

エストロジェンカプセルを含むプロジェステロン徐放剤による分娩後乳牛の 卵巣機能賦活

下条広介・羽石敬史・加治佐 誠¹⁾・Riki SISWANDI¹⁾・中山 緑¹⁾・小林郁雄²⁾・
藤代 剛³⁾・福山喜一³⁾・上村俊一[†]

宮崎大学農学部獣医臨床繁殖学講座

¹⁾ 宮崎大学農学部家畜病院 ²⁾ 山口大学大学院獣医連合 ³⁾ 宮崎大学農学部住吉フィールド

(2007年1月26日 受理)

Effect of progesterone releasing device with estrogen capsule on ovarian function in postpartum dairy cows

Kosuke SHIMOJO, Takashi HANEISHI, Makoto KAJISA¹⁾, Riki SISWANDI¹⁾,
Midori NAKAYAMA¹⁾, Ikuo KOBAYASHI²⁾, Tsuyoshi FUJISHIRO³⁾, Kiichi FUKUYAMA³⁾,
Shunichi KAMIMURA[†]

Theriogenology Laboratory, ¹⁾ Veterinary Hospital, ²⁾ United Graduate School of Veterinary Sciences,
Yamaguchi University, ³⁾ Sumiyoshi Field

Summary : Progesterone-releasing device (PRID) with estrogen capsule was inserted into vagina in early postpartum dairy cows. New follicular wave and formation of class III follicles (>10 mm in diameter) were induced during the insertion of PRID. At the timed insemination after PRID removal, 1/5 cows became conceived in E₂ treatment group, while 5/6 cows in GnRH treatment group got pregnant, and their calving interval was 429 ± 115.1 days and 346 ± 9.4 days, respectively. PRID protocol granted an acceptable ovarian activation in postpartum dairy cows.

Key words : E₂ and GnRH treatment, Ovarian function, Postpartum cows, PRID

緒言

近年、酪農経営において、泌乳量の増加に逆行する形で繁殖成績が低下しており、重大な問題として指摘されている (Macmillan *et al.* 1996). その原因として、高泌乳化に伴う受胎率の低下 (Lopez *et al.* 2003) や、分娩後の発情回帰の遅延、泌乳初期における負のエネルギーバランスなどがあげられる。分娩後、負のエネルギーバランス状態では、初回排卵までの期間が延長し (Zurek *et al.* 1995)、体内ホルモンが変化す

ると、下垂体機能や生殖活動が影響を受ける (Richards *et al.* 1991). 飼養頭数の増加に伴う発情の見逃しも繁殖成績の低下の原因の一つである。そのため、近年、様々な発情同期化プログラムが開発され、発情を発見することなく定時に人工授精をすることが可能となっている。発情発見の労力を軽減する発情同期化プログラムでは、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 投与後7日にプロスタグランジンF_{2α} (PGF_{2α})、さらに48時間後にGnRHを投与するオブシンク法 (Sakase *et al.*

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

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

2006) やGnRH投与後7日にPGF_{2α}, 24時間後に安息香酸エストラジオール (E₂) を投与するヒートシンク法 (Stevenson *et al.* 2005), あるいは腔内挿入プロジェステロン製剤を用いた様々な方法が検討されている. その際, 発情の同期化による定時人工授精と, 自然発情における人工授精での受胎率には, 違いが認められない (Tenhagen *et al.* 2005).

今回, 分娩後早期の牛に対して, 初診時の卵巢所見に合わせたホルモン剤を前処置として投与し, その後, エストロジェンカプセルを含むプロジェステロン徐放剤 (PRID) を腔内に挿入した. そして, 卵巢に新たな卵胞波を誘起することで, 卵巢機能の賦活を図り, 分娩後60日での定時人工授精プログラムの確立を目指した.

