

称号及び氏名	博士（獣医学）坂瀬 充洋
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 3 1 日
論文名	「分娩後早期の黒毛和種牛におけるプロゲステロン放出腔内留置製剤を併用する排卵同期化・定時人工授精法の受胎促進効果に関する研究」
論文審査委員	主査 玉田 尋通 副査 稲葉 俊夫 副査 中村 洋一 副査 川手 憲俊

論文要旨

緒言

国内の肉用牛の分娩間隔は平均 420 日と報告されており、目標とされている一年一産から大幅に延長している。この背景には、飼育頭数の多頭化や飼育者の高齢化などにより、発情検査などの繁殖管理時間が十分に確保できないことが挙げられる。その結果、適期に人工授精や胚移植を行えず、受胎率が低下すると推察される。

近年、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) とプロスタグランジン (PG) $F_{2\alpha}$ を組み合わせて排卵を一定の狭い時間帯に誘起し、発情を検査せずに定時に人工授精を実施する、Ovsynch法などの排卵同期化・定時人工授精法が乳用牛および肉用牛で活用されはじめている。しかし、Ovsynch法では発情周期の後半や卵巣の静止している時期にホルモン処置を開始すると、受胎率は低下することが報告されており、その改善が必要と考えられる。

プロゲステロン放出腔内留置製剤 (Controlled intravaginal drug-releasing device; CIDR) は、その留置により、確実に血中プロゲステロン濃度を上昇させ、かつ高い濃度を維持することができる。分娩後早期で授乳中の肉用牛では、卵巣の静止する個体が多いので、Ovsynch法にCIDRを併用することにより、受胎率の低下を改善できる可能性が予測される。

本研究では、黒毛和種牛の繁殖効率を改善するため、CIDR を併用する排卵同期化・定時人工授精法を分娩後早期に適用し、その受胎率を従来の Ovsynch 法と比較・検討した。また、それらのホルモン処置の作用機構について内分泌学的な解析を行った。さらに、CIDR を併用する排卵同期化法の定時胚移植への応用を試みた。

第 1 章 分娩後早期に CIDR を併用する排卵同期化・定時人工授精法で処置した黒毛和種牛の受胎成績および受胎に影響する因子の検討

分娩後早期で授乳中の黒毛和種牛において、Ovsynch 法に CIDR を併用する排卵同期化・定時人工授精法 (Ovsynch+CIDR 法)、および、エストラジオールを CIDR の挿入時に投与し、抜去後に GnRH

を投与する方法 (EB+CIDR+GnRH 法) の受胎率を従来の Ovsynch 法と比較・検討した。また、それらのホルモン処置の作用機構と受胎との関連について、主に内分泌学的に解析することを試みた。さらに、エネルギーバランスの指標として用いられている血中インスリン様成長因子(IGF)-I 濃度と受胎成績および血中性ステロイドホルモン濃度の関連について検討した。

第1節 Ovsynch 法あるいは CIDR 併用の排卵同期化法で処置した黒毛和種牛の受胎率および血中性ステロイドホルモン濃度の動態

分娩後 1~2 か月で授乳中の黒毛和種牛を 3 群に分け、以下の 3 種類の排卵同期化処置を開始した (0 日目)。Ovsynch 群には Ovsynch 法 (0 日目 ; GnRH、7 日目 ; PGF_{2α}、9 日目 ; GnRH) を実施した。CIDR 併用法は、Ovsynch 法に加えて 0 日目から 7 日間 CIDR を腔内に留置する Ovsynch+CIDR 群および Ovsynch+CIDR 法の 1 回目の GnRH の代わりにエストラジオールベンゾエート (EB) を投与する EB+CIDR+GnRH 群の 2 群を設けて実施した。いずれの群も 9 日目の GnRH 投与後約 20 時間目 (10 日目) に人工授精を実施した。排卵同期化のホルモン処置開始の 1 週間前から人工授精後の 3 週間目まで採血し、血中プロゲステロンおよびエストラジオール-17β 濃度を測定した。

