

膣内プロジェステロンと GnRH の併用による分娩後無発情牛の治療効果

上村 俊一, 宮崎 康郎, 安藤 貴朗, 浜名 克己

榎元 勝治^{*1)}, 淵上 新蔵^{*2)}, 永野 理樹^{*3)}

(家畜臨床繁殖学研究室)

平成11年8月5日 受理

Curative Effects of Intra-Vaginal Progesterone Treatment Applied with GnRH upon the Estrous Response and Fertility in the Postpartum Anestrous Cows

Shunichi KAMIMURA, Yasuo MIYAZAKI, Takaaki ANDO, Katsumi HAMANA,

Shoji ENOMOTO^{*1)}, Shinzo FUCHIUE^{*2)} and Masaki NAGANO^{*3)}

(Laboratory of Theriogenology)

緒 言

畜産農家において、繁殖効率の低下は、乳量の減少や受胎までの授精回数の増加、廃用牛の増加となり、最終的に生産コストの増加につながる。分娩後の無発情は、重要な繁殖障害で、通常の牛群でも20%は無発情であり、うち33%は無発情無排卵と報告されている¹⁾。

無発情を示す疾病のうち、卵巢静止は、卵巢の形状は小さく弾力はあるが、卵胞の発育、排卵および黄体の形成が認められない状態が持続するものをいい、直接的には、下垂体前葉からの性腺刺激ホルモンの分泌機能の低下と考えられている¹⁰⁾。一方、鈍性発情は、卵胞発育、排卵、黄体形成は正常だが、発情行動が不明瞭なものをいい、原因として飼養環境や高泌乳等の影響が考えられるが不明な点も多い¹⁾。これらの牛では、性腺刺激ホルモンやエストロジェン、プロジェステロンなどの分泌量が概して低いか、相互の連携が順調でないと考えられている。通常、このような症例には、ホルモン製剤が投与さ

れるが、卵巢反応にばらつきが多く、より正常な発情周期を起こすためには、プロジェステロンを一定期間徐放、分泌させた後に発情前期の状態をつくり、内因性のホルモン分泌を起こす方が生理的状态に近く、有効と思われる¹⁸⁾。

近年、従来のホルモン製剤とは異なる膣内挿入プロジェステロン (CIDR) が、牛の発情同期化のため、利用されている^{3, 4, 20)}。これは CIDR を膣内に挿入し留置することにより、発情を抑制し、その後除去することにより、視床下部-下垂体-性腺軸に対する抑制がとれ、リバウンド的に発情を起こすものである。さらに、欧米やオーストラリア、ニュージーランドでは、発情遅延や無発情牛の発情誘起に CIDR の短期挿入が試みられている^{3, 19)}。しかし、CIDR を分娩後無発情牛の治療に応用した場合、発情誘起効果に比べ受胎率が低く、これには処置時の卵巢の卵胞発育状態が影響するとされるが、不明な点も多い^{3, 19)}。

今回、分娩後無発情の黒毛和種の治療に CIDR を用い、挿入時の卵巢所見を観察するとともに、他のホルモン剤の併用による治療効果を検討した。

材 料 と 方 法

供試牛は、黒毛和種の繁殖農家において分娩後無発情との依頼で獣医師が往診し、卵巢静止 (97頭) や鈍性発情 (109頭) と診断された黒毛和種経産牛 206頭 (6.9±2.2産次, 平均±標準偏差) である。

^{*1)} NOSAI 北薩長島支所, 出水郡長島町平尾
NOSAI Hokusatsu Nagashima Sub-center, Nagashima-cho, Izumi-gun

^{*2)} NOSAI 中部伊佐支所, 伊佐郡菱刈町花北
NOSAI Chubu Isa Sub-center, Hishikari-cho, Isa-gun

^{*3)} NOSAI 長崎県平戸支所, 平戸市紐差町
NOSAI Nagasaki Hirado Sub-center, Himosashi-cho, Hirado-shi

