

膣内挿入型プロジェステロンとホルモン製剤を併用した黒毛和種経産牛の発情同期化

安藤貴朗・上村俊一[†]・浜名克己

(家畜臨床繁殖学研究室)

平成14年8月1日 受理

Estrous Synchronization Using Intravaginal Progesterone with Other Hormones in Japanese Black Cows

Takaaki ANDO, Shunichi KAMIMURA[†] and Katsumi HAMANA

(Laboratory of Theriogenology)

キーワード：受胎率, 発情同期化, 黒毛和種, 排卵率, プロジェステロン

緒 言

近年, 発情同期化処置について多くの方法が報告されている^{3, 6, 8, 10}。発情同期化の目的としては, 繁殖業務の省力化, 発情発見率と受胎率の向上, 計画的な子牛生産, 過剰排卵処置および胚移植への応用^{1, 4}などがある。わが国では, 季節繁殖制をとらず周年繁殖のため, 処置後の受胎率向上を図り, 空胎期間を短縮することが最も大きな目的となっている。発情同期化の方法としては, PGF_{2α}の1回または2回投与³, ovsynch法^{8, 10}, プロジェステロン製剤の単独あるいは他のホルモン製剤との併用⁶などが多く用いられている。

今回, 膣内挿入型プロジェステロン製剤であるCIDR (Controlled Internal Drugs Releasing device) とPGF_{2α}, GnRH, Estradiol Benzoate (EB)を併用したときの発情発見率, 発情同期化率, 排卵率ならびに受胎率について調査した。

材 料 と 方 法

供試牛として, 鹿児島県内の7戸の肉牛牧場における黒毛和種経産牛142頭を用いた。それらの平均年齢は6.8±3.4歳 (平均±標準偏差), 4.6±3.2産, 分娩後の空胎期間は114.9±99.6日, 試験開始時のBody Condition Scoreは2.83±0.70 (5段階)であつ

た。供試牛は, いずれも臨床的に健康で生殖器に異常はなく, 一方CIDR挿入の初診時における直腸検査および膣検査から, 発情期にあると思われる症例は除外した。

試験は, 供試牛を4群に分けて行った。A群 (n=34): CIDR (CIDR-B, InterAg, Hamilton, New Zealand) 8日間挿入, B群 (n=54): CIDR 8日間挿入および挿入時 (Day 0) GnRH 100μg (スボルネン, デンカ製薬, 東京) 筋肉内注射 (筋注), C群 (n=20): B群においてCIDR除去後2日までに発情を示さなかったものに対して, Day 10にEB 1 mg (安息香酸エストラジオール, デンカ製薬, 東京)を筋注, D群 (n=34): CIDR 8日間挿入および挿入時にEB 2 mgの筋注と, さらにDay 9にEB 1 mgを筋注した。全頭に対し, CIDR除去1日前 (Day 7)にPGF_{2α} (動物用プロナルゴンF, ファルマシア, 東京)を25mg筋注した。人工授精は, A, B, C群では発情発見後12時間に, D群ではCIDR除去後48時間に定時人工授精を行った。

臨床検査は, CIDRの挿入日 (Day 0), 除去日 (Day 8), 除去後13日 (Day 21)の3回行った。検査項目は, 直腸検査による卵巣, 卵胞, 黄体の大きさの観察, 膣検査による外陰部および膣の発情徴候を観察するとともに, 尾静脈から採血を行い, 血中プロジェステロンとエストラジオール-17β濃度の測定を行った。

[†] 連絡責任者: 上村俊一 (鹿児島大学農学部家畜臨床繁殖学研究室), Tel/Fax (099)285-8737; E-mail: kamimura@vet.agri.kagoshima-u.ac.jp

牛群の発情観察は、CIDR 除去後にテールペイント（ディテール，サージミヤワキ，東京）を利用して1日2回行い，ペイントが半分以上剥離したものを発情ありとした。排卵の有無は，Day 21の直腸検査による黄体の確認および血中プロゲステロン濃度が1 ng/ml 以上の場合，排卵ありと判定した。また，CIDR 挿入中の GnRH 投与による排卵は，除去時の直腸検査による新しい黄体の存在により確認した。妊娠診断は，人工授精後45～60日の直腸検査により判定した。