Ovsynch+CIDR 群および EB+CIDR+GnRH 群の受胎率 (それぞれ 70% および 71%) は、Ovsynch 群 (45%) に比較して、有意に高い値を示した。CIDR 合併群 (CIDR を併用する両群を合併した群) の 7 日目の血中プロゲステロン濃度は、Ovsynch 群に比較して、有意に高く、CIDR 合併群の 7 日目の血中エストラジオール-17β 濃度は、Ovsynch 群に比較して、有意に低い値を示した。Ovsynch 群の不受胎牛の 7 日目の血中エストラジオール-17β 濃度は、全合併群 (3 つの処置群を合併した群) の受胎牛に比較して、有意に高く、9 日目の同ホルモン濃度は、有意に低い値を示した。

以上の成績から、分娩後早期で授乳中の黒毛和種牛において、CIDR を併用する排卵同期化・定時人工授精法は Ovsynch 法に比べて高い受胎率の得られることが判明した。この理由の一つとして、CIDR 併用法は血中プロゲステロン濃度を高く維持できるため Ovsynch 法の不受胎牛にみられる卵胞の早期成熟を抑制できることが示唆された。

第2節 Ovsynch 法あるいは CIDR 併用法による排卵同期化処置中の血中 IGF-I 濃度と受胎成績との関係

本節では、前節で採取した血中の IGF-I 濃度を測定し、定時人工授精の受胎成績および血中性ステロイドホルモン動態との関連について検討した。その結果、-7、0 および 7 日目の血中 IGF-I 濃度の低い牛においては、CIDR 合併群の受胎率 (63~67%) は Ovsynch 群 (25~33%) に比較して有意に高くなったが、同濃度の高い牛では CIDR 合併群 (73~79%) と Ovsynch 群 (67~78%) の受胎率の差は生じなかった。Ovsynch 群で 0 日目の血中 IGF-I 濃度の低い牛の血中エストラジオール-17β 濃度は 7 日目から 9 日目までは変化しないが、同群の血中 IGF-I 濃度の高い牛および CIDR 合併群では、血中エストラジオール-17β 濃度は 7 日目から 9 日目へと有意に増加した。

以上の成績から、処置開始時の血中 IGF-I 濃度が低い分娩後早期の黒毛和種牛に定時人工授精を行う際に、CIDR 併用法は Ovsynch 法に比べて、受胎率を向上させる可能性が示唆された。その向上は、血中 IGF-I 濃度の低い Ovsynch 処置牛でみられる時期尚早の卵胞成熟を CIDR で防止することに起因すると考えられた。

第2章 分娩後早期の黒毛和種牛における CIDR を併用する排卵同期化・定時人工授精法の受胎促進機構の解明

本章では、CIDR 併用法による受胎促進機構を解明するため、発情周期の後半に排卵同期化処置を開始した場合における CIDR 併用法の人工授精前排卵の防止効果について検討した。さらに、分娩後早期で卵巣の静止した状態における CIDR 併用法の処置後黄体期での黄体退行因子産生に及ぼす抑制効果について検討した。

第1節 CIDR併用法による定時人工授精前の排卵防止

発情日から16日目に第1章と同様の排卵同期化・定時人工授精法を実施した。処置開始日(0日目)から10日目まで連日血液を採取し、血中プロゲステロンおよびエストラジオール-17 β 濃度を測定した。その結果、Ovsynch群の血中プロゲステロン濃度は5日目以降に基底値まで減少した。一方、CIDR併用の両群の同ホルモン濃度は7日目まで高い値を維持し、8日目以降に基底値まで減少した。血中エストラジオール-17 β 濃度のピークは、Ovsynch群では8日目に、CIDR併用の両群では9日目にみられた。Ovsynch群では10日目に、一方、CIDR併用の両群では11日目に排卵が確認された。

以上の成績から、黄体退行の数日前にOvsynch法の処置を開始すると、定時人工授精前に排卵することが明らかになった。CIDR併用法を用いると、黄体が退行しても、血中プロゲステロン濃度はCIDR抜去時まで高く維持されることにより、卵胞の早期成熟は抑制され、排卵は人工授精後の適期に起こることが判明した。