卵巣静止は分娩後40日を過ぎても発情徴候が無く、直腸検査による卵巣の形状は小さく、卵胞の十分な発育や排卵、黄体の形成がないものとした¹⁰⁾。一方、鈍性発情は、同様に無発情だが、直腸検査上、卵巣に成熟卵胞や黄体の存在するものとした¹¹⁾。供試牛は、いずれも肢蹄等に異状がなく、子宮疾患や、極端な栄養障害のないもの（ボディコンディションスコアが2～4の範囲内）である。

牛は、初診時に直腸検査を行い、卵巣の所見を記録するとともに、1.9 gの天然型プロジェステロンを含有するCIDR（Controlled Internal Drug Releasing device, InterAg, New Zealand）を8日間（87頭）、あるいは12～14日間（119頭）膈内に挿入した。また、8日間CIDRを挿入した牛群のうち、卵巣静止32頭と鈍性発情35頭の計67頭には、性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH、スボルネン注、デンカ製薬、川崎）100 μ gを挿入時、筋肉注射した。CIDR除去後、発情発現を観察するとともに、発情牛には人工授精を行った。妊娠鑑定は、発情が回帰しなかったものについて、授精後40日以降に、直腸検査や超音波断層装置により行った。また、一部の牛（20頭）については、CIDR挿入前後に採血を行い、血中プロジェステロン（P₄）濃度を二抗体RIA法¹⁶⁾により測定した。

最終的なデータの検討では、CIDRの挿入期間により、供試牛を8日群と12日群に分け、CIDR除去後の発情誘起率や初回授精受胎率を比較した。また、CIDR挿入時の卵巣所見により、卵巣静止と鈍性発情の牛群にそれぞれ分け、同様に検討するとともに、8日群ではGnRHの併用効果も検討した。統計学

的解析では、血中P₄濃度については牛群間の平均値についてStudent's-t testで行い、また、発情誘起率や受胎率については、カイ二乗（ χ^2 ）検定により行った。

結 果

供試牛206頭のうち、185頭（89.8%）がCIDR除去後、1日から7日にかけ発情を示し、特に2日（81頭、43.8%）と3日（67頭、36.2%）に集中した（Table 1）。CIDRの挿入期間による発情頭数の比較では、8日群が2日に46/81頭（56.8%）、12日群が3日に45/104頭（43.3%）と多く、それぞれ対の牛群に対し有意差がみられた（2日：P<0.01、3日：P<0.05）。また、8日群ではCIDR除去後4日以内に96.3%（78/81頭）が発情を示したのに対し、12日群では84.6%（88/104頭）と発情の発現がばらつく傾向にあった。

供試牛のうち、人工授精が行われたのは170/206頭（82.5%）で、発情が発現した185頭のうち、15頭は発情徴候が弱かったり、粘液の白濁や管理上の都合により、人工授精が見送られた。初回授精による受胎率は、43.5%（74頭/170頭）で、牛群間に有意差はないものの、8日群が48.6%（35/72頭）と12日群の39.8%（39/98頭）より高かった。

一方、CIDR挿入時の卵巣所見による比較では、発情誘起率において鈍性発情が卵巣静止より有意差はないものの高い傾向にあった（Table 2、8日群：鈍性発情95.5%（42/44頭）、卵巣静止90.7%（39/43頭）、12日群：鈍性発情89.2%（58/65頭）、卵巣静止85.2%（46/54頭））。受胎率では、同様に有意

Table 1. Estrous responses following the finish of treatment in anestrus cows with a CIDR device insertion executed for 8 days or 12 days. Conception rates are results for all cows inseminated during the first induced estrus.

	8-day insertion		12-day insertion		Total		P*
	n	%	n	%	n	%	
Estrous response after CIDR out	81	93.1	104	87.4	185	89.8	0.181
Day 1	2	2.5	0	0.0	2	1.1	0.102
Day 2	46	56.8	35	33.7	81	43.8	0.001
Day 3	22	27.2	45	43.3	67	36.2	0.037
Day 4	8	9.9	8	7.7	16	8.6	0.055
Day 5 or after	3	3.7	16	15.4	19	10.3	0.017
No. of cows inseminated ¹⁾	72	79.3	98	82.4	170	82.5	0.940
No. of cows conceived by 1st AI	35	48.6	39	39.8	74	43.5	0.160
No. of cows	87		119		206		

*P: Significance of difference between groups

¹⁾: % was expressed by No. of cows inseminated / No. of cows

差はないものの、8日群において鈍性発情が卵巢静止よりも高く {54.1% (20/37頭), 42.9% (15/35頭)}, 12日群ではむしろ鈍性発情が低かった {35.7% (20/65頭), 45.2% (19/42頭)}.