血中性ステロイドホルモン濃度の測定は，田谷ら¹²⁾の方法により，2抗体RIAを用いて行った。また，CIDR 挿入の初診日において，直腸検査および血中プロゲステロン濃度により，卵巣に機能的黄体が存在する牛群と黄体のない牛群に分け，各項目を牛群ごとに検討した。

結果は，各群ごとにテールペイントによる発情発現率，排卵率ならびに受胎率について平均値を求め，また群間の平均値について *student's t-test* により検定を行った。

結 果

供試牛全体で，発情が誘起されたものは141/142頭（99.3%）であり，発情発現日は CIDR 除去後 2.4 ± 0.6 日となった。また，発情発現日は CIDR 除去後2日に97/141頭（68.8%），3日に34/141頭（24.1%），4日に8/141頭（5.7%）となり，2日間に92.9%が集中した（Fig. 1）。処置後の排卵率は117/142頭（82.4%），処置後の初回授精受胎率は58/134頭（43.3%）となった。発情が誘起された141頭のうち，7頭については管理上の都合により人工授精を見送り，その後の受胎率のデータからは除外した。

試験群ごとの成績を Table 1 に示した。各群間で

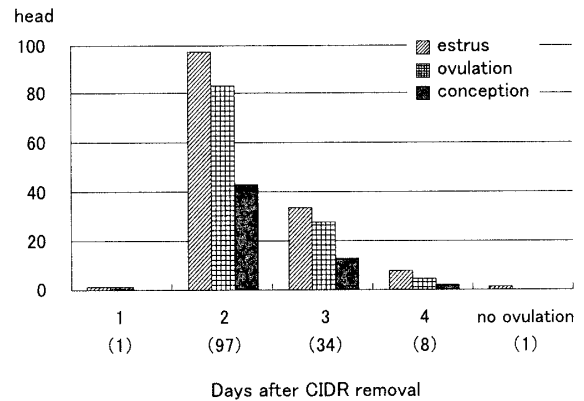


Fig. 1. Number of estrous cows, ovulations and conceived cows characterized by the days of estrus after CIDR removal in 141 cows

(): Number of estrous cows.

発情発現率に有意な差はみられなかった。しかし，発情発現日ではA，B，D群（ 2.2 ± 0.4 日， 2.3 ± 0.6 日， 2.1 ± 0.2 日）と比較し，C群は 3.3 ± 0.6 日と遅く，有意な差（ $p < 0.01$ ）がみられた。また，排卵率ではC群の70.0%と比較し，B群では88.9%と有意に高値を示した（ $p < 0.01$ ）。処置後の初回授精受胎率では，有意な差はみられなかったが，B群において最も高い受胎率（52.2%）が得られた。

処置開始時の黄体の有無は，直腸検査および血中プロゲステロン濃度により確認した。黄体の存在した牛群（101頭）では，各群ごとに発情発現率，排卵率，処置後初回授胎率に群間で有意な差はみられなかったが，D群で最も高い受胎率（50.0%）が得られた（Table 2）。黄体の存在しなかった牛群では，排卵率が黄体の存在した牛群と比較し，C群およびD群において低くなる傾向がみられた（C群：60.0%，91.7%，D群：70.0%，92.1%）。また，受胎率では黄体の存在しなかった牛群が黄体の存在した牛群と比較しA群（42.9%，35.0%），B群（50.0%，42.9%）では高くなるが，C群（20.0%，

Table 1. Number of estrous cows, ovulation and conception rates in respective groups subjected to different protocols for synchronization of ovulation

	Group A	Group B	Group C	Group D	Average
Number of cows	34	54	20	34	142
Number of estrous cows (%)	34 (100)	53 (98.1)	20 (100)	34 (100)	141 (99.3)
Day of estrous detection	2.2 ± 0.4^b	2.3 ± 0.6^b	3.3 ± 0.6^a	2.1 ± 0.2^b	2.4 ± 0.6
Number of cows ovulated (%)	30 (88.2)	48 (88.9) ^c	14 (70.0) ^d	25 (73.5)	117 (82.4)
Number of cows inseminated (%)	34 (100)	46 (85.2)	20 (100)	34 (100)	134 (94.4)
Number of cows conceived (%)	13 (38.2)	24 (52.2)	7 (35.0)	14 (40.9)	58 (43.3)

a, b) Day of estrous detection with different superscripts differs significantly ($p < 0.01$).

c, d) Number of cows ovulated with different superscripts differs significantly ($p < 0.01$).

