

黄体ホルモン製剤を活用した牛受胎率向上技術の確立

小林崇之・堀川明彦・近藤守人

要約 人工授精 (AI) 後早期にプロゲステロン濃度を人工的に上昇させ、胚の発育を促進することで受胎を促し、かつ不受胎牛においては、発情発現率を向上させることを目的として AI 後早期の膈内留置型プロゲステロン製剤 (CIDR) の装着・除去がその後の繁殖成績に及ぼす影響について検討した。その結果、AI 後 5 日目～19 日目の CIDR の装着は、受胎率および発情回帰率の改善が認められた。また母牛の AI 後 19 日目の血中プロゲステロン (P4) 濃度とインターフェロン誘導性遺伝子 (ISG15) 発現量を測定することで 80%以上の確立で不受胎牛を摘発できる可能性が示唆された。

キーワード：

I 緒言

酪農家の経営安定には繁殖成績の安定が必要であり、繁殖成績の改善には受胎率の向上と不受胎牛を早期に発見し、再度人工授精 (AI) を行うことが重要である。しかし乳用牛の受胎率は年々低下していることや空胎期間も年々延長していることなど、繁殖成績は大きく低下しており酪農家の経営安定の妨げとなっているのが現状である。近年、胚の発育には受精後早期の黄体ホルモン (プロゲステロン) 濃度が重要であり、相関があることが明らかになってきている (R.E.McNeil et al.,2006,Mann Ge et al.,2006)。また発情の明瞭な発現には、黄体期に一定量のプロゲステロン濃度の存在とその急激な低下が必要であるといわれている (小島敏之,2012)。そこで AI 後早期にプロゲステロン濃度を人工的に上昇させ、胚の発育を促進することで受胎を促し、かつ不受胎牛においては、発情発現率を向上させることを目的として AI 後早期の膈内留置型プロゲステロン製剤 (CIDR) の装着・除去がその後の繁殖成績に及ぼす影響について検討したので報告する。

II 材料および方法

1. 試験 1 : AI 後の CIDR 装着による影響

AI 後早期の黄体ホルモン濃度の向上がその後の繁殖成績に与える影響について検討した。

1) 供試牛

福井県嶺北地域の酪農家 3 戸で飼養されているホルスタイン種経産牛 50 頭を供試牛とした。

2) 試験方法

試験方法を図 1 に示した。発情同期化として全頭に、発情周期の任意の時期に、安息香酸エストラジオール (E2) を 1ml 投与し、CIDR を挿入した。CIDR 挿入後 7 日目にプロスタグランジン F2 α (PGF2 α 、ダルマジン) を 2.5ml 投与するとともに CIDR を抜去した。PG 投与後 48 時間後に性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH、コンセラル) 200 μ g 投与し、投与後 12 時間～24 時間後に AI を実施した。AI 後 5 日目～19 日目まで CIDR を挿入した区を試験区 (n=29 頭)、CIDR を挿入しなかった区を対照区 (n=21 頭) とした。試験区、対照区ともに AI 後 21 日以降に発情観察を行い、発情の確認できたものには再度 AI を行い、できなかったものに関しては 35 日目に妊娠鑑定を行った。妊娠鑑定には超音波診断装置 (MTF 社製、トリング V) を用い、胎児、心拍の確認を持って妊娠 (+) と診断した。受胎率、発情回帰率、再 AI 率、妊娠率 (1 回目の AI と 2 回目の AI の合計受胎率) を調査した。