8日群で CIDR 挿入時に GnRH を併用した卵巢静止では、8日群の非投与および12日群との間に、差がみられなかった。しかし、鈍性発情では、GnRH を併用した牛群において、受胎率が64.3% (18/28頭) と8日群の非投与牛36.4% (4/11頭) や

12日群35.7% (20/56頭) に比べ有意に高くなった (Table 3, $P < 0.05$).

CIDR 挿入前、卵巢静止では血中 P_4 濃度が0.3ng/mlと鈍性発情の2.8ng/mlより有意に低かったが ($P < 0.01$), 挿入中はいずれも3.0ng/mlと高くなり、発情時に低下し、排卵後の黄体形成とともに4.0ng/ml以上に増加しており、CIDR 挿入前の卵巢所見による差はみられなかった (Fig.1).

Table 2. Estrous responses and conception rates following the treatment with a CIDR device insertion in anestrus cows characterised by the ovarian condition at CIDR insertion; ovarian quiescence or silent estrus.

	8-day insertion		12-day insertion		Total	P* by ovarian condition		P* by insertion range	
	quies.	silent	quies.	silent		8 day	12 day	quies.	silent
Estrous response	39	42	46	58	185	0.381	0.508	0.413	0.247
No. of cows inseminated ¹⁾	35	37	42	56	170	0.739	0.233	0.662	0.765
No. of cows conceived	15	20	19	20	74	0.342	0.340	0.834	0.080
No. of cows	43	44	54	65	206				

*P: Significance of difference between groups

Table 3. Estrous responses and conception rates following the treatment with a CIDR device insertion in anestrus cows characterised by the ovarian condition at CIDR insertion; ovarian quiescence or silent estrus. Among the 87 cows in 8-day insertion group, a total of 67 cows were injected GnRH 100 µg at CIDR insertion.

	8-day insertion				12-day insertion		Total	P*					
	CIDR only: A		CIDR/GnRH: B		CIDR only: C			Ovarian quiescence			Silent estrus		
	quies.	silent	quies.	silent	quies.	silent		A-B	A-C	B-C	A-B	A-C	B-C
Estrous response	11	9	28	33	46	58	185	0.218	0.173	0.765	0.463	0.301	0.400
No. of cows inseminated ¹⁾	11	9	24	28	42	56	170	0.066	0.080	0.768	0.140	0.234	0.423
No. of cows conceived	4	2	11	18	19	20	74	0.388	0.593	0.593	0.028	0.427	0.013
No. of cows	11	9	32	35	54	65	206						

*P: Significance of difference between groups

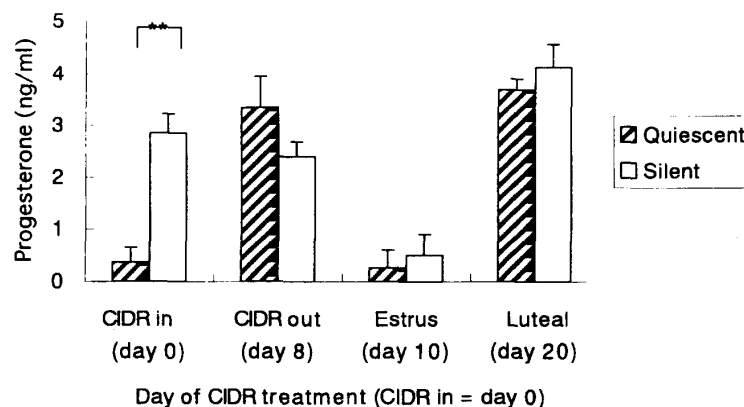


Fig.1. Plasma progesterone concentration in cows with ovarian quiescence and silent estrus. There was a statistical difference in mean concentrations between ovarian quiescence and silent estrus on day CIDR insertion (**: $P < 0.01$).

