

【原 著】 産業動物

プロスタグランジンF_{2α}製剤を24時間間隔で2回投与したホルスタイン種搾乳牛における血中プロジェステロン濃度の動態と受胎性について

星 恵理子¹⁾ 布施 勝利¹⁾ 水島 仁士¹⁾ 江原 和則¹⁾
 黒沢 重人¹⁾ 山村文之介¹⁾ 高橋 英二¹⁾ 三浦亮太郎²⁾
 山元 真³⁾ 米山 修³⁾ 松井 基純⁴⁾

1) 十勝NOSAI (〒089-1182 帯広市川西町基線59番地28)

2) 日本獣医生命科学大学 (〒180-8602 武蔵野市境南町1-7-1)

3) ゴエティス・ジャパン株式会社 (〒151-0053 渋谷区代々木3丁目22-7)

4) 帯広畜産大学 (〒080-8555 帯広市稲田町西2線11)

要 約

プロスタグランジン(PG)F_{2α}投与後の妊娠率の向上を目的に、PGF_{2α}投与回数^が、血中プロジェステロン(P₄)動態および受胎性に及ぼす影響を調べた。供試牛を無作為に、PGF_{2α}15 mgを1回投与する試験区(1回投与区:n=25)と24時間間隔で2回投与する試験区(2回投与区:n=47)に分けて、血中のP₄動態を2区間で比較したところ、PGF_{2α}投与後2日および3日目で2回投与区のP₄濃度が有意に減少した(P<0.05)。さらにPGF_{2α}投与後2日目に血中P₄濃度が0.5 ng/ml未満となったものを完全黄体退行と定義したところ、投与後2日目に完全黄体退行を示す牛の割合は、1回投与区が56.0% (n=14/25)、2回投与区が80.9% (n=38/47)だった。全供試牛を完全黄体退行(P₄<0.5 ng/ml)あるいは不完全黄体退行(P₄≥0.5 ng/ml)に区分し比較した結果、完全黄体退行した場合の妊娠率は30.8% (n=16/52)となり、不完全黄体退行であった場合の15.0% (n=3/20)より高い傾向を示した。以上のことから、PGF_{2α}を2回投与することにより、投与後2日目に完全黄体退行(P₄<0.5 ng/ml)を示す個体を増やすことが可能であり、受胎性向上をもたらす可能性が示された。

キーワード：プロスタグランジンF_{2α}、2回投与、血中プロジェステロン濃度

-----北獣会誌 60, 279~283 (2016)

現在、不受胎牛や発情を示さない搾乳牛に対して行う発情誘起法や発情および排卵同期化処置法は、多数報告されている。著者らの診療業務ではプロスタグランジン(PG)F_{2α}の単回投与による発情誘起が一般的であるが、その効果の向上が求められる。

PGF_{2α}投与に関しては、投与後の不十分な黄体退行は受胎率低下の要因となるとされ、定時授精法のオプションでPGF_{2α}投与後の性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)投与時において、血中プロジェステロン(P₄)濃度が十分に低下していない不十分な黄体退行を示した個体は、受胎率が低いことが示されている^[1,2]。これま

で、完全な黄体退行を誘起するために、PGF_{2α}の投与方法に関する研究が実施され、投与量の増量あるいは投与回数を増やすことで、血中P₄濃度が十分に低下することが示されている^[2-4]。

以上のことから、PGF_{2α}投与の方法が、黄体退行およびその後の受胎性に影響を及ぼすことが推察される。本研究では、PGF_{2α}の投与回数が黄体退行と受胎性に及ぼす影響を調べるために、PGF_{2α}の2回投与が血中P₄濃度動態に与える効果と黄体退行状況が受胎に及ぼす影響を調査したので、その概要を報告する。

連絡責任者：星 恵理子 十勝NOSAI南部事業所家畜診療センター

〒089-2106 広尾郡大樹町下大樹180-1

TEL 01558-6-2141 FAX 01558-6-2034 E-mail: nanbu001@tokachi-nosai.or.jp

材料および方法

(1) 供試牛

平成25年10月～26年10月までの13カ月間に、A農場(搾乳牛頭数70頭、タイストール繋留、経産牛年間乳量11,500 kg/頭、給餌はTMRセンター利用)で月2回実施した繁殖検診において、超音波画像診断装置(HONDA HS-101V:本多電子、豊橋)を用いて、直径25 mm以上の黄体が確認されたホルスタイン種搾乳牛76頭を供試牛とした。

(2) PGF_{2α}投与方法

全供試牛76頭を無作為に1回投与区と2回投与区に分け、1回投与区は検診当日にPGF_{2α}15 mgを1回、2回投与区は検診当日と24時間後に15 mgずつ計2回筋肉内注射した。PGF_{2α}は全て動物用プロナルゴンF(トロメタミンジノプロスト:ゾエティス・ジャパン、東京)を使用し、PGF_{2α}の投与量は十勝NOSAIの卵巣疾患損害防止対策事業で採用している15 mg投与とした。血液サンプルはPGF_{2α}投与前(Day 0)と投与1、2および3日後(Day 1、2および3)の計4回、ヘパリンナトリウム入り真空採血管を用いて採材し、血漿分離後凍結保存したものを、後日、EIA法により血中P₄濃度測定を行った(図1)。

(3) 発情診断、人工授精および妊娠診断

全てのPGF_{2α}投与牛は、概ね4日以内に直腸検査による発情確認を受け、畜主による外部徴候の確認と直腸検査を実施した獣医師の判断に基づいて、常法に従い人工授精(AI)が実施された。妊娠診断は授精後28日以上経過した個体を対象に、全て超音波画像診断装置を用いて実施した。

(4) 統計解析

血中P₄濃度の推移は2元配置分散分析を行い、PGF_{2α}

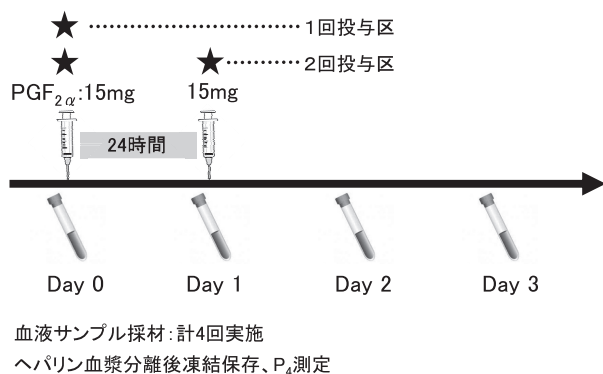


図1. プロスタグランジンF_{2α}の投与方法および血液サンプルの採材方法

投与回数とPGF_{2α}投与からの経過日数の影響を解析した。授精率、受胎率、妊娠率および完全黄体退行を示すウシの割合については、 χ^2 検定を用いた。全ての統計解析は、統計解析ソフトStatView Version 5.0(SAS Institute, Cary, NC, USA)を用いて実施し、 $P < 0.05$ で有意差ありと判定した。

【調査1】黄体退行への影響

PGF_{2α}投与前から投与3日後までの血中P₄濃度の推移に及ぼすPGF_{2α}投与回数の影響を調べた。さらに、Day 2の血中P₄濃度が0.5 ng/ml未満となった状態を完全黄体退行と定義し、全供試牛を、完全黄体退行(P₄ < 0.5 ng/ml)と不完全黄体退行(P₄ ≥ 0.5 ng/ml)に分け、PGF_{2α}投与の回数が黄体退行に及ぼす影響を調べた。

【調査2】受胎性および発情回帰への影響

受胎状況および発情回帰状況などを、1回投与区および2回投与区間で比較検討した。発情回帰状況は、PGF_{2α}投与後のAIで受胎しなかった不受胎牛のうち、AI履歴より妊娠診断前・授精後28日未満で再授精したものを発情回帰と定義し抽出した。PGF_{2α}投与後のAIは、1回および2回投与区ともに3～6日後に実施されていた。PGF_{2α}投与後のAI実施平均日数が1回投与区で3.2日、2回投与区で3.4日であったため、PGF_{2α}投与後にAIが実施されなかった未授精牛についても、PGF_{2α}投与後3日目を起算日として28日未満でAIした個体を抽出し、不受胎牛と合わせて発情回帰とした。

黄体退行状況が受胎性に及ぼす影響を調べるために、完全黄体退行を示す場合と不完全黄体退行を示す場合の妊娠率を比較した。

結 果

Day 0の血中P₄濃度が1 ng/ml以下であった4頭を除き、延べ72頭を供試した。

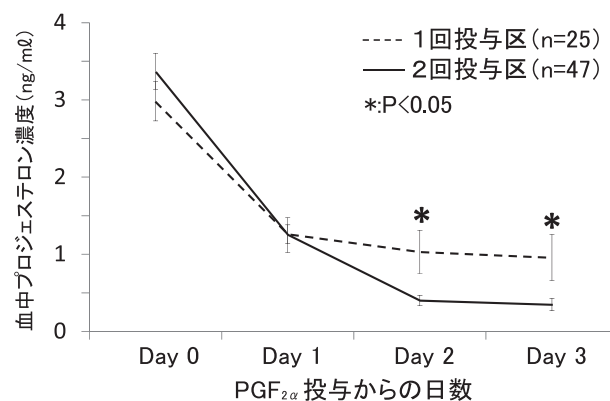


図2. PGF_{2α}の投与回数が血中プロゲステロン濃度動態に及ぼす影響

【調査1】黄体退行への影響

PGF_{2α}投与後の血中P₄濃度の推移について、2回投与区では1回投与区に比べ、Day 2とDay 3において有意に低く推移した (P<0.05) (図2)。

Day 2で血中P₄濃度が0.5 ng/ml未満となる完全黄体退行を示した牛の割合は、1回投与区で56.0% (n=14/25)、2回投与区で80.9% (n=38/47) となり、2回投与区で有意に高かった (表1、P<0.05)。

【調査2】受胎性および発情回帰への影響

PGF_{2α}投与後の授精率は、1回投与区84.0% (n=21/25)、2回投与区80.9% (n=38/47) と差異は認められなかった。受胎率は、1回投与区28.6% (n=6/21)、2回投与区34.2% (n=13/38) であり、有意な差はみられなかった。また、妊娠率についても、1回投与区24.0% (n=6/25)、2回投与区27.7% (n=13/47) となり、受胎性に差は認められなかった (表2)。妊娠診断時に胚死滅と診断されたのは、両区ともに1頭ずつだった。発情回帰状況は、1回投与区11.1% (n=2/18)、2回投与区27.3% (n=9/33) で、2回投与区の方が高い傾向にあった。さらにPGF_{2α}投与後と回帰発情を合わせた2回以内の授精で受胎した妊娠率は、1回投与区28.0% (n=7/25)、2回投与区40.4% (n=19/47) で、2回投与区の方が高い傾向がみられた (図3)。

黄体退行状況が受胎性に及ぼす影響を解析したところ、妊娠率は、完全黄体退行 (P₄<0.5 ng/ml) を示す場合は30.8% (n=16/52) であり、不完全黄体退行 (P₄≥0.5 ng/ml) を示す場合は15.0% (n=3/20) となり、有意差は認められなかったものの、完全黄体退行した場合に妊娠率が高い傾向であった (表3)。

表1. PGF_{2α}の投与回数が黄体退行に及ぼす影響

試験区	供試牛(頭)	0.5 ng/ml未満の個体(頭)*	完全黄体退行率(%)
1回投与区	25	14	56.0a
2回投与区	47	38	80.9b

*Day 2の血中P₄濃度
a-b間でp<0.05の有意差を認めた

表2. PGF_{2α}の投与回数が授精率、受胎率および妊娠率に及ぼす影響

試験区	供試牛(頭)	授精率(%)	受胎率(%)	妊娠率(%)
1回投与区	25	84 (21/25)	28.6 (6/21)	24 (6/25)
2回投与区	47	80.9 (38/47)	34.2 (13/38)	27.7 (13/47)

数値は、上段は百分比を示し、下段の () 内は頭数を示した。

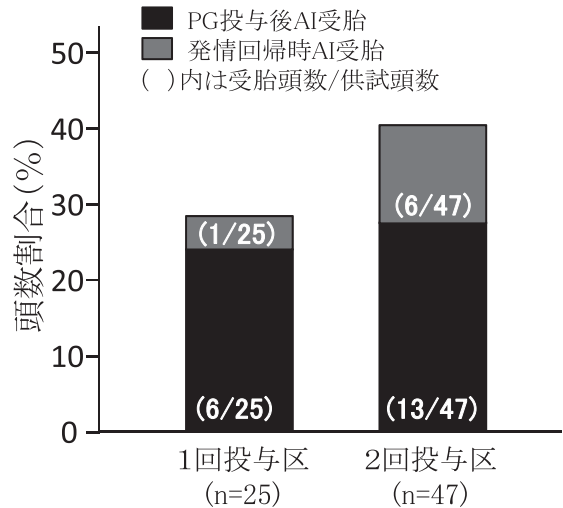


図3. PGF_{2α}の投与回数が妊娠率に及ぼす影響

表3. PGF_{2α}の投与回数が妊娠率に及ぼす影響

試験区	供試頭数	妊娠率 (%)	
		完全黄体退行	不完全黄体退行
1回投与区	25	35.7 (5/14)	9.1 (1/11)
2回投与区	47	28.9 (11/38)	22.2 (2/9)
計	72	30.8 (16/52)	15 (3/20)

完全黄体退行：Day 2の血中P₄濃度が0.5 ng/ml未満
不完全黄体退行：Day 2の血中P₄濃度が0.5 ng/ml以上
数値は、上段は百分比を示し、下段の () 内は頭数を示した。

考 察

本研究において、Day 2とDay 3の血中P₄濃度は2回投与区の方が1回投与区より有意に減少していたことに加え、Day 2に血中P₄濃度が0.5 ng/ml未満となる頭数の割合も2回投与区の方が高い傾向にあったことから、PGF_{2α}の2回投与は迅速かつ確実に黄体を退行させることが明らかにされた。

ホルスタイン種泌乳牛について、PGF_{2α}の投与回数を検討した研究では、1回投与に比べ2回投与で完全な黄体退行を示す個体が増えることが報告されており[4,5]、本研究の結果もそれを支持するものであった。

本研究でのPGF_{2α}の投与量は、ジノプロストとして15 mgであり、この投与量は推奨投与量の下限である。よって、PGF_{2α}15 mgの1回投与では、経産泌乳牛には投与量として不足であったため、2回投与によるPGF_{2α}の増量が有効であった可能性も考えられた。一方、PGF_{2α}の推奨投与量の上限であるジノプロスト25 mgあるいはクロプロステノール500 μgを用いた研究では、いずれも1回投与に比べ2回投与で黄体退行が促進されることが示

されている^[2,5]。また、PGF_{2α}の推奨投与量の2倍量を1回投与した場合と推奨投与量を2回投与した場合を比べた試験においても、2回投与で黄体退行が促進された^[3]。これらのことから、PGF_{2α}の投与回数を増やすことが黄体退行誘起に有効であると推察される。今後、推奨投与量の上限であるジノプロスト25 mgについても、投与回数による黄体退行誘起への影響を調べる必要があると考えられた。

1回目 GnRH投与後5日目にPGF_{2α}投与を行う定時授精法において、PGF_{2α}投与を2回にすることで黄体退行が促進されることが示されている^[4]。さらに、形成期の黄体は、PGF_{2α}投与による黄体退行誘起への反応性が低いことが知られている^[6]ことから、定時授精法において新規に形成誘導された黄体の退行誘起には、PGF_{2α}の投与回数を増やすことが有効であると推察される。本研究では、PGF_{2α}投与時の黄体の発育ステージは不明であり、黄体が形成期であった個体にPGF_{2α}投与が実施された可能性がある。その場合、1回投与では完全退行を誘起できなかったのかもしれない。よって、黄体のステージが不明な場合においては、PGF_{2α}を2回投与することが有効であると考えられた。

本研究では、2回投与区の方が有意にP₄を減少させたにも関わらず、妊娠率は1回投与区と2回投与区との間で有意差がなかった。黄体退行の良好な2回投与区で妊娠率の改善がみられなかった理由は明らかでない。有意差はないが、授精あたりの受胎率は、2回投与区で高い傾向がみられるものの、授精率では、1回投与区の方がわずかに高い値を示したために、妊娠率に差異が出なかったのかもしれない。

一方、PGF_{2α}投与回数に関わらず、Day 2で血中P₄濃度が0.5 ng/ml未満を示し完全黄体退行に至った個体では、妊娠率が高い傾向にあった。定時授精法において授精のための排卵誘起を目的にGnRHを投与する時点において、血中P₄濃度が0.4あるいは0.5 ng/mlより高い場合に受胎率が低下することから、完全な黄体退行の誘起の重要性が示されている^[4,5]。本研究は、これらの知見を裏付けるものである。近年、定時授精法において、黄体退行から排卵までの期間を充分にとることで卵胞成熟が促され、受胎率が増加することが報告されている^[7]。つまり、本研究において、速やかに完全な黄体退行が起こっている場合には、十分な卵胞成熟が誘導され受胎性が改善されているのかもしれない。本研究ではPGF_{2α}投与を酪農家に依頼したため、手技の簡便化を図るために投与間隔を24時間としたが、より急速に血中P₄濃度を減

少させるためには、投与間隔を短縮した方法についても検討が必要だと思われた。

本研究では、PGF_{2α}投与後と回帰発情を合わせた2回以内の授精で受胎した妊娠率は、2回投与区の方が高い傾向がみられた。これは、有意差はみられなかったものの、回帰した発情に対する授精での受胎率が、2回投与区で高い傾向にあったためと考えられた。本研究からは、PGF_{2α}投与回数が授精後の回帰した発情での受胎性に及ぼす影響を明らかにすることはできない。近年、排卵時の卵胞の機能が、排卵後に形成される黄体の機能と関連することが知られている^[8-10]。また、発情の前周期の黄体機能（血中P₄濃度）が低い場合、黄体退行に関わる子宮の機能が変化することで、低受胎性をもたらす可能性が示唆されている^[11-13]。これらのことから、本研究において、2回投与区で速やかに完全な黄体退行が起こったことで卵胞の成熟が促進し、その結果、形成された黄体の機能が良好となった可能性がある。そのため、その後、不受胎により回帰した発情において、その前周期の十分な血中P₄濃度の影響により受胎性が良かったのかもしれない。今後、2回投与区での排卵後の黄体の機能や回帰した発情時の卵胞の機能などを調べることも必要と考えられた。

本研究の結果を踏まえ、1回投与区のPGF_{2α}投与量を25 mgに増量し、経産牛のPGF_{2α}適正量を確認すること、また2回投与区の投与間隔を短縮し、より効果的なPGF_{2α}連続投与方法を検討することを更なる目的として、現在継続調査中である。

最後に、本試験において多大なご協力をいただいた更別家畜診療所の同僚獣医師に加えて、採血にお付き合いいただいた酪農家の皆様と牛たちに深謝いたします。

引用文献

- [1] Souza AH, Gumen A, Silva EPB, Cunha AP, Guenther JN, Peto CM, Caraviello DZ, Wiltbank MC: Supplementation with estradiol-17 beta before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the ovsynch protocol in lactating dairy cows, *J Dairy Sci*, 90, 4623-4634 (2007)
- [2] Brusveen DJ, Souza AH, Wiltbank MC: Effects of additional prostaglandin F-2 alpha and estradiol-17 beta during Ovsynch in lactating dairy cows, *J Dairy Sci*, 92, 1412-1422 (2009)
- [3] Ribeiro ES, Bisinotto RS, Favoreto MG, Martins LT, Cerri RL, Silvestre FT, Greco LF, Thatcher

- WW, Santos JE: Fertility in dairy cows following presynchronization and administering twice the luteolytic dose of prostaglandin F₂α as one or two injections in the 5-day timed artificial insemination protocol, *Theriogenology*, 78, 273-284 (2012)
- [4] Santos JE, Narciso CD, Rivera F, Thatcher WW, Chebel RC: Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows, *J Dairy Sci*, 93, 2976-2988 (2010)
- [5] Wiltbank MC, Baez GM, Cochrane F, Barletta RV, Trayford CR, Joseph RT: Effect of a second treatment with prostaglandin F₂α during the Ovsynch protocol on luteolysis and pregnancy in dairy cows, *J Dairy Sci*, 98, 8644-8654 (2015)
- [6] Louis TM, Hafs HD, Seguin BE: Progesterone, LH, estrus and ovulation after prostaglandin F₂ in heifers, *Proc Soc Exp Biol Med*, 143, 152-155 (1973)
- [7] Brusveen DJ, Cunha AP, Silva CD, Cunha PM, Sterry RA, Silva EP, Guenther JN, Wiltbank MC: Altering the time of the second gonadotropin-releasing hormone injection and artificial insemination (AI) during Ovsynch affects pregnancies per AI in lactating dairy cows, *J Dairy Sci*, 91, 1044-1052 (2008)
- [8] Vasconcelos JL, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC: Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate, *Theriogenology*, 56, 307-314 (2001)
- [9] Robinson RS, Hammond AJ, Hunter MG, Mann GE, The induction of a delayed post-ovulatory progesterone rise in dairy cows: a novel model. *Domest Anim Endocrinol*, 28, 285-295 (2005)
- [10] Miura R, Haneda S, Matsui M: Ovulation of the preovulatory follicle originating from the first-wave dominant follicle leads to formation of an active corpus luteum, *J Reprod Dev*, 61, 317-323 (2015)
- [11] Garverick HA, Zollers WG, Smith MF: Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function, *Anim Reprod Sci*, 28, 111-124 (1992)
- [12] Zollers WG, Garverick Jr HA, Smith MF, Moffatt RJ, Salfen BE, Youngquist RS: Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrus cycle, *J Reprod Fertil*, 97, 329-337 (1993)
- [13] Cerri RL, Chebel RC, Rivera F, Narciso CD, Oliveira RA, Amstalden M, Baez-Sandoval GM, Oliveira LJ, Thatcher WW, Santos JE: Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses, *J Dairy Sci*, 94, 3352-3365 (2011)