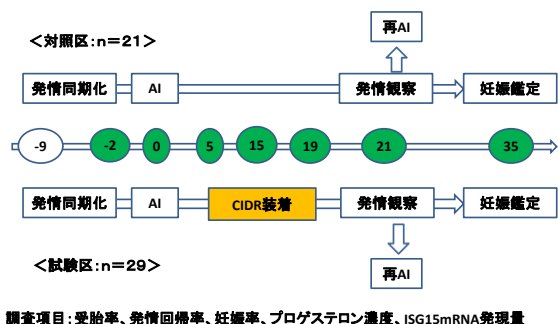


図1 材料および方法（試験1）

2) P4 濃度および ISG15 測定方法

AI 日を 0 日として -2 日、0 日、5 日、15 日、19 日、21 日、35 日に尾静脈から血漿真空採血管および EDTA 真空採血管にて定期的に採血を行った。採取された血漿は、遠心分離 (3000ppm、15 分) を行い、 -80°C で冷凍保存した。その後分析時に融解後、プロゲステロン濃度 (P4 濃度) を酵素免疫測定法 (免疫蛍光測定装置 mini VIDAS) により測定した。さらに黄体ホルモン濃度向上による胚への影響を確認することを目的に 15 日目、19 日目、21 日目のインターフェロン誘導性遺伝子 (ISG15) の発現量を測定した。リファレンス遺伝子は CycA を使用した。EDTA 真空採血管で収集した血液を Gifford ら (2007) の方法に準じ PBL を採取し、 $200\mu\text{l}$ を $750\mu\text{l}$ の TRI Reagent と混合し、分析まで -80°C で冷凍保存した。ISG15mRNA の発現量は、Green ら (2010) の方法に準じ、Real Time PCR (Bio-Rad 社製) により測定した。

2. 試験 2 : 不受胎牛の早期摘発方法の検討

不受胎牛の摘発率の向上を目的に AI 後 19 日目の血液検査からの受胎牛、不受胎牛摘発法について検討した。

1) 供試牛

福井県嶺北地域の酪農家 3 戸で飼養されているホルスタイン種経産牛 27 頭を供試牛とした。

2) 方法

試験方法を図 2 に示した。試験 1 と同様に、発情同期化として全頭に発情周期の任意の時期に、安息香酸エストラジオール (E2) を 1ml 投

与し、CIDR を挿入した。CIDR 挿入後 7 日目にプロスタグランジン $\text{F2}\alpha$ (PGF2 α 、ダルマジン) を 2.5ml 投与するとともに CIDR を抜去した。PG 投与後 48 時間後に性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH、コンセラル) $200\mu\text{g}$ 投与し、投与後 12 時間~24 時間後に AI を実施した。AI 後 5 日~19 日目まで CIDR を挿入した。両区とも AI 後 21 日以降に発情観察を行い、発情の確認できたものには再度 AI を行い、できなかったものに関しては 35 日目に妊娠鑑定を行った。妊娠鑑定には超音波診断装置を用い、胎児、心拍の確認を持って妊娠 (+) と診断した。AI 後 19 日目に尾静脈より採血を行い、P4 濃度を酵素免疫測定法 (免疫蛍光測定装置 mini VIDAS) により測定した。ISG15 の発現量を Real Time PCR により測定した。P4 濃度、ISG15 発現量から AI 後 21 日以内の不受胎牛の摘発の可能性について検討した。

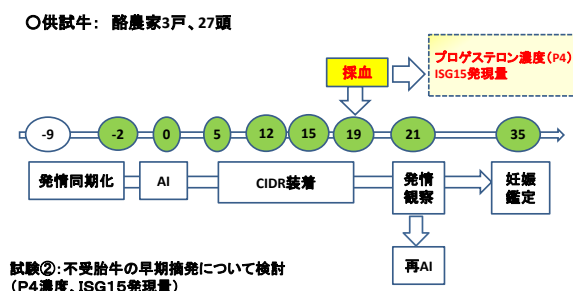


図2 材料および方法（試験2）

結 果

試験 1

繁殖成績を図 3 に示した。受胎率は、対照区 33.3%、試験区 48.3%であり発情回帰率は対照区 42.9%、試験区 60.0%と受胎率・発情回帰率ともに試験区のほうが高い傾向にあった。再 AI 率も対照区 28.6%、試験区 53.3%と試験区の方が高い傾向にあった。しかし再 AI の受胎率は、対照区 50.0%、試験区 25.0%と対照区のほうが高い傾向にあった。妊娠率は、対照区 42.9%、試験区 55.2%と試験区のほうが高い傾向にあった。