考 察

膣内挿入のプロジェステロン製剤による牛の発情同期化は、膣からのプロジェステロンの徐放により P_4 濃度を発情休止期の状態に保ち、それを除去することによって P_4 濃度が低い発情前期となり、発情を起こすものである¹⁰⁾。通常、牛では発情周期の後半に子宮内膜から $PGF_{2\alpha}$ が分泌され、黄体が退行することにより発情が誘起されるが、そのためには少なくとも7日間のプロジェステロン優位期間の先行が必要とされる⁹⁾。今回、鈍性発情や卵巢静止状態の牛に対する CIDR 挿入は、同様の薬理効果を想定して8日間とした。

通常、分娩後の牛の無発情無排卵は、優性卵胞の形成がみられないことより、むしろ发育した優性卵胞が排卵しないために起こるとされる^{2, 6, 14, 20)}。無排卵牛に対し GnRH を投与すると、直接下垂体前葉に働き、LH や FSH の一過性 (2～3 時間) の分泌を起こすが、優性卵胞が選択される前では排卵は誘起されず¹¹⁾、分娩後の GnRH の無作為な投与は疑問とされる¹⁷⁾。今回、卵巢静止では GnRH の投与効果が得られず、これらの牛では優性卵胞が選択される以前であったり、あるいは視床下部－下垂体軸の異常により優性卵胞の定期的な形成が行われなかったことが推察される。

外因性的プロジェステロン処置により、LH パルス頻度は抑制され、血中 P_4 濃度が高い間は発情や排卵が起こらない。しかし、長期間のプロジェステロン処置 (12日以上) は、除去後の発情開始時期がより集中化する反面、受胎率は低下する^{7, 8)}。これは10日以上存続した優性卵胞は受精不能、あるいは老化した卵子を排卵し、発情の同期化は得られるものの、受胎率が低下することによる^{5, 13, 15)}。このため、現在では CIDR の挿入期間を短縮する傾向にあるが、GnRH を併用した場合でも最低7日間のプロジェステロン処置が必要とされる¹²⁾。今回、12日群では、8日群に比べむしろ発情発現がばらつき、一方、受胎率は低下したことから、従来の報告と同様、CIDR の12日間の挿入により、卵子の老化現象が起こったものと推察される。

CIDR の挿入直後では、黄体期に類似した急速な P_4 濃度の上昇が3～5日間あり、その後徐々に減少し、黄体期の半分程度の濃度 (2 ng/ml) を9～12日間の処置期間中維持する³⁾。今回、CIDR の挿入前後で血中 P_4 濃度を測定したところ、同様の推

移を示し、また、挿入後のホルモン動態には卵巢静止や鈍性発情の間で特に違いはみられなかった。血中 P_4 濃度と受胎に関してはこれまで多くの報告^{1, 10, 18)}があるが、今回はホルモン濃度の測定数が少なく (卵巢静止16例、鈍性発情4例)、受胎性との関連は明らかにできなかった。

今回、分娩後の無発情牛に CIDR を8日あるいは12日間挿入したところ、発情が高率に誘起され、特に8日群で CIDR 除去後2日、12日群で3日に発情発現が多くみられた。CIDR 挿入時の卵巢所見では、鈍性発情において CIDR の8日間挿入が12日間の挿入よりも治療効果が高く、特に、CIDR 挿入時に GnRH を併用した牛群の受胎率は12日間の CIDR 単独群より有意に高くなった。一方、卵巢静止では、発情誘起率は高いものの、8日群や12日群のいずれも受胎率が低く、また、GnRH による併用効果も特に認められなかった。これらのことから、分娩後の無発情牛に対する CIDR の治療効果は、CIDR 挿入時の卵巢所見 (鈍性発情あるいは、卵巢静止) により異なり、鈍性発情では GnRH の併用効果の高いことが明らかとなった。

要 約

分娩後の無発情牛に対する、膣内プロジェステロン CIDR の挿入と性腺刺激ホルモン放出ホルモン GnRH の併用による治療効果を検討した。供試牛は、卵巢静止 (97頭) および鈍性発情 (109頭) と診断された黒毛和種206頭である。CIDR の挿入期間により牛群を8日群 (87頭) と12日群 (119頭) に分け、8日群のうち、67頭には CIDR 挿入時 GnRH 100 μ g を筋肉注射した。CIDR 除去後、発情発現を観察するとともに、CIDR 挿入前後の血中プロジェステロン (P_4) 濃度を測定した。

その結果、CIDR 除去後、185/206頭 (89.8%) に発情がみられ、特に8日群で2日 (46/81頭、56.8%)、12日群で3日 (45/104頭、43.3%) に多くみられた。170頭に人工授精が行われ、74頭 (43.5%) が初回授精で受胎したが、牛群間に差はみられなかった。卵巢所見では、卵巢静止で両群間の受胎率に差はみられず、鈍性発情では8日群で GnRH を投与した牛群の受胎率が64.3% (18/28頭) と12日群の35.7% (20/56頭) より有意に高かった。CIDR 挿入時の血中 P_4 濃度は、卵巢静止で0.3 ng/ml と鈍性発情の2.8 ng/ml より有意に低かったが、挿入中およびその後の発情時や黄体形成時には卵巢所

見による差はなかった。

分娩後の無発情牛に対する 8 日と 12 日間の CIDR 挿入により, CIDR 除去後 7 日以内に発情が誘起され, 特に 2 日と 3 日に多くみられた。一方, 受胎率は, 卵巣静止では挿入期間による差はみられなかったが, 鈍性発情では CIDR を 8 日間挿入し, GnRH を併用した牛群が 12 日群より有意に高くなり, 卵巣状態により CIDR と GnRH の併用による治療効果の異なることが明らかとなった。

謝辞: 本論文を纏めるに当たり, 校閲を賜った鹿児島大学農学部坂本 紘教授に深謝する。また, プロジェステロン製剤 CIDR を提供いただいた家畜改良事業団熊本事業所, ならびに GnRH 製剤を提供いただいたデンカ製薬株式会社に謝意を表す。本研究の一部は文部省科学研究費補助金 (課題番号 11836008) によった。

文 献

- 1) Gordon, I.: The cow's oestrous cycle and associated events. in *Controlled Reproduction in Cattle & Buffaloes*. p. 100-132, Cab International, Oxon (1996)
- 2) Kamimura, S., Sameshima, H., Enomoto, S. and Hamana, K.: Turnover of ovulatory and non-ovulatory dominant follicles in postpartum Japanese black cows. *J. Reprod. Dev.*, **40**, 171-176 (1994)
- 3) Macmillan, K.L. and Peterson, A.J.: A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. *J. Anim. Sci.*, **33**, 1-25 (1993)
- 4) McDougall, S., Leijnse, P., Day, A.M., Macmillan, K.L. and Williamson, N.B.: A case control study of anoestrus in New Zealand dairy cows. *Proceeding New Zealand Socie. Anim. Product.* **53**, 101-103 (1993)
- 5) Mihm, M., Baguisi, A., Boland, M.P. and Roche, J.F.: Association between the duration of dominance of the ovulatory-follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J. Reprod. Fertil.*, **102**, 123-130 (1994)
- 6) Murphy, M.G., Boland, M.P. and Roche, J.F.: Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. *J. Reprod. Fertil.*, **90**, 523-533 (1990)
- 7) Odde, K.G.: A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J. Anim. Sci.*, **68**, 817-830 (1990)
- 8) Roche, J.F.: Effect of short-term progesterone treatment on oestrous response and fertility in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, **40**, 433-440 (1974)
- 9) Roche, J.F., Ireland, J. and Mawhinney, S.: Control and induction of ovulation in cattle. *J. Reprod. Fertile., Suppl.*, **30**, 211-222 (1981)
- 10) Roberts, S.J.: Infertility in the cow. in *Veterinary Obstetrics and Genital Diseases (Theriogenology)*. 3rd ed. p. 495-512, Edwards Brothers Inc., Michigan (1986)
- 11) Ryan, M., Mihm, M. and Roche, J.F.: Effect of GnRH given before or after dominance on gonadotrophin response and the fate of that follicle wave in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fertil., Abstract* **21**, 28 (1998)
- 12) Ryan, D.P., Snijders, S., Yakuub, H. and O'Farrell, K.J.: An evaluation of estrus synchronization programs in reproductive management of dairy herds. *J. Anim. Sci.*, **73**, 3687-3695 (1995)
- 13) Sirois, J. and Fortune, J.E.: Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*, **127**, 916-925 (1990)
- 14) Stagg, K., Diskin, M.G., Sreenan, J.M. and Roche, J.F.: Follicular development in long-term anoestrous suckler beef cows fed two levels of energy postpartum. *Anim. Reprod. Sci.*, **38**, 49-61 (1995)
- 15) Stock, A.E. and Fortune, J.E.: Ovarian follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*, **132**, 1108-1114 (1993)
- 16) 田谷一善, 渡辺 元, 笹本修司: ^{125}I 標識ホルモンを用いたプロジェステロン, テストステロンおよびエストラジオール- 17β のラジオイムノアッセイについて. *家畜繁殖誌*, **31**, 186-197 (1985)
- 17) Thatcher, W.W., Drost, M., Savio, J.D., Macmillan, K.L., Entwistle, K.W., Schmitt, E.J., De la sota R.L. and Morris, G.R.: New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, **33**, 27-49 (1993)
- 18) Wenzel, J.G.W.: Estrous cycle synchronization. in Youngquist, R.S. (ed.), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. p.290-294, W.B. Saunders, Philadelphia (1997)
- 19) Xu, Z.Z., Burton, L.J. and Macmillan, K.L.: Treatment of postpartum anoestrous dairy cows with progesterone, oestradiol and equine chorionic gonadotrophin. *New Zealand Vet. J.*, **45**, 205-207 (1997)
- 20) Xu, Z.Z., Burton, L.J. and Macmillan, K.L.: Reproductive performance of lactating dairy cows following estrous synchronization regimens with PGF $_{2\alpha}$ and progesterone. *New Zealand Vet. J.*, **47**, 687-701 (1997)