材料および方法

試験は, 2005年11月~2006年7月までの9カ月間で行い, 宮崎大学農学部附属住吉フィールドで飼養されている乳牛で, 正常分娩を経過している11頭 (2.7 ± 2.3産; 平均 ± 標準偏差) を供試した. ボディコンディションスコア (BCS) は, 乳牛の皮下脂肪蓄積の変化についてモニターし, 5段階で評価するもので, 今回は, 平均2.5以上 (2.75 ± 0.11) のスコアの乳牛を供試した (Yamada *et al.* 2003). 供試牛の飼養形態はフリーバーンと放牧の併用で, 分娩後30日の試験開始時における平均泌乳量は18.9 ± 5.2 kg/日であった.

試験ではまず, 分娩後の子宮の修復程度につい

て直腸検査や超音波検査法を用いて観察し, 左右の子宮角分岐部の太さが同程度であることを子宮修復の目安とした. 卵巢の観察では, 7.5 MHzのリニア型探触子 (L52, ソノサイトジャパン, 東京) を装着した超音波診断装置 (Sono Site® 180 PLUS, ソノサイトジャパン, 東京) を用いた. 卵巢機能の回復の指標として, 卵巢における黄体の存在を確認するとともに, PRID挿入中の黄体の変化を観察した. 黄体面積は, 超音波検査法により黄体が最大と思われる画像で静止し, 最大長径とそれに垂直な短径から数式 (長径/2 × 短径/2 × π) により算出した. この際, 黄体に腔がみられる場合はその面積を黄体面積から差し引いた. 卵胞の分類は, 卵胞の直径で3つにクラス分けし, 直径2 mm ~ 5 mmをクラス 卵胞, 6 mm ~ 9 mmをクラス 卵胞, 10 mm以上をクラス 卵胞とし, クラス毎の卵胞数を計測した. また, 発情時に他の牛に乗駕されるスタンディングを確認するための手段として, 尾根部に青色の特殊ペイント (DETAIL, サージミヤワキ, 東京) を初診時の分娩後30日に塗布した. そして, 尾根部の左側, 中央, 右側の3部位におけるテールペイントのはがれ具合 (1 ~ 4段階評価) でスタンディングを推測し, PRID挿入の分娩後51日までの発情を観察した. テールペイントのスコアについては, 1 = まったくはがれていない, 2 = 少しはがれている, 3 = かなりはがれている, 4 = 完全に消失とし, 左側, 中央, 右側の平均値が3以上で発情とした.

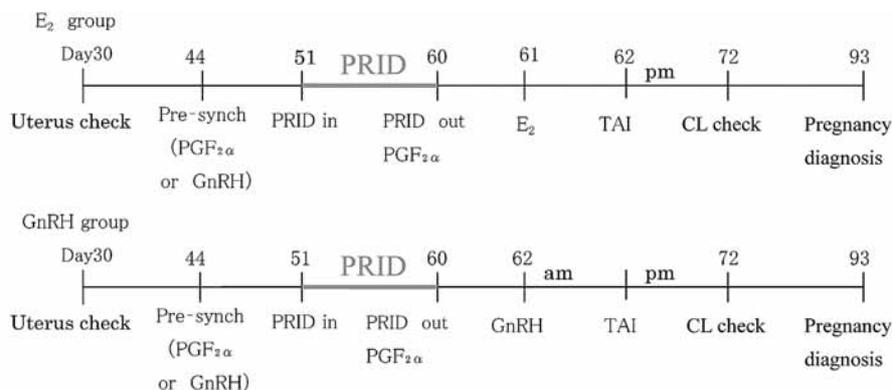


Fig. 1. Ovarian synchronization protocols using PRID insertion in postpartum dairy cows

At presynch treatment on day 44 postpartum, PGF_{2α} was treated on cows with CL whereas GnRH was on cows without CL. In E₂ group, estradiol was treated 24 h after PRID removal on day 61, whereas GnRH was treated 48 h after PRID removal on day 62.