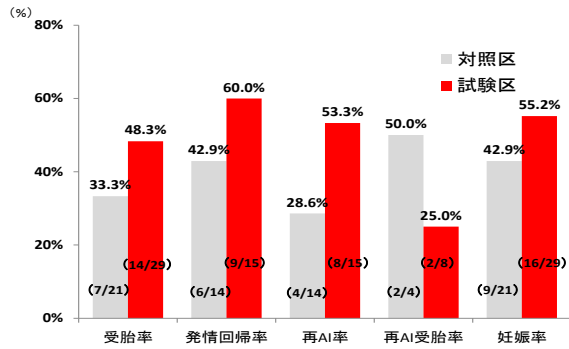


図3 繁殖成績

P₄ 濃度の推移を図4に示した。対照区妊娠 (+) 群、試験区妊娠 (+) 群ともに高い濃度で推移していた。対照区妊娠 (-) 群では、全体的に低い濃度で推移していた。試験区妊娠 (-) 群では15日目の濃度で対照区妊娠 (-) 群より高い値を示していた。

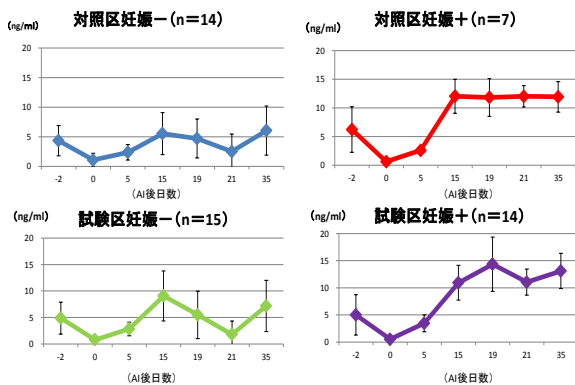


図4 プログステロン濃度の推移

ISG15 発現量を図5に示した。AI 後15日目のISG15 発現量は、すべての区で低い値を示していた。しかし AI 後19日目、21日目の発現量は、対照区妊娠 (+) 群、試験区妊娠 (+) 群ともに妊娠 (-) 群より高い発現量を示した。また試験区妊娠 (+) 群が対照区妊娠 (+) 群よりやや高い傾向にあった。

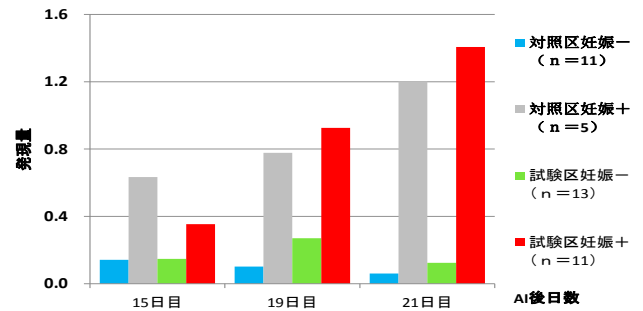


図5 ISG15mRNA 発現量

試験2

AI 後19日目のP₄ 濃度およびISG15 発現量を図6に示した。P₄ は高いもので12ng/ml 以上、低いもので1.5ng/ml 以下であった。ISG15 は高いもので3.0 以上、低いもので0.5 以下であった。