Summary

Determinations were made on the curative effects of intra-vaginal progesterone treatment (CIDR) applied with Gonadotrophin releasing hormone (GnRH) upon the estrous response and fertility in the postpartum anestrous cows. A total of 206 Japanese black cows consisting of 97 individuals with ovarian quiescence and 109 individuals with silent estrus were put under examinations in the present experiment. Based on the CIDR insertion period, the animals were divided into the two groups that are '8-day' group of 87 individuals and '12-day' group of 119 individuals. In case of the '8-day' group, 100 μ g of GnRH was additionally injected to the 67 individuals. After the CIDR was pulled out, estrous responses were observed and the plasma progesterone profiles were determined before and after the CIDR insertions.

185 out of the 206 cows (89.8%) showed estrus after the pulling-out of the CIDR. Especially in 46 out of the 81 cows (56.8%), the symptoms of estrus were concentrated on day 2 in the '8-day' insertion group; while in 45 out of the 104 cows (43.3%), those were concentrated on day 3 in the '12-day' insertion group. A total of 74 out of the 170 treated cows (43.5%) were conceived by the first insemination, but no difference was observed between the two groups. Judged from the ovarian findings, no difference was detected among the two groups, however the cows injected with GnRH in the '8-day' group showed significantly higher conception rate than those in the '12-day' group. Plasma progesterone in the cows with ovarian quiescence showed significantly lower level on the CIDR insertion day than in those with silent estrus, but between these two sorts of cows no difference was observed in the progesterone levels during the CIDR insertion period and at the subsequent estrus and luteal period.

In conclusion, the postpartum anestrous cows showed estrus less than 7 days after the removal of CIDR, in the treatment carried out by the '8 days' or '12 days' insertion, and especially the symptoms of estrus were concentrated on day 2 and 3 after the removal of CIDR. While, concerning conception rate in the cows with ovarian quiescence, there was no difference between the two sorts of insertion period, but in the cows with silent estrus the conception rates in cows treated with GnRH in the '8-day' group was higher than those in the '12-day' group. Hence the confirmation that the curative effects of the progesterone treatment applied with GnRH differed, depending on the ovarian findings.