分娩後44日に、前処置として黄体のある牛にはPGF_{2α}アナログ500 μg(レジブロンC, あすか製薬, 東京), 黄体の無い牛にはGnRH誘導体酢酸ブセレリン10 μg(イトレリン, あすか製薬, 東京)の筋肉内投与を行った。その1週間後に専用のアプリケーターを用いて腔内にプロゲステロン徐放剤(PRID®, あすか製薬, 東京)を挿入した。PRIDは1.55 gのプロゲステロンと10 mgのエストロジェンカプセルを含むホルモン徐放剤で、9日後に除去するとともにPGF_{2α} 500 μgの投与を行った。

牛群を試験開始時にランダムにE₂群(5頭)とGnRH群(6頭)に分け、E₂群はPRID除去後24時間に安息香酸エストラジオール1.0 mg(ギナンドール, 三共ライフテック, 東京)の投与を行った。GnRH群は、PRID除去後48時間にGnRH誘導体酢酸フェルチレリン100 μg(コンサルタン, あすか製薬, 東京)を投与し、E₂群とGnRH群ともにPRID除去後56時間に定時人工授精(定時AI)を行った。定時AI後10日(分娩後72日)に排卵確認として、卵巢における新たな黄体の形成を観察し、定時AI後31日(分娩後93日)に携帯型超音波診断装置を用いた胚芽の確認による早期妊娠診断を行った(Fig. 1)。

各ホルモン処置時に、超音波検査法により卵巢を観察するとともに、分娩後30日(初診時)、44日(ホルモン処置時)、51日(PRID挿入時)に採血を行い、血中プロゲステロン(P₄)濃度の測定

を行った。血中P₄濃度の測定では、自動蛍光免疫測定装置(Mini Vidas, 日本ビオメリュー, 東京)を用い、蛍光基質を用いた酵素免疫測定法で測定した。本法の測定感度は0.1 ng/mlで、測定内および測定間の変動係数は10%以下であった。

データの解析では、PRID除去後の各クラスの卵胞数、黄体面積、血中P₄濃度、分娩間隔の平均を求め、Student-*t*検定を用いて解析した。また、定時AI後の受胎率を求めるとともに、定時AI時のスタンディングあるいは粘液の流出などの発情徴候による発情回帰率の比較を、E₂群とGnRH群で行った。

結果

初診時の分娩後30日における子宮の修復状況では、5/11頭において両子宮角の太さが同程度で、修復しており、他の6頭においては左右子宮角の分岐部の太さが異なる修復途中であった。修復途中の1頭は、子宮内に粘液が貯留する軽度の産褥性子宮内膜炎であった。しかし、分娩後44日の前処置時においては、全頭で子宮の修復が確認された。初診時の分娩後30日における卵巢の回復状況では、中型の黄体(5.8 ± 2.3 cm²)が3/11頭においてみられ、そのうち2頭では子宮が未修復であった。残りの8頭では黄体がなく、卵胞のみが観察された。また、クラス 卵胞が全ての牛に1個以上(1.54 ± 0.68個)観察された(Table 1)。分娩後44日の前処置時、3/11頭において大型の

Table 1 Number of follicles characterized by the diameter of follicles at treatment period (average ± s.d.)

Treatment	Follicular class	Fresh check (Day 30)	Pre-synch (Day 44)	PRID in (Day 51)	PRID removal (Day 60)
Total (n = 11)	Class	6.63 ± 3.32	8.09 ± 2.54	7.00 ± 3.97	6.72 ± 2.83
	Class	1.54 ± 1.63	1.00 ± 1.09	1.45 ± 1.43	1.63 ± 1.12
	Class	1.54 ± 0.68	1.81 ± 0.98	1.72 ± 1.27	2.09 ± 0.94
E ₂ group (n = 5)	Class	7.62 ± 4.20	8.80 ± 2.58	4.40 ± 1.81	6.40 ± 2.46
	Class	2.00 ± 2.12	1.00 ± 1.00	1.60 ± 1.81	1.80 ± 0.83
	Class	1.40 ± 0.54	2.00 ± 1.00	2.40 ± 1.34	2.20 ± 1.09
GnRH group (n = 6)	Class	7.00 ± 2.75	7.50 ± 2.58	9.16 ± 4.07	7.16 ± 3.18
	Class	1.16 ± 1.16	1.00 ± 1.26	1.33 ± 1.21	1.50 ± 1.37
	Class	1.66 ± 0.86	1.66 ± 1.03	1.16 ± 0.98	2.00 ± 0.89

Follicular size : Class 2~5 mm, Class 6~9 mm, Class > 10 mm.
 Class follicles observed during PRID insertion for 9 days were all regressed, and then newly formed class follicles were observed in all cows at PRID removal.
 No significant difference in both groups was detected.

Table 2 Outcome of CL during PRID insertion with their CL area (average \pm s.d.)

CL induced by the treatment	Outcome of CL during PRID in for 9 days	CL area at PRID insertion (cm ²)	CL area at PRID removal (cm ²)
CL induced by PGF _{2α} n = 3	Existence n = 3	4.7 \pm 2.5 cm ²	5.1 \pm 0.4 cm ²
CL induced by GnRH n = 7	Existence n = 4	4.9 \pm 1.6 cm ²	3.7 \pm 1.0 cm ²
	Disappear n = 3	2.8 \pm 0.3 cm ²	

Table 3 Plasma progesterone levels at PRID insertion and CL check period (average \pm s.d.)

Treatment	PRID in (51 days postpartum)	CL check (72 days postpartum)
Total (n = 11)	7.51 \pm 3.39 ng/ml	12.0 \pm 4.19 ng/ml
Pregnant (n = 6)	7.37 \pm 3.25 ng/ml	13.2 \pm 2.04 ng/ml
Non-pregnant (n = 5)	7.68 \pm 3.92 ng/ml	10.7 \pm 5.72 ng/ml
E ₂ group (n = 5)	7.0 \pm 3.3 ng/ml	12.1 \pm 3.3 ng/ml
GnRH group (n = 6)	10.0 \pm 3.6 ng/ml	11.9 \pm 5.13 ng/ml

There was no significant difference in progesterone levels among cow groups.

黄体 (10.8 \pm 1.1 cm²) が卵巣に観察され、それらはPGF_{2 α} 投与の対象牛となり、黄体のない8/11頭はGnRH投与の対象牛となった。分娩後51日のPRID挿入時まで、4/11頭でテールペイント (はがれ具合が左側, 中央, 右側の平均で3以上), もしくは直腸検査時に子宮の収縮がみられ、発情の発現が推測された。分娩後51日のPRID挿入時, GnRH投与の1頭を除く10/11頭で黄体 (3.75 \pm 1.46 cm²) がみられ, PRID除去時にGnRH処置で形成された黄体の消失が3/7頭 (PRID挿入時の黄体面積2.78 \pm 0.31 cm²) で確認された (Table 2)。

PRID挿入前, クラス 卵胞の存在しない牛が1頭みられたが, PRID除去時には全ての牛でクラス 卵胞がみられ, その後, 分娩後72日の黄体確認時には, 新たな黄体の形成により排卵が確認された。PRID除去時, 主席卵胞のサイズが10 mmであった2頭は, それぞれ分娩後62日の定時AIでは不受胎となり, 一方, 11 mm ~ 19 mmの主席卵胞を持つ7頭では6頭が受胎, 20 mm以上の卵胞を持つ2頭は, ともに不受胎となった。

黄体確認時の分娩後72日, 全頭で黄体 (平均4.04 \pm 0.84 cm²) が確認され, 妊娠診断時の分娩後93日には, 1頭を除く10頭で黄体の存続が確認された。その後, 1頭は乳房炎の重症化と栄養不