Table 2. Number of estrous cows, ovulation and conception rates in respective groups characterized by the presence of functional corpus luteum (CL) at CIDR insertion

1) CL presence at CIDR insertion					
	Group A	Group B	Group C	Group D	Average
Number of cows	20	42	15	24	101
Number of estrous cows (%)	20 (100)	41 (97.6)	14 (91.7)	24 (100)	99 (98.0)
Number of cows ovulated (%)	18 (90.0)	39 (92.9)	14 (91.7)	22 (92.1)	93 (92.1)
Number of cows conceived (%)	7 (35.0)	18 (42.9)	6 (40.0)	12 (50.0)	43 (42.6)
2) CL absence at CIDR insertion					
	Group A	Group B	Group C	Group D	Average
Number of cows	14	12	5	10	41
Number of estrous cows (%)	14 (100)	12 (100)	5 (100)	10 (100)	41 (100)
Number of cows ovulated (%)	11 (78.6)	10 (83.3)	3 (60.0)	7 (70.0)	31 (75.6)
Number of cows conceived (%)	6 (42.9)	6 (50.0)	1 (20.0)	2 (20.0)	15 (36.6)

There is no significant difference among the cow groups in the number of estrous cows, number of cows ovulated and number of cows conceived.

Table 3. Number of estrous cows, ovulation and conception rates in groups B and C by the presence of CL at CIDR insertion, and the induction of ovulation after GnRH injection at CIDR insertion

Group B : CIDR+GnRH				
Number of cows	54			
CL presence at CIDR insertion	yes 42		no 12	
Ovulation after GnRH injection	yes 8	no 34	yes 3	no 9
Number of estrous cows (%)	8(100)	33(97.1)	3(100)	9(100)
Number of cows ovulated (%)	8(100)	29(85.3)	3(100)	7(77.8)
Number of cows conceived (%)	4(50.0)	14(41.2)	1(33.3)	5(55.6)
Group C : CIDR+GnRH+EB				
Number of cows	20			
CL presence at CIDR insertion	yes 14		no 6	
Ovulation after GnRH injection	yes 3	no 11	yes 2	no 4
Number of estrus cows (%)	3(100)	11(100)	2(100)	4(100)
Number of cows ovulated (%)	3(100)	8(72.7)	2(100)	1(25.0)
Number of cows conceived (%)	0(0)	5(45.4)	2(100)	0(0)

There is no significant difference in the number of estrous cows, number of cows ovulated and number of cows conceived in groups B and C.

40.0%) , D群 (20.0%, 50.0%) では低くなった。

CIDR 挿入時に GnRH を投与したところ, B群では11/54頭 (20.4%), C群では5/20頭 (25.0%) が排卵し, 副黄体が形成された (Table 3)。CIDR 挿入中における排卵の有無による成績では, C群において副黄体の形成がみられなかった牛で, 副黄体の形成がみられた牛に比べ CIDR 除去後の排卵率

の低下がみられた (9/15頭 60%, 5/5頭 100%)。また, 処置後の受胎率では, B群およびC群で有意な差はみられなかった。

血中性ステロイドホルモン濃度の変化を Fig. 2 に示した。全体として, 血中プロジェステロンおよびエストラジオール-17β濃度の平均値に, 牛群および処置日において有意差はみられなかった。血中

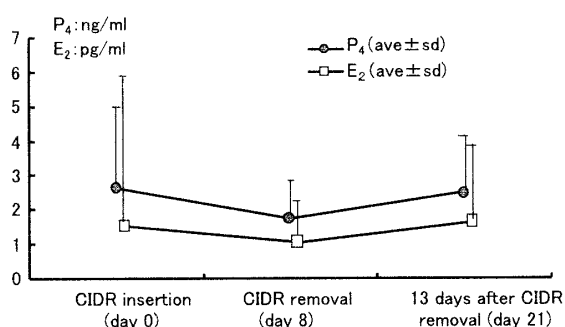


Fig.2. Changes of plasma progesterone and estradiol-17 β concentrations at CIDR insertion (day0), CIDR removal (day8) and 13 days after CIDR removal (day 21) in all cows (n=142).