第2節 CIDR併用法による黄体退行因子産生の抑制

分娩後早期で卵巣の静止した黒毛和種牛を3群に分けて排卵同期化処置を行った。24日目に子宮からのPGF_{2 α} 放出を促進するオキシトシンを投与し、投与前後の血中13,14-ジヒドロ-15-ケト-PGF_{2 α} (PGFM)濃度を測定した。血中PGFM濃度は3群ともオキシトシン投与の15分後に急激に増加し、その後減少した。Ovsynch+CIDR群の血中PGFM濃度は、Ovsynch群のそれと比較して、投与の45分前と30分~120分後に有意に低い値を示した。EB+CIDR+GnRH群の血中PGFM濃度は、Ovsynch群のそれと比較して、オキシトシン投与の75分後に有意に低い値を示した。Ovsynch+CIDR群の血中プロゲステロン濃度は、Ovsynch群と比較して、1日目から7日目まで、ならびに27日目および29日目に有意に高い値を示した。また、EB+CIDR+GnRH群の同ホルモン濃度は、Ovsynch群と比較して、1日目から5日目まで、ならびに27日目および29日目に有意に高い値を示した。

以上の成績から、分娩後早期で卵巣の静止した黒毛和種牛にCIDR併用法を用いると、処置後の黄体期におけるPGF_{2 α} 放出が抑制され、Ovsynch法でみられる早期の黄体退行を防止できることが示唆された。

第3章 Ovsynch法にCIDRを併用する排卵同期化法の定時胚移植への応用

本章では、Ovsynch法にCIDRを併用する排卵同期化・定時胚移植法の受胎成績と血中性ステロイドホルモンの動態について、一般的な発情同期化法であるPGF_{2 α} 単回投与と比較した。

分娩後1~2か月で授乳中の黒毛和種牛を2群に分けた。PG群にはPGF_{2 α} の単回投与による発情同期化を実施した。すなわち、10日間隔で牛の直腸検査を行い、機能的黄体の認められた場合にPGF_{2 α} 類

似体を投与し、その後5日間発情行動を観察し、発情（発情日を0日目）後7日目に胚移植を行った。Ovsynch+CIDR群には、前述のOvsynch+CIDR法を実施し、2回目のGnRH投与（2回目GnRH投与日を0日目）後7日目に胚移植を実施した。Ovsynch+CIDR群の排卵同期化率はPG群の発情同期化率に比べて有意に高い値を示した。妊娠率（受胎／処置頭数）については両群間で有意差はみられなかった。血中プロゲステロンおよびエストラジオール-17 β 濃度については、いずれの時点においても両群間で有意差はみられなかった。

以上の成績から、分娩後早期の黒毛和種牛におけるOvsynch法にCIDRを併用する排卵同期化・定時胚移植法は、従来のPGF_{2 α} 投与による発情同期化法と、同等の受胎成績と卵胞成熟・黄体発育を示すことが判明した。

総括

本研究では、分娩後早期で授乳中の黒毛和種牛において、CIDRを併用する排卵同期化・定時人工授精法の受胎成績を、従来のOvsynch法と比較・検討した。また、それらのホルモン処置の作用機構と受胎との関連について調べた。さらに、CIDRを併用する排卵同期化法の定時胚移植への応用を試みた。その結果、以下のことが明らかになった。

1. 分娩後早期で授乳中の黒毛和種牛にCIDRを併用する排卵同期化・定時人工授精法（Ovsynch+CIDR法とEB+CIDR+GnRH法）を行うと、Ovsynch法に比較して、受胎率は顕著に向上する。
2. CIDR併用法は血中プロゲステロン濃度を高く保つことにより、Ovsynch法の不受胎牛にみられる卵胞の早期成熟を抑制できるものと考えられた。
3. 排卵同期化処置開始時の血中IGF-I濃度の低い分娩後早期の黒毛和種牛においては、CIDR併用法を行うと、Ovsynch法に比べて、受胎率は高くなることが判明した。
4. 発情周期後半で黄体の退行する数日前にOvsynch法のホルモン処置を開始すると、排卵は定時人工授精前に生じるが、CIDR併用法では、そのような人工授精前の排卵を防止でき、なおかつ排卵時期を人工授精後の適期に是正できることを明らかにした。
5. 分娩後早期で卵巣の静止した黒毛和種牛にCIDR併用法を用いると、処置後の黄体期におけるPGF_{2 α} 放出が抑制され、Ovsynch法で生じる短命黄体を防止できることが示された。このことから、卵巣の静止した牛に対するCIDR併用法の実施は、黄体機能維持を介して、受胎を促進する可能性が示唆された。
6. 分娩後早期の黒毛和種牛では、Ovsynch+CIDR法を用いた定時胚移植により、PGF_{2 α} 製剤による発情同期化法と同等の受胎成績と卵胞成熟・黄体発育の得られることが明らかになった。

