

分娩後早期のプロジェステロン徐放剤PRIDの腔内挿入が黒毛和種牛の子宮修復と受胎率に及ぼす影響

著者	北原 豪, 遠見 広一郎, 鈴木 義人, 日高 亨介, 中間 由規, 笹倉 春美, 峯 雄太, 篠原 萌, 白尾 優佳, 小林 郁雄, 上村 俊一
雑誌名	宮崎大学農学部研究報告
巻	56
ページ	169-173
発行年	2010-02-28
URL	http://hdl.handle.net/10458/2670

研究論文

分娩後早期のプロゲステロン徐放剤PRIDの膣内挿入が黒毛和種牛の子宮修復と受胎率に及ぼす影響

北原 豪・邊見広一郎¹⁾・鈴木義人²⁾・日高亨介・中間由規・笹倉春美³⁾・
峯 雄太・篠原 萌・白尾優佳・小林郁雄¹⁾・上村俊一†

宮崎大学農学部獣医臨床繁殖学講座,

¹⁾宮崎大学農学部附属住吉フィールド, ²⁾福島県農業共済組合連合会, ³⁾兵庫県農業共済組合連合会

(2009年11月26日 受理)

Effect of Intravaginal PRID Insert on Uterine Involution and Conception Rate in Early Postpartum Japanese Black Cows

Go KITAHARA, Kouichiro HENMI¹⁾, Yoshihito SUZUKI²⁾, Kyosuke HIDAKA,
Yoshiki NAKAMA, Harumi SASAKURA³⁾, Yuta MINE, Moe SHINOHARA,
Yuka SHIRAO, Ikuo KOBAYASHI¹⁾, Shunichi KAMIMURA †

Laboratory of Theriogenology, University of Miyazaki,

¹⁾Sumiyoshi Field, University of Miyazaki,

²⁾Fukushima Prefectural Federation of Agricultural Mutual Aid Association,

³⁾Hyogo Prefectural Federation of Agricultural Mutual Aid Association

Summary : Effect of progesterone-releasing intra vaginal device (PRID) with estrogen (E₂) capsule on postpartum uterine involution and conception rate with timed artificial insemination (TAI) were investigated in Japanese Black Cows. On the day when GnRH-B (GnRH-Buserelin) or PGF_{2α} (Prostaglandin F_{2α}) analog was administered on Day 0 (30 days after parturition), the ratio of cows possessing functional corpus luteum (CL) and plasma progesterone concentrations on Day 7 were significantly increased (P < 0.01) as compared on Day 0. From Day 7 to Day 16, PRID was inserted into the vagina of cows. At the time of the PRID removal, PGF_{2α} analog was administered, and E₂ at 24 h or GnRH-F (GnRH-Fertirelin) at 48 h after PRID removal was treated, and TAI was performed at 56 h after PRID removal. The conception rate by TAI was increased in the cows that possessing functional CL compared in the cows without CL on Day 7. Also, the uterus significantly involuted with their diameter from 40.5 ± 6.2 mm on Day 0 to 33.4 ± 3.2 mm on Day 28 (P < 0.01), and the viable bacterial count in the external uterine orifice (CFU) showed a tendency to decrease from 2.6 ± 3.5 CFU on Day 0 to 1.0 ± 1.2 CFU on Day 28 (P = 0.63). In conclusion, the activation of folliculogenesis with PRID insertion in early postpartum have promoted the uterine involution, and contributed the increase of the conception rate by TAI.

Key words : Conception rate, Early postpartum, PRID, Uterine involution, Viable bacterial count

† 責任著者名 : 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

Tel/FAX ; 0985-58-7787, e-mail ; kamimuras@cc.miyazaki-u.ac.jp

† Corresponding author : Shunichi KAMIMURA

Laboratory of Theriogenology,

Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

1-1 Gakuen Kibana-dai Nishi, Miyazaki 889-2192, Japan

Tel/FAX ; 0985-58-7787, e-mail ; kamimuras@cc.miyazaki-u.ac.jp

緒 言

黒毛和種牛の繁殖管理において、分娩後発情回帰の延長は経済的損失をもたらす (Yavas & Walton, 2000). 発情回帰が延長する要因として、分娩後の子宮修復の遅延や分娩後の初回排卵時の発情見逃しがある (Crowe, 2008). その対策として、分娩後早期より、合成プロゲステロン製剤の経口投与 (Schafer *et al.*, 2007) や、腔内挿入型プロゲステロン徐放剤である Controlled Internal Drug Release Dispenser (以下CIDR, Sakase *et al.*, 2005), あるいは Progesterone Releasing Intravaginal Device (以下PRID, Peters, 1982) を用いた発情同期化と定時人工授精 (定時 Artificial Insemination, 以下定時AI) が、受胎率向上や分娩間隔の短縮の目的で行われている。

今回、分娩後早期の黒毛和種牛に卵巣賦活処置として、PRIDによる発情同期化と定時AIを行い、発情回帰や受胎率に及ぼす影響について検討した。これまで分娩後の性ホルモン処置が子宮修復に及ぼす影響を調査した報告は少ない。そこで、本研究では携帯型超音波診断装置を用い、左右子宮角の大きさを経時的に観察するとともに、外子宮口の拭い検査を行い、細菌数の変動を併せて調査した。

材料および方法

試験 1

宮崎大学農学部附属住吉フィールドで、2007年5月から2008年11月に正常分娩した2産以上の黒毛和種牛で、授乳中の48頭 (7.3 ± 2.9産; 平均 ± 標準偏差, BCS; 2.9 ± 0.2, 5段階評価法) を供した。初診時 (Day 0; 分娩後29.5 ± 2.3日) に、7.5 MHzの探触子 (L52®, ソノサイトジャパン, 東京) を装着した携帯型超音波診断装置 (SonoSite 180 PLUS, ソノサイトジャパン, 東京) で卵巣を観察し、黄体がある牛にはプロスタグランジンF₂ (prostaglandin F₂, 以下PGF₂; クロプロステノール500 μg: レジプロン, あすか製薬, 東京) を、ないものには酢酸ブセレリン10 μg (gonadotropin releasing hormone, 以下GnRH-B; イトレリン, あすか製薬, 東京) を投与した。Day 7に安息香酸エストラジオール (estradiol-17β, 以下E₂) 10 mgを含むカプセルを装着したプロゲステロン (progesterone, 以下P₄) 徐放剤PRID (プリッド

テイゾー, あすか製薬, 東京) を腔内に挿入し、9日後のDay 16に除去し、同時にPGF₂ を筋肉内投与した。PRID除去後24時間にE₂を1 mg (オバホルモン, あすか製薬, 東京), または48時間に酢酸フェルチレリン100 μg (GnRH-F; コンサルタン, あすか製薬, 東京) を筋肉内投与し、PRID除去後56時間に定時AIを行った。その後、Day 28 (定時AI後10日) に黄体確認、Day 49 (同31日) に超音波診断装置による早期妊娠診断を行った。各処置時に経直腸超音波診断法により卵巣を観察し、同時に血中性ホルモン濃度を測定するため尾静脈より採血を行い、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 (MiniVIDAS, シスメックス・ピオメリュ, 東京) で血中P₄濃度を測定した。本法の測定範囲は0.25 ~ 80 ng/ml, 測定感度は0.25 ng/ml, 測定内変動係数は10%以下, 測定間内変動数は15%以下であった。

試験 2

2008年11月から2009年5月までに正常分娩した2産以上の黒毛和種牛で授乳中の15頭 (6.9 ± 3.1産, BCS; 3.0 ± 0.2) を供試した。分娩後30.0 ± 3.4日 (Day 0) に試験1と同様に携帯型超音波診断装置で卵巣を観察した。その結果、15頭全ての卵巣に黄体はみられなかった。そこで、Day 0にGnRH-B 10 μgを筋肉内投与し、Day 7からDay 16にPRIDを腔内に挿入し、除去時にPGF₂ を投与した。PRID除去後24時間にE₂を1 mg, あるいは48時間にGnRH-Fを100 μg筋肉内投与し、PRID除去後56時間に定時AIを行った。その後、Day 28 (AI後10日) に超音波診断装置による黄体確認、Day 49 (AI後31日) に早期妊娠診断を行った。Day 0, 7, 28に携帯型超音波診断装置を用い、左右子宮角の角間膜の付着部位でそれぞれの子宮角の最大直径を計測した。同時に、外陰部を70% アルコール溶液で消毒後、アルコール溶液で消毒した腔鏡を腔内に挿入した。そして、長さ20 cmの滅菌綿棒 (Swab S-4, 東洋器材科学, 埼玉) で外子宮口を拭い、その後先端を折った綿棒部を滅菌生理食塩水1 mlが入ったスピッツ管に浸した。十分攪拌後、溶液をシート状培地 (Sanita-kun 一般生菌用, チッソ, 東京) に滴下し、35 の恒温装置内で48時間培養後、一般生菌のコロニー数

(colony forming unit, 以下CFU) を測定した。

統計解析

試験 1 では, Day 0 と Day 7 で, 卵巣に黄体がある牛の割合について χ^2 検定を, また血中 P_4 濃度は Student- t 検定を用い解析した. 受胎率は Day 7 の PRID 挿入時の卵巣における黄体の有無で比較し, その違いを χ^2 検定を用い解析した. 試験 2 では, 左右子宮角の最大直径と CFU について, Day 0, 7, 28 の観察日では Friedman 検定を, また PRID 除去後の E_2 投与と GnRH-F 投与の違いを Student- t 検定を用いて, それぞれ解析した.

結果

Day 0 では, 卵巣に黄体をもつ牛が 18.8% (9/48 頭) で血中 P_4 濃度が 1.9 ± 3.2 ng/ml であるのに対し, Day 7 では黄体をもつ牛が 74.5% (36/48 頭) で血中 P_4 濃度は 4.5 ± 3.9 ng/ml となり, 黄体の存在率および血中 P_4 濃度が Day 7 について, Day 0 と Day 7 に有意な差がみられた ($P < 0.01$, Fig. 1.). Day 7 で黄体がある牛は定時 AI 後の受胎率が 52.8% (19/36 頭) と, 黄体がない牛の 41.7% (5/12 頭) と比べ高い傾向となった ($P = 0.74$, Fig. 2.). 一方, 前回の妊娠角と非妊娠角による左右子宮角の最大直径の違いは, Day 0 で 1.7 ± 1.9 mm, Day 7 で $0.9 \pm$

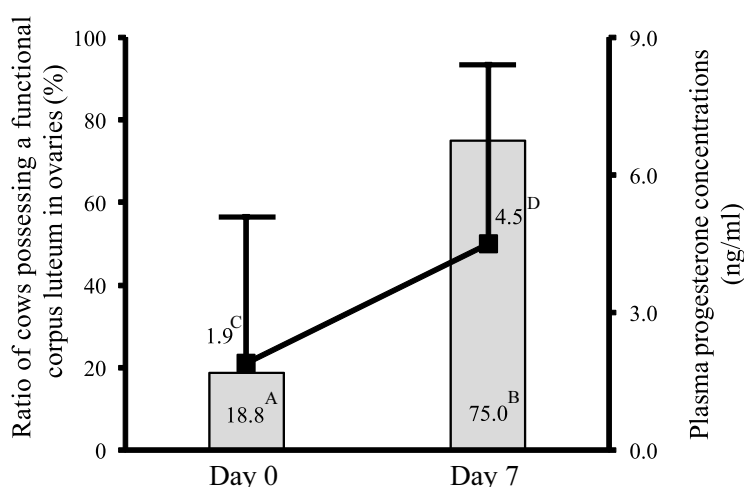


Fig. 1. Percent of ovaries possessing a functional corpus luteum and plasma progesterone concentrations on Day 0 and 7.

The ratio of cows possessing a functional corpus luteum and plasma progesterone concentrations significantly differ between Day 0 and Day 7 (A-B, C-D : $P < 0.01$).

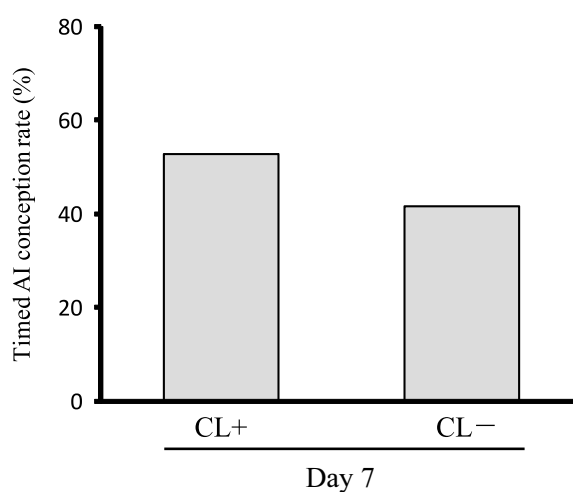


Fig. 2. Conception rate after timed AI in cows with corpus luteum (CL+) or without (CL-) on Day 7.

There was no significant difference between CL + and CL- ($P > 0.05$).

Table 1. Uterine diameter determined by transrectal ultrasonography and the viable bacterial count (CFU) in external uterine orifice on Day 0, 7 and 28 (average \pm s.d.)

Organ	Item	Days Observed (n=15)			Hormonal Treatment on Day 28	
		Day 0	Day 7	Day 28	E ₂ (n=6)	GnRH-F (n=9)
Unilateral or bilateral diameter of uterine horn	Difference of individual horn (mm)	1.7 \pm 1.9	0.9 \pm 0.8	0.7 \pm 0.6	0.7 \pm 0.8	0.7 \pm 0.4
	Sum of either side horn (mm)	40.5 \pm 6.2 ^a	36.5 \pm 3.4	33.4 \pm 3.2 ^b	34.2 \pm 3.0	32.7 \pm 3.4
Swab in external uterine orifice	CFU	2.6 \pm 3.5	1.5 \pm 2.2	1.0 \pm 1.2	1.0 \pm 1.2	1.0 \pm 1.3

There was significant difference in the sum of either side uterine horn and CFU among observation days (a-b; $P < 0.01$). There was no significant difference in the sum of either side uterine horn and CFU between hormonal treatment.

0.8 mm, Day 28で0.7 \pm 0.6 mmとDay 0からDay 28にかけ減少する傾向がみられた ($P=0.29$, Table 1.). 左右子宮角の最大直径を合わせた長さは, Day 0で40.5 \pm 6.2 mm, Day 7で36.5 \pm 3.4 mm, Day 28で33.4 \pm 3.2 mmと短くなり, Day 0とDay 28の間で有意差がみられた ($P < 0.01$, Table 1.). 外子宮口のCFUは, Day 0で2.6 \pm 3.5 CFU, Day 7で1.5 \pm 2.2 CFU, Day 28で1.0 \pm 1.2 CFUとなり, Day 0からDay 28にかけて減少する傾向がみられた ($P=0.63$, Table 1.). Day 17のE₂投与とDay 18のGnRH-F投与の牛群間において, Day 28の左右子宮角の長さ, 最大直径の違い, 最大直径を合わせた長さ, 並びにCFUについていずれも違いはみられなかった (Table 1.).