There is no significant difference in progesterone and estradiol-17 β concentrations at the days of treatment.

プロゲステロン濃度は、CIDR 除去時も1.7ng/mlと高値を示し、CIDR による高プロゲステロン環境が確認された。また、血中エストロジオール-17 β 濃度は、除去時には1.0pg/mlと低濃度となった。

考 察

本研究では、CIDR 除去後141/142頭 (99.3%)と高率に発情が誘起された。Lane ら⁷⁾は、プロゲステロン製剤 (PRID) を5日間処置して除去後24時間でEB 0.5mgを投与すると95.6%、非投与群では88.9%が発情を示したと報告している。Martinez ら⁹⁾は、CIDR 挿入時のGnRH 100 μ g投与は挿入時のEB 1 mgの投与に比べ発情発現率が低下する(GnRH群:55%、EB群:100%)と報告している。しかし、本研究では、CIDR 挿入時のGnRH 100 μ gとEB 2 mgの投与群の間には発情発現率に有意な差はみられなかった(GnRH群(B+C群):98.9%、EB群(D群):100%)。また、GnRH投与よりEB投与のほうがCIDR 除去後に、より自然な発情が得られるという報告もある⁸⁾。本研究では、テールペイントを利用して管理者のスタンディング発情の見逃しの機会を少なくしたが、その状況でも発情発現率に有意な差はみられなかった。

本研究では、C群の発情発現日が3.3 \pm 0.6日と他の群に比べ約1日の延長がみられた。これは、C群はB群において2日経過しても発情を示さない牛に対してEB 1 mgの投与を行ったため、CIDR 処

置後の無発情牛に発情を誘起した結果と考えられる。Hanlon ら⁵⁾は、CIDRの12日間挿入では5頭の平均で除去後44時間に発情がみられ、除去後24時間にEB 0.5mgを投与すると7頭の平均で40時間後に発情がみられたと報告している。これは、本研究の成績と同様の結果であった。

試験群別の初回授精受胎率は、A群(CIDR+PG)38.2%、B群(CIDR+GnRH+PG)52.2%、C群(CIDR+GnRH+PG+EB)35.0%、D群(CIDR+EB+PG+EB)40.9%となった。Ryan ら¹¹⁾は、本研究と同様のプロトコールでCIDRを用いたところ、CIDR+PG 46.6%、CIDR+GnRH+PG 57.9%、CIDR+EB+PG群60.5%の受胎率が得られたと報告し、特にEB投与群で本研究より高い受胎率を示している。今回は、D群では除去後48時間の定時人工授精としたが、これはちょうど発情の開始時期に定時人工授精したことになり、排卵時間とのずれにより受胎率が低下したと考えられる。

CIDR 挿入時に、卵巣に機能的黄体が存在した牛(発情回帰中)と存在しなかった牛(卵巣静止あるいは発情期)では、黄体の存在しなかった牛で排卵率の低下する傾向がみられた(黄体あり:92.1%、黄体なし:75.6%)。また黄体のない牛では、C群、D群の受胎率(20.0%、20.0%)が低下した。しかしBridges ら²⁾は、試験開始時の黄体の有無による受胎成績に差はみられない(平均54%)と報告している。

CIDR 挿入時にGnRH 100 μ gを投与したB群、C群では、16/74頭(B群11/54頭、C群5/20頭)でCIDR 挿入中に排卵がみられ、副黄体が形成された。Xu ら¹³⁾は、GnRHをCIDR 挿入時に投与すると排卵、または新しい卵胞波の出現がみられ、処置後4日での血中プロゲステロン濃度の上昇がみられると報告している。またGouveia ら⁴⁾は、過剰排卵処置前の発情同期化でCIDR 挿入時にGnRHを投与したところ、7/8頭で排卵がみられたと報告している。GnRH投与での排卵は、CIDR 挿入時に卵巣に存在する卵胞のLHレセプターの有無と関連がみられ、GnRHで排卵がみられなかった牛では処置後の排卵率も低くなっている。これらのことから、CIDR 挿入時のGnRH投与で排卵がみられない牛は、優勢卵胞にLHレセプターが少ないか、あるいは優勢卵胞そのものが存在しなかった可能性が示唆された。