審査結果の要旨

肉用牛の分娩間隔は、目標とされている一年一産から大幅に延長している。この背景には、飼育数の多頭化や飼育者の高齢化などにより、発情検査などの繁殖管理時間が十分に確保できないことが挙げられる。その結果、適期に人工授精や胚移植を行えず、受胎率が低下すると推察される。

近年、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) とプロスタグランジン (PG) $F_{2\alpha}$ を組み合わせて排卵を一定の時間帯に誘起し、発情を検査せずに定時に人工授精を実施する排卵同期化・定時人工授精法 (Ovsynch法) が、乳用牛および肉用牛で活用されはじめている。しかし、Ovsynch法では発情周期の後半や卵巣の静止している時期にホルモン処置を開始すると、受胎率は低下することが報告されており、その改善が必要と考えられる。

プロジェステロン放出腔内留置製剤 (Controlled intravaginal drug-releasing device; CIDR) は、その留置により、確実に血中プロジェステロン濃度を上昇させ、かつ高い濃度を維持することができる。分娩後早期で授乳中の肉用牛では、卵巣の静止する個体が多いので、Ovsynch法にCIDRを併用することにより、受胎率の低下を改善できる可能性が予測される。

本研究では、黒毛和種牛の繁殖効率を改善するため、CIDR を併用する排卵同期化・定時人工授精法を分娩後早期に適用し、その受胎率を従来の Ovsynch 法と比較・検討した。また、それらのホルモン処置の作用機構について、内分泌学的な解明を行った。さらに、CIDR を併用する排卵同期化法の定時胚移植への応用を試みた。以下に研究成果の概要を示す。

1. 分娩後早期で授乳中の黒毛和種牛に CIDR を併用する排卵同期化・定時人工授精法 (Ovsynch+CIDR 法とエストラジオールベンゾエート+CIDR+GnRH 法) を行うと、Ovsynch 法に比較して、受胎率は顕著に向上した。
2. CIDR 併用法は血中プロジェステロン濃度を高く保つことにより、Ovsynch 法の不受胎牛にみられる卵胞の早期成熟を抑制できるものと考えられた。
3. 排卵同期化処置開始時の血中インスリン様成長因子- I 濃度の低い分娩後早期の黒毛和種牛においては、CIDR 併用法を行うと、Ovsynch 法に比べて、受胎率は高くなることが判明した。
4. 発情周期後半で黄体の退行する数日前にOvsynch法のホルモン処置を開始すると、排卵は定時人工授精前に生じるが、CIDR併用法では、そのような人工授精前の排卵を防止でき、なおかつ排卵時期を人工授精後の適期に是正できることを明らかにした。
5. 分娩後早期で卵巣の静止した黒毛和種牛にCIDR併用法を用いると、処置後の黄体期における $PGF_{2\alpha}$ 放出が抑制され、Ovsynch法で生じる短命黄体を防止できることが示された。このことから、卵巣の静止した牛に対するCIDR併用法の実施は、黄体機能維持を介して、受胎を促進する可能性が示唆された。

6. 分娩後早期の黒毛和種牛では、Ovsynch+CIDR法を用いた定時胚移植により、PGF_{2α}製剤による発情同期化法と同等の受胎成績と黄体機能の発達を示すことが明らかになった。

以上の研究から、分娩後早期で授乳中の黒毛和種牛において、プロジェステロン放出腔内留置製剤を併用する排卵同期化法は定時人工授精の受胎率を向上させることが明らかになり、その機序の一部が解明された。さらに、同排卵同期化法は定時胚移植にも応用できることが判明した。これらの研究成果は、今日、繁殖成績の低迷がみられる肉用牛の生産現場において、空胎期間を短縮し、繁殖効率を向上する実用的な技術を提供することから、獣医繁殖学における繁殖機能の人為調節分野の発展に大きく貢献するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。