振, 1頭は高齢により淘汰されたため, 試験から除外した。黄体面積と血中P₄濃度は高い正の相関関係にあり, 一方, 妊娠牛と非妊娠牛の血中P₄濃度の間には有意な差は認められなかった (Table 3)。定時AI時の発情は, E₂群で1/5頭, GnRH群で1/6頭にみられ, E₂群の1頭は不受胎, GnRH群の1頭は受胎した。受胎に要したAI回数は1 ~ 4回 (平均1.4回) で, 分娩間隔はE₂群429 \pm 115.5日, GnRH群346 \pm 9.4日とGnRH群で短縮した。

考 察

今回, 膈内に9日間挿入したPRIDを除去後の定時AIで, E₂群20%, GnRH群83%が受胎し, GnRH群が有意に高い受胎率となった (P < 0.05)。PGF_{2 α} 投与後のGnRHによる排卵同期化は, PGF_{2 α} 投与後72 ~ 80時間で起こり (Tenhagen *et al.* 2005), この際, PRID除去時の主席卵胞のサイズが10 mmと20 mmでは, その後の排卵時間に差が生じる (Roberto *et al.* 2001)。卵胞サイズが大きくなるにつれ, 卵胞全体のLHレセプター数が増加するため (Garverick *et al.* 2002), 今回, 20 mm以上の卵胞を持つ牛2頭では11 mm ~ 19 mmの卵胞サイズを持つ牛よりも排卵までの時間が短縮し, 受胎率が低下したものと考えら

れた。また、20 mm以上の卵胞を持つ牛はともにE₂群であり、主席卵胞のサイズとE₂投与の関連が考えられた。一方、GnRH群は、5/6頭が11 mm~19 mmの分類に属しており、E₂群に比べ受胎率が高くなったが、両群の分娩間隔には統計学的な有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。E₂投与はGnRH投与と比較して、新規卵胞波の形成が遅れる (Burke *et al.* 2002) とする報告もあり、頭数は少ないが今回も同様な結果が推察される。

今回、PRIDに含まれるエストロジェンの働きにより、PRID挿入時に存在した卵胞は閉鎖退行し、3日までのエストロジェンのピークを境に新規卵胞の発育がみられた。一方、GnRHの前処置で形成された新しい黄体は、PRID除去時にはすでに退行し、これはPRIDに含まれるエストロジェンにより黄体の早期退行や黄体の形成そのものが抑制されたためと思われる。しかし、分娩後51日のPRID挿入時では、前処置のGnRH投与により誘起された黄体 ($4.9 \pm 1.6 \text{ cm}^2$) は、PGF_{2 α} 投与によって形成された黄体 ($4.5 \pm 2.5 \text{ cm}^2$) よりも充実しており、形成途中での退行は否定される。分娩後、初回排卵で形成された黄体の寿命は短いとされているため (Sakase *et al.* 2006)、今回の早期退行は黄体そのものの質的な違いも推察されるが、詳細は不明である。

今回、PRID挿入中に黄体が退行しなかった牛群では3頭中2頭が受胎し、退行した牛群では7頭中4頭で受胎したが、黄体の退行そのものが受胎率に与える影響は不明である。AI前の高いプロジェステロン濃度が受胎率の増加につながる (Shaw *et al.* 1996) との報告もあり、今後、より詳細な検討が必要である。エストロジェンカプセルを含有したプロジェステロン製剤PRIDを牛の腔内に留置することにより、新規の卵胞波の形成と、クラス 卵胞の出現がみられ、PRIDによる発情同期化は分娩後早期の卵巣賦活に有用と思われる。

要約

分娩後早期の乳牛に対して、エストロジェンを含むプロジェステロン徐放剤PRIDを腔内挿入することで新たな卵胞波が発生し、PRID除去時には直径10 mm以上のクラス 卵胞の形成がみられた。PRID除去後の定時AIにおいて、E₂群 1/

5頭 (20%)、GnRH群 5/6頭 (83%) が受胎し、最終的な分娩間隔は、E₂群 429 ± 115.1 日、GnRH群 346 ± 9.4 日となった。PRIDは分娩後の乳牛の卵巣機能賦活に有効であった。

キーワード：E₂とGnRH投与、卵巣機能、分娩後乳牛、PRID

謝辞

供試牛を管理していただいた本学農学部附属住吉フィールドセンターの黒木志郎専門職員、逸見広一郎技術員、林 智彦技術員に深謝する。また、本試験の繁殖プログラムで用いたPRIDとブセレリンを提供いただいたあすか製薬 (東京)、およびコンセラーを提供いただいたシェリングプラウアニマルヘルス (東京) に謝意を表す。本試験は平成18年度宮崎大学戦略重点経費 (教育戦略経費) 並びに独立行政法人科学技術振興機構 (平成18年度実用化のための可能性試験, FS) の研究助成を受けて実施した。

引用文献

- Burke, C. R., Mussard, M. L., Gasser, C. L., Grum, D. E., Day, M. L. Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. (2003) *Theriogenology* **60**, 647-658.
- Garverick, H. A., Baxter, G., Gong, J., Armstrong, D. G., Campbell, B. K., Gutierrez, C. G., Webb, R. Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. (2002) *Reproduction* **123**, 651-661.
- Lopez, H., Satter, L. D., Wiltbank, M. C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. (2004) *Anim. Reprod. Sci.* **81**, 209-223.
- Macmillan, K. L., Lean, I. J., Westwood, C. T. The effects of lactation on the fertility of dairy cows. (1996) *Aust. Vet. J.* **73**, 141-147.
- Richards, M. W., Wettemann, R. P., Spicer, L. J., Morgan, G. L. Nutritional anestrus in beef cows: effects of body condition and ovariectomy on serum luteinizing hormone and insulin-like growth factor-I. (1991) *Biol. Reprod.* **44**, 961-966.
- Roberto, S., Fricke, P. M., Ferreira, J. C. P., Ginther,

- O. J., Wiltbank, M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. (2001) *Biol. Reprod.* **65**, 1403-1409.
- Sakase, M., Kawate, N., Nakagawa, C., Fukushima, M., Noda, M., Takeda, K., Ueno, S., Inaba, T., Kayoko, K., Tamada, H., Sawada, T. Inhibitory effects of CIDR - based ovulation - synchronization protocols on uterine PGF_{2α} secretion at the following luteal phase in early postpartum non-cycling beef cows. (2006) *J. Reprod. Dev.* **52**, 497-502.
- Shaw, D. W., Britt, J. H. Concentrations of tumor necrosis factor α and progesterone within the bovine corpus luteum sampled by continuous-flow microdialysis during luteolysis, *in Vivo*. (1995) *Biol. Reprod.* **53**, 847-854.
- Stevenson, J. S., Phatak, A. P. Inseminations at estrus induced by presynchronization before application of synchronized estrus and ovulation. (2005) *J. Dairy Sci.* **88**, 399-405.
- Tenhagen, B. A., Kuchenbuch, S., Heuwieser, W. Timing of ovulation and fertility of heifers after synchronization of oestrus with GnRH and Prostaglandin F_{2α}. (2005) *Reprod. Dom. Anim.* **40**, 62-67.
- Yamada, K., Nakao, T., Isobe, N. Effects of body condition score in cows peripartum on the onset of postpartum ovarian cyclicity and conception rates after ovulation synchronization/fixed-time artificial insemination. (2003) *J. Reprod. Dev.* **49**, 381-388.
- Zurek, E., Foxcroft, G. R., Kennelly, J. J. Metabolic status and interval to first ovulation in postpartum dairy cows. (1995) *J. Dairy Sci.* **78**, 1909-1920.