本研究では、CIDR 挿入時、除去時、除去後13日

に採血を行い、血中ホルモン動態を調べた。CIDR挿入と除去1日前のPGF_{2α}投与で、血中エストラジオール-17β濃度のピーク(22.7±2.5pg/ml)は除去後1日でみられたとの報告³⁾がある。本研究では、除去時の血中エストラジオール-17β濃度は低く(1.02±1.24pg/ml)、その後の発情発現に伴い急激な上昇が起こるものと推測された。

要 約

黒毛和種経産牛において、CIDRと他のホルモン製剤を併用して発情の同期化処置を行った。CIDR処置は、様々な発情周期のステージにある142頭の牛に行った(挿入日=Day 0)。供試牛は4つのグループに分け、A群(n=34):CIDR 8日間挿入、B群(n=54):CIDR 8日間挿入および挿入時GnRH 100μgの筋注、C群(n=20):B群においてCIDR除去後2日までに発情を示さなかったものに対して、Day 10にEB 1 mgを筋注、D群(n=34):CIDR 8日間挿入および挿入時にEB 2 mg筋注と、さらにDay 9にEB 1 mg筋注した。全頭に対し、CIDR除去1日前(Day 7)にPGF_{2α}を25 mg筋注した。臨床検査は、CIDRの挿入日(Day 0)、除去日(Day 8)、除去後13日(Day 21)の3回行った。検査項目は、直腸検査、膣検査、血中プロゲステロン(P₄)とエストラジオール-17β(E₂)濃度を測定した。供試牛全体で、発情が誘起されたものは141/142頭(99.3%)であった。また、発情発現日はCIDR除去後2日に68.8%、3日に24.1%となった。排卵が誘起されたのは117/142頭(82.4%)で、受胎したのは58/134頭(43.3%)だった。B群は高い受胎率24/46(52.2%)を示した。CIDR除去から発情までの間隔は、A、B、C、D群でそれぞれ2.2±0.4日、2.3±0.6日、3.3±0.6日、2.1±0.2日となり、C群で有意な差がみられた。CIDR挿入時の黄体の有無による分類では、発情発現率、排卵率、受胎率に有意な差はみられなかった。血中P₄およびE₂の濃度は、Day 0、8、21で有意な差はみられなかった。本研究の結果から、CIDRとPGF_{2α}の投与により高い発情同期化率および排卵率が得られた。CIDR挿入時にGnRHを併用することにより、受胎率が向上した。発情発現と処置開始時の黄体の有無により、併用するホルモン剤の種類と投与時期を検討する事で、受胎率の向上が見込まれる。

謝辞:ホルモン測定に際して貴重な第1抗体(progesterone GDN337, Estradiol-17β GDN244)を提供して頂いた、Colorado State UniversityのDr. G.D. Niswenderに深謝するとともに、供試薬剤を提供して頂いた家畜改良事業団(CIDR)、デンカ製薬(GnRH)、ファルマシア(PGF_{2α})およびサージミヤワキ株式会社(テールペイント)に深く感謝する。また、快く供試牛の提供を賜った鹿児島県内肥育農家の宮路牧場、山口牧場、川上牧場、新地牧場、川畑牧場、西ノ原牧場の方々、ならびに鹿児島大学農学部附属入来牧場に謝意を表す。本論文をまとめるにあたり、ご校閲を賜った鹿児島大学農学部阿久沢正夫教授に深謝する。本研究の一部は、文科省科学研究費補助金(課題番号 11836008, 代表 上村俊一)

文 献

- 1) Bo, G. A., Adams, G. P., Pierson, R. A. and Maplettoft, R. J.: Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, **43**, 31-40 (1995)
- 2) Bridges, P. J., Lewis, P. F., Wangner, W. R. and Inskeep, E. K.: Follicular growth, estrus and pregnancy after fixed-time insemination in beef cows treated with intravaginal progesterone inserts and estradiol benzoate. *Theriogenology*, **53**, 573-583 (1999)
- 3) Burke, J. M., Hampton, J. H., Staples, C. R. and Thatcher, W. W.: Body condition influences maintenance of a persistent first wave dominant follicle in dairy cattle. *Theriogenology*, **49**, 751-760 (1998)
- 4) Gouveia, M. F., Barros, J. P., Teixeira, A. B., Trinca, L. A. and D'Occhio, M. J.: Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology*, **57**, 1625-34 (2002)
- 5) Hanlon, D. W., Williamson, N. B., Wichtel, J. J., Steffert, I. J. and Craigie, A. L.: Ovulatory responses and plasma luteinizing hormone concentrations in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone and estradiol benzoate. *Theriogenology*, **47**, 963-975 (1997)
- 6) Lamb, G. C., Stevenson, J. S., Kesler, D. J., Garverick, H. A., Brown, D. R. and Salfen, B. E.: Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2 alpha for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J. Anim. Sci.*, **79**, 2253-2259 (2001)
- 7) Lane, E. A., Austin, E. J., Roche, J. F. and Crowe, M. A.: The effect of estradiol benzoate on synchrony of estrus and fertility in cattle after removal of a progesterone-releasing intravaginal device. *Theriogenology*, **55**, 1807-1818 (2001)

