Day 3	Day of estrus	Ovulatory follicle
GnRH group	4.9 ± 1.5	7.6 ± 2.0	9.5 ± 1.8	$10.7 \pm 2.3^*$
Control	4.6 ± 0.7	7.6 ± 1.2	7.9 ± 0.7	7.9 ± 0.7

* Significantly differs from control ($P < 0.05$).
Day 0 = weaning

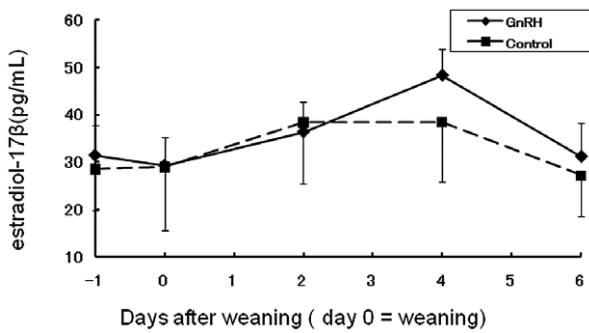


Fig. 1 Mean plasma concentration of estradiol-17 β before and after weaning in sows

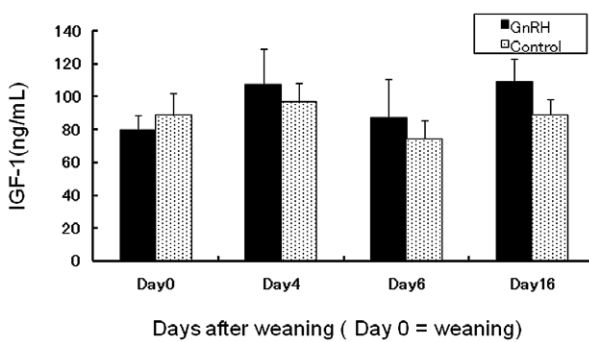


Fig. 2 Mean plasma concentration of IGF-1 after weaning in sows

/mL, 無処置群で 93.4 ± 22.5 ng/mLであった ($P > 0.05$).

血中IGF-1濃度は、GnRH群ではDay 0で 79.4 ± 9.3 ng/mL, Day 4で 107.0 ± 22.1 ng/mL, Day 16で 108.8 ± 14.3 ng/mLであった。無処置群では同様に 88.6 ± 13.4 ng/mL, 96.6 ± 11.5 ng/mL, 89.1 ± 9.4 ng/mLであった ($P > 0.05$, Fig. 2)。

受胎率はGnRH群で100%, 無処置群で77.8%であった ($P > 0.05$)。その後の生産子数についてはGnRH群 10.8 ± 3.2 頭, 無処置群 11.0 ± 3.0 頭と違いはみられなかった ($P > 0.05$)。無処置群で不受胎であった2頭に対して、発情時に再度人工授精を行ったところ、いずれも受胎した。寡胎性卵胞嚢腫の3頭では、正常豚に比べて産子数に違いはみられなかった。

考 察

超音波検査法による卵胞サイズと卵胞数の観察精度は、牛の卵巣では、誤差はほとんどないと報告されている (Kamimura *et al.* 1993)。今回は種雌豚について超音波検査法と卵巣の薄切断面を

直接観察し、各断面における卵胞直径および卵胞数や黄体数を比較したところ、両法において有意な差はほとんどなく、超音波検査法の精度の高さが証明された。

健康状態や産次 (Bracken *et al.* 2003) および季節 (Belstra *et al.* 2004) は繁殖成績に影響することから、今回の試験では種雌豚の産次や季節に偏りがないように2群に分けた。その結果、離乳時のホルモン投与の有無に関わらず、全ての種雌豚で離乳後1週間以内に発情が回帰した (4.9 ± 0.9 日)。

離乳後96時間の腔内GnRH誘導薬 (Gonavet, Berlin-Chamie, Germany) の投与により発情回帰が早くなるとする成績 (Baer *et al.* 2004) がある。今回、離乳後発情回帰までの日数はGnRH群で 5.2 ± 1.1 日、無処置群で 4.7 ± 0.9 日と、GnRH群が0.5日遅れ、排卵日はGnRH群で 7.3 ± 1.7 日、無処置群で 6.4 ± 0.7 日と離乳後発情回帰までの日数と同様にGnRH群で0.9日遅れた。

血中 E_2 濃度は発情前から発情期に相当するDay 4にGnRH群 48.3 ± 2.2 pg/mL, 無処置群 38.5 ± 5.2 pg/mLとGnRH群で高い値を示した。これはGnRH投与により、下垂体からLHの分泌が促進され、卵胞が発育し、それによって卵胞からの E_2 分泌が増加したためと思われる (Bracken *et al.* 2003)。また、Bracken ら (Bracken *et al.* 2003) は、離乳前のGnRHの頻回投与で、卵胞直径が増加したと報告している。今回、頻回投与の代わりに持続性のある酢酸ブセレリンを投与することで、下垂体に負のフィードバックが生じ、視床下部の感受性が低下したと推測される。それによって卵胞からのエストロジェンの正のフィードバックに対して下垂体前葉からのLHサージが遅れ、排卵が遅延することにより、持続して発育した卵胞の直径が無処置群よりも増加したものと推察される (GnRH群 10.7 ± 2.3 mm, 無処置群 7.9 ± 0.7 mm)。このことはGnRH群で発情回帰や排卵が遅れた要因の一つと考えられる (Armstrong *et al.* 1987)。

Day 16では、GnRH群では10 mm未満の小型黄体数が無処置群より多かったが、合計の黄体数はGnRH群 21.9 ± 3.7 個, 無処置群 21.0 ± 2.6 個となり、両群で差はみられなかった。また、血中 E_2 濃度、血中 P_4 濃度について有意差が認めなかつ

たが、平均値ではGnRH群が高い傾向にあり、その後の受胎率に関係すると考えられる。

IGF-1濃度は、GnRHの投与後に増加しており、これはGnRHの投与により、下垂体が刺激され成長ホルモンが分泌されることにより、肝臓からのIGF-1の分泌が促進されたためと考えられる。また、GnRH群で卵胞の直径が増加し、それがIGF-1とゴナドトロピンの相互作用に影響したと考えられる(Liu *et al.* 2000)。IGF-1は黄体からのプロゲステロンの分泌や黄体細胞のアポトーシス抑制に対して正の相関があり(Langendijk *et al.* 2008)、GnRH群ではDay 16における黄体機能が強く、その後の受胎率(100%)に影響したと考えられる。

産子数については両群間で差はみられなかった。寡胞性卵胞嚢腫において、嚢腫卵胞の存在は、産子数よりも受胎率に影響するとして報告があるが(Castagnara 2004)、今回の試験では寡胞性卵胞嚢腫豚(n=3)の受胎率は100%であり、産子数(10.3±1.5)や受胎率に影響はみられなかった。

今回、離乳時の種雌豚に酢酸ブセレリン10 μ gを投与することにより、排卵時の卵胞直径や発情時の血中E₂濃度、投与後のIGF-1濃度が上昇したが、離乳後発情回帰までの間隔や産子数に違いはみられなかった。しかし、酢酸ブセレリンの投与で種雌豚の卵巣機能が賦活され、受胎率が向上する可能性が示唆された。

要約

離乳後の種雌豚の卵巣所見を経直腸超音波検査法により観察するとともに、離乳時に酢酸ブセレリン10 μ g(GnRH-A)を投与し、その後の卵胞発育に対する影響を検討した。その結果、GnRH-Aの投与群では、発情時の血中E₂濃度や投与後のIGF-1濃度が無処置群に比べ増加し、排卵卵胞の直径が増加した。一方、離乳後発情回帰までの間隔や産子数には無処置群との間に違いはみられなかった。今回、GnRH-Aの投与で離乳後の種雌豚の卵巣機能が賦活され、高い受胎率が得られた。

キーワード：経直腸超音波検査法、血中E₂濃度、血中IGF-1濃度、卵巣所見、GnRH-A

謝辞

今回の試験にあたり、GnRH-A(イトレリン)を提供いただいたあすか製薬株式会社、種雌豚の飼養管理と繁殖管理を担当していただいた農業組合法人日高養豚場の各位に深謝する。

文献

- Armstrong, J. D., N. M. Cox, J. H. Britt (1987) Change in the hypothalamic hypophyseal-ovarian axis of primiparous sows following weaning or pulsatile gonadotropin releasing hormone administration and weaning. *Theriogenology* **27**, 561-570.
- Baer, C., G. Bilkei (2004) The effect of intra vaginal applied GnRH-agonist on the time of ovulation and subsequent reproductive performance of weaned multiparous sows. *Reprod. Dom. Anim.* **39**, 293-297.
- Belstra, B. A., W. L. Flowers, M. T. See (2004) Factors affecting temporal relationships between estrus and ovulation in commercial sow farms. *Anim. Reprod. Sci.* **84**, 377-394.
- Bracken, C. J., W. R. Lamberson (2003) Factors affecting follicular populations on Day 3 post weaning and interval to ovulation in a commercial sow herd. *Theriogenology* **60**, 11-20.
- Castagna, C. D., C. H. Peixoto, F. P. Bortolozzo, I. Wentz, G. B. Neto, F. Ruschel (2004) Ovarian cyst and their consequences on the reproductive performance of swine herds. *Anim. Reprod. Sci.* **81**, 115-123.
- Chenault, J. R., D. D. Kratzer, R. A. Rzepkowski, M. C. Goodwin (1990) LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadoreline and buserelin. *Theriogenology* **34**, 81-98.
- 岩村祥吉, 吉岡耕次, 鈴木千恵, 加茂前秀雄: 豚の繁殖周期の制御における課題. (1999) *J. Reprod. Dev.* **47**, j19-j26.
- Kamimura, S., T. Ohgi, M. Takahashi, T. Tsukamoto (1993) Postpartum resumption of ovarian activity and uterine involution monitored by ultrasonography in Holstein cows. *J. Vet. Med. Sci.* **55**, 643-647.
- Kauffold, J., T. Reutenberg, S. Gutjahr, A. Richter, A. Sobiraj (2004) Ultrasonographic characterization of the ovaries in non-pregnant first served sows and gilts. *Theriogenology* **61**, 1407-1417.
- Knox, R. V. (2005) Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Dom. Anim. Endocri.* **29**, 385-397.

- Langendijk, P., H. Brand, R. Gerriten, H. Quesnel, N. M. Soede, B. Kemp (2008) Porcine Luteal function in relation to IGF-1 levels following ovulation during lactation or after weaning. *Reprod. Dom. Anim.* **43**, 131-136.
- Liu, J., T. K. Keonigsfeld, C. T. Cantley, C. K. Boyd, Y. Kobayashi, C. Lucy (2000) Growth and the initiation of steroidogenesis in porcine follicle are associated with unique patterns of gene expression for individual components of the ovarian Insulin-Like-Growth Factor system. *Biol. Reprod.* **63**, 942-952.
- Mao, L., J. Zak, R. Cosgrove, S. Shostak, G. R. Foxcroft (1999) Reproductive, metabolic and endocrine responses to feed restriction and GnRH treatment in primiparous lactating sows. *J. Anim. Sci.* **77**, 725-735.
- Rensis, F. De., S. Benedetti, S. Paola, R. N. Kirkwood (2002) Fertility of following artificial insemination at a gonadotrophin-induced estrus coincident with weaning. *Anim. Reprod. Sci.* **76**, 245-250.
- Sechin, A., J. C. T. Deschamps, J. A. Lucida, G. Alexio, V. Bordinon (1999) Effect of equine chorionic gonadotrophin in weaning-to-first service interval and litter size of female swine. *Theriogenology* **51**, 1175-1182.