考 察

通常, 泌乳牛では分娩後14日から21日にかけて発情回帰がみられるが, 授乳している肉牛では分娩後60日を経過しても発情回帰がみられない場合が多い. この原因として, 肉用牛では分娩後すぐに卵巣に卵胞波の出現と子宮修復は起こるものの, 下垂体前葉の黄体形成ホルモン (luteinizing hormone, 以下LH) の充足に分娩後15日から30日かかる. また, 視床下部のGnRHパルスジェネレーターは哺乳刺激によりエストロジェンの負のフィードバックを受け, LH分泌の抑制されることがあげられる (Yavas & Walton, 2000). 本研究でも, 分娩後30日までに発情が回帰し, 卵巣に黄体がある牛は少なかった. しかし, 発情が回帰していない牛に酢酸ブセレリンのような持続性のGnRH誘導体を投与すると, 投与後7日には卵巣に黄体のある牛が有意に多くなった. このことから, 供試牛の多くは分娩後30日までに下垂体前葉のLHの充足が完了しており, そのためGnRH誘

導体を投与することで, 視床下部におけるGnRHパルスジェネレーターの抑制が軽減され, 卵巣にある主席細胞の排卵することが示唆された.

Crowe (2008) は, 分娩後にBCSが良好であると初回排卵が分娩後30日に起こるが, BCSが低いと分娩後70日から100日と遅延し, 一方, Peters (1982) は体重とBCSが分娩間隔に影響すると報告している. 本研究では試験1および試験2で供した牛のBCSが, それぞれ2.9 \pm 0.2, 3.0 \pm 0.2と良好なことから, 分娩後30日のGnRH誘導体の投与で, 発情が回帰し, その7日後に卵巣に黄体が形成されたものと考えられる.

今回, PRID挿入時に黄体がある牛はないものよりも受胎率が高い傾向にあった. この理由として, PRID挿入時に黄体がある牛では, 分娩後30日にLH反応性の卵胞 (直径 ≥ 8 mm) が卵巣にあり, GnRH誘導体投与後24時間から32時間で排卵が起こった. その結果, PRID挿入時の発情周期はDay 7となり (排卵日 = Day 1), Thatcher *et al.* (2002) が定時AIのための発情同期化処置は, Day 5からDay 12の開始で妊娠率が向上すると報告したことに一致する. 一方, 泌乳牛において発情同期化前にプレシंकを行い, その後CIDRを用いても妊娠率に影響しないとする報告もある (El-Zarkouny *et al.*, 2004).

肉用牛において, 子宮の形態的修復は, 分娩後21日までに左右子宮角の直径に違いがなくなり, 分娩後35日までにはほぼ等しくなり (Miettinen, 1990), 分娩後40日までに完了する (Okano & Tomizuka, 1987). 本研究では, 左右子宮角の最大直径はDay 0 (分娩後約30日) からDay 7にかけ違いがみられなくなり, 一方, 左右子宮角の最大直径を合わせた長さは, Day 0からDay 28の間で有意に減少する. このため子宮の形態的修復に

対し、性ホルモン処置による負の影響はみられなかった。

子宮内腔への微生物の感染は、卵巣だけでなく視床下部や下垂体にも影響を及ぼす (Sheldon *et al.*, 2004)。その結果、牛は低受胎となり、初回授精日数の延長や廃用率の増加となる (Azawi, 2008)。分娩後2週間では、ほとんどの牛で子宮内腔に微生物がみられ、その後、それらの微生物は子宮の内腔防御機構により排泄されるものの、分娩後21日ではまだ40%の牛で感染がみられる (Sheldon *et al.*, 2008)。本研究の細菌検査は、過去の報告にあるような子宮内腔ではなく、本来微生物は分離されない外子宮口の拭い検査により行った。その結果、CFUはDay 0 (分娩後30日) からDay 28にかけ減少する傾向にあり、性ホルモン処置による子宮内清浄化への影響はみられなかった。

結論として、分娩後早期からの卵巣賦活とPRID処置は、子宮修復を促し、受胎率の向上に寄与することが示された。

要約

黒毛和種牛において、分娩後の子宮修復や定時人工授精 (定時AI) に対するエストロゲン (E₂) カプセルのついたプロジェステロン (P₄) 徐放剤 (PRID) の効果を調べた。その結果、Day 0 (分娩後30日) にGnRH-B (酢酸ブセレリン10 µg) か、PGF₂ (クロプロステノール500 µg) を投与すると、Day 7で卵巣に機能的な黄体のある牛が増加し、血中P₄濃度もDay 0と比較し有意に上昇した (P<0.01)。今回、Day 7からDay 16まで腔内にPRIDを挿入、抜去時にPGF₂ を投与、その後24時間に安息香酸エストラジオール1 mgまたは48時間にGnRH-F (酢酸フェルチレリン100 µg) を筋肉内投与して、56時間に定時AIを行った。その結果、定時AIの受胎率は、Day 7に黄体がない牛よりもある牛で高い傾向にあった。また、Day 0からDay 28にかけ、左右子宮角の長さは有意に短くなり (P<0.01)、同時に外子宮口の細菌数も減少する傾向にあった。結論として、分娩後早期からの卵巣賦活とPRID処置は、子宮修復を促し、受胎率の向上に寄与することが示された。

キーワード：分娩後早期、PRID、受胎率、子宮修復、細菌数

謝辞

本研究の一部は、宮崎大学農学部「平成21年度学部長裁量経費」にて実施された。また、PRIDをはじめ本研究の処置で用いたホルモン製剤を提供して頂いたあすか製薬株式会社に深謝する。

文献

- Azawi, O. I. (2008) Postpartum uterine infection in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **105**, 187-208.
- Crowe, M. A. (2008) Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* **43**, 20-28.
- El-Zarkouny, S. Z., J. A. Cartmill, B. A. Hensley, J. S. Stevenson (2004) Pregnancy in dairy cows after synchronized ovulation regimens with or without presynchronization and progesterone. *J. Dairy Sci.* **87**, 1024-1037.
- Miettinen, P. V. (1990) Uterine involution in Finish dairy cows. *Acta. Vet. Scand.* **31**, 181-185.
- Okano, A., T. Tomizuka (1987) Ultrasonic observation of postpartum uterine involution in the cow. *Theriogenology* **27**, 369-376.
- Peters, A. R. (1982) Calving intervals of beef cows treated with either gonadotrophin releasing hormone or a progesterone releasing intravaginal device. *Vet. Rec.* **29**, 515-517.
- Sakase, M., Y. Seo, M. Fukushima, M. Noda, K. Takeda, S. Ueno, T. Inaba, H. Tamada, T. Sawada, N. Kawate (2005) Effect of CIDR-based protocols for timed-AI on the conception rate and ovarian functions of Japanese Black beef cows in the early postpartum period. *Theriogenology* **64**, 1197-1211.
- Schafer, D. J., J. F. Bader, J. P. Meyer, J. K. Handen, M. R. Ellersieck, M. C. Lucy, M. F. Smith, D. J. Patterson (2007) Comparison of progestin-based protocols to synchronize estrus and ovulation before fixed-time artificial insemination in postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.* **85**, 1940-1945.
- Sheldon, I. M., H. Dobson (2004) Postpartum uterine health in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **82-83**, 295-306.
- Sheldon, I. M., E. J. Williams, A. N. A. Miller, D. M. Nash, N.S. Herath (2008) Uterine disease in cattle after parturition. *Vet. J.* **176**, 115-121.
- Thatcher, W. W., F. Moreira, S. M. Pancarci, J. A. Bartolome, J. E. P. Santos (2002) Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Dom. Anim. Endocri.* **23**, 243-254.
- Yavas, Y., J. S. Walton (2000) Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology* **54**, 25-55.