- 8) Martinez, M. F., Kastelic, J. P., Adams, G. P., Cook, B., Olson, W. O. and Mapletoft, R. J. : The use of progestins in regimen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Theriogenology*, **57**, 1049-1059 (2002)
- 9) Martinez, M. F., Kastelic, J. P., Adams, G. P., Janzen, E., McCarthy, D. H. and Mapletoft, R. J. : Estrus synchronization and pregnancy rates in beef cattle given CIDR-B, prostaglandin and estradiol, or GnRH. *Can. Vet. J.*, **41**, 786-790 (2000)
- 10) Moreira, F., Risco, C., Pires, A. F. M., Ambrose, D. J., Drost, M., DeLorenzo, M. and Thatcher, W. W. : Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. *Theriogenology*, **53**, 1305-1319 (2000)
- 11) Ryan, D. P., Snijders, S., Yaskub, 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)
- 12) 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)
- 13) Xu, Z. Z., Verkerk, G. A., Mee, J. F., Morgan, S. R., Clark, B. A., Burke, C. R. and Burton, L. J. : Progesterone and follicular changes in postpartum noncyclic dairy cow after treatment with progesterone and estradiol or with progesterone, GnRH, PGF $_{2\alpha}$, estradiol. *Theriogenology*, **54**, 273-282 (2000)

Summary

Estrous synchronization using a Controlled Internal Drug Releasing device (CIDR) with other hormone injections was determined in Japanese black cows. The CIDR was inserted intravaginally (Day 0), at any stage of the estrous cycle in 142 cows. Cows were randomly allocated to receive either no further treatment (Group A: n = 34); 100 μ g of GnRH injected on Day 0 (Group B: n = 54); 100 μ g of GnRH injected on Day 0 and 1mg of estradiol benzoate (EB) injected on Day 10, if they showed no estrus until Day 10 (Group C: n = 20); 2mg of EB injected on Day 0 and 1mg of EB injected on Day 9 (Group D: n = 34). All cows received 25mg of PGF_{2 α} injection on Day 7, and the CIDR was removed on Day 8. Clinical examinations, rectal palpation, vaginal examination and blood collection were performed on Days 0, 8 and 21. Blood samples were collected to measure concentrations of progesterone (P₄) and estradiol-17 β (E₂) by the RIA. Estrus was induced in 141/142 cows (99.3%). Estrus was concentrated on Days 2 and 3 after CIDR removal (68.6%, 24.3%). Induction of ovulation was found in 117/142 (82.4%), and conception in 58/134 (43.3%). Group B showed the highest conception rate (52.2%). Intervals, in days from CIDR removal to estrus were 2.2 \pm 0.4, 2.3 \pm 0.6, 3.3 \pm 0.6, 2.1 \pm 0.2 in Groups A, B, C and D respectively, and a significant difference was shown in Group C. Induction of estrus, ovulation and conception rates in cows characterized by the presence of CL at CIDR insertion were not significantly different. Plasma concentrations of P₄ and E₂ were not significantly different at Days 0, 8 and 21. The results of this study lead to the conclusion that CIDR and PGF_{2 α} injection the day before CIDR removal are effective as a way to improve estrous synchronization and ovulation rate. Furthermore, CIDR with GnRH injection at the same time is effective in improving conception rates, although this combination and timing of hormone injection depends on the estrous condition and presence of CL improve the conception rate.

Key words: progesterone, estrous synchronization, ovulation rate, conception rate, Japanese black cow