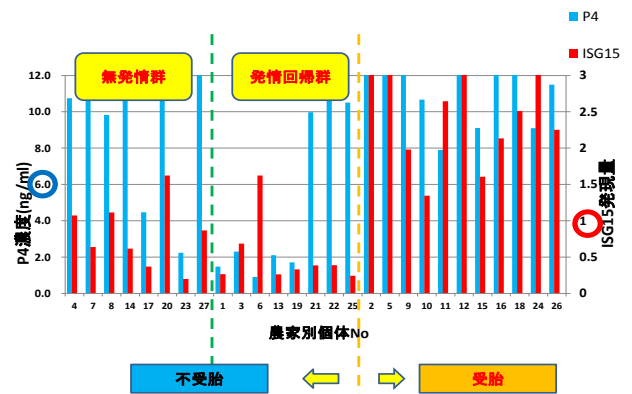


図6 AI 後19日目のP₄ 濃度およびISG15 発現量

不受胎牛では、発情回帰した牛の多くにおいてP₄ 濃度は低い結果であった。またISG15 は、6 番以外は低い結果であった。発情回帰しなかった牛では、多くがP₄ 濃度が高い結果であった。ISG15 発現量は、高いものと低いものが混在していた。受胎牛では、高いP₄ 濃度と高いISG15 発現量を示しておりP₄ 濃度は、6.0ng/ml 以上、ISG15 は1.0 以上を示していた。これらのことからP₄ 濃度の基準を6.0ng/ml、ISG15 発現量の基準を1.0 とした場合、不受胎牛の摘発率は81.3% (13/16 頭) と高い確率で摘発できると考えられた。また受胎牛の摘発率は、78.6% (11/14 頭) であった。(図7)

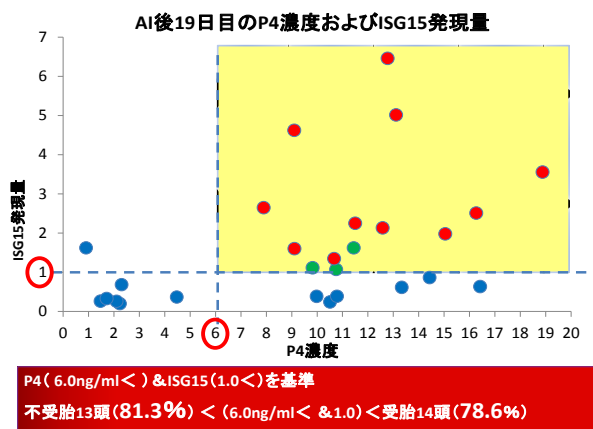


図7 AI後19日目のP4、ISG15の散布図

IV 考 察

AI後5日目のCIDR装着は、胚の発育を促進し、受胎率を向上させる結果となった。Mannら(2006)は、AI後4~6日目の血中P4濃度と胚の生存性には相関があると報告している。またAI後5日目~9日目のCIDRの装着は、栄養膜の発育を促進し子宮内のインターフェロン τ 濃度が増加したと報告している。またMehni SBら(2012)もAI後5~19日目のCIDRの装着で受胎率が向上したとしている。今回の研究でも、図4のとおりAI後5日目~19日目のCIDR装着により、P4濃度が高くなったことで、胚の発育が促進され受胎率が改善したと考えられた。またShuichi Matsuyamaら(2012)は、ISG15発現量とIFN- τ に相関があること、IFN- τ と胚の大きさに相関があることからISG15発現量により胚の大きさを推察できるとしている。また、AI後7日目でP4濃度が高い牛は、低い牛よりAI後13日目で胚が大きかったとある(6)。今回の試験では有意差は認められなかったが試験区において対照区よりISG15発現量が高い傾向にあったことから、CIDR装着の効果により胚の発育が向上した可能性が考えられた。

AI後19日目のCIDR除去は、不受胎牛における発情回帰率を改善させた。このため不受胎牛を早期に摘発でき、その後の再AIなどの処置を行うことが出来た。泉ら(2010)は、AI後14~21日目にCIDRを装着した結果、集中的に発情が回帰したとある。今回の研究では、AI

後5日目~19日目の装着であったが同様に発情回帰率を改善する結果であった。これはCIDR装着により血中P4濃度が高く維持されたこと、その後のCIDRの除去にともないP4濃度が急激に低下し、GnRH(性腺刺激ホルモン放出ホルモン)や性腺刺激ホルモンの分泌を増加させ、卵胞の発育を促し発情を発現させたと考えられた(小島敏之.2012)。

しかし再AIの受胎率は、例数は少ないが試験区の方が低い結果であった。北原ら(2011)は黒毛和種においてAI後17~24日目までCIDRを7日間装着した場合、再AIの受胎率は、差はなかったと報告している。今回の研究では、再AIの時期が夏場だったことによる暑熱の影響も考えられた。

AI後19日目のP4濃度およびISG15発現量を測定した結果、受胎牛においてISG15発現量が高い傾向にあった。しかし不受胎牛においては、ISG15発現量はやや高い傾向にあって発情が来ない牛と、ほとんど発現せずに発情回帰する牛が存在した。これは松山ら(2012)の報告と同様に、前者は不受胎牛において胚が存在していたが発育不良によりその後胚が死滅した可能性と、後者は未受精もしくはかなり早い段階で胚が死滅している可能性が考えられた。これらの結果からISG15の測定は、AI後21日以内の子宮内での胚の存在(発育状態)を把握する指標の1つとなると考えられた。また、P4濃度との併用により高い確率で不受胎牛が摘発できると考えられ、今回の研究では、受胎牛の摘発率は78.6%であった。基準値以内の牛でも遅延した発情が確認される牛や、35日の妊娠鑑定でも不受胎を確認するなどの例では21日以降の胚死滅の発生が疑われた。過去の報告では、乳牛における後期胚死滅の発生率は8~18%程度発生するとしている(秋田真司.2011、片桐成二.011)。今回の試験でも11%で後期胚死滅の可能性のあることから、今後は後期胚死滅に対する予防方法も検討していく必要がある。

近年の酪農家の経営安定には、繁殖成績の改善が必要不可欠であり、受胎率の向上およびAI後21日以内の不受胎牛の摘発は、繁殖成績向上に非常に有効であると思われる。CIDRを活用した受胎率改善法とともに、ISG15とP4を活用した早期不受胎牛摘発法を活用することで、

不受胎牛の早期発見・早期治療などの対応が可能となり繁殖成績改善の方法として非常に有効であると考えられた。今回は、血液からのサンプリングであったが、今後はより利便性の高い乳中からのサンプリングを検討していくことや、例数を増やし、精度を上げる必要がある。

以上のことから AI 後 5 日目～19 日目の CIDR 装着は、受胎率を改善するとともに、不受胎牛において発情回帰を促す方法として有効であると考えられた。また 19 日目の ISG15 発現量と P4 濃度により 21 日以内での不受胎牛を高確率で摘発できることから繁殖成績の改善に繋げることが可能であると考えられた。

文 献

- R.E.McNeil, M.G.Diskin, J.M.Sreenan, D.G.Morris, Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. *Theriogenology*, 65, 1435-1441,2006
- Mann GE, M.D.Fray, G.E.Laming. Effect of time of progesterone supplementation on embryo development and interferone-tau production in the cow. *Vet J*, 171, 500-503,2006
- 泉大樹・松井基純・羽田真悟・李旭薫・富田健介・藤木なつみ・平瀬暁也. 人工授精後の膈内留置型プロゲステロン製剤 (CIDR) 挿入による不受胎牛の早期摘発および受胎率向上へのチャレンジ. 北海道獣医師学会. 18:54.2010
- 小島 敏之,DAIRYMAN 2012 - 5,34-35 北海道共同通信社,北海道,2012
- 北原豪・日高亨介・鈴木義人・峰雄太・加治佐誠・小林郁雄・上村俊一,定時人工授精後のプロゲステロン製剤留置が黒毛和牛の繁殖成績に及ぼす影響. 日獣会.64.870-873.2011
- Lonergan P, Woods A, Fair T, Carter F, Rizos D, Ward F, Quinn K, Evans A. Effect of embryo Source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 19(7),861-868.2007
- Mehni SB, Shabankareh HK, Kazemi-Bonchenari M, Eghbali M. The Comparison of Treating Holstein Dairy Cows with Progesterone,CIDR and GnRH After Insemination on Serum Progesterone and Pregnancy Rates. *Reproduction in domestic animals* Feb. 47. 131-134.2012
- 秋田真司・ホルスタイン種における後期胚死滅の発生状況とプロゲステロン製剤による防止効果. 広島県獣医師学会雑誌 No.26,7-10.2011
- 片桐成二・乳牛における胚死滅-発生状況とその背景 - MP アグロジャーナル 5-8,2011.7.MP アグロ株式会社.北海道.2007
- Shuichi Matsuyama, Takatoshi Kojima, Satoru Kato, Koji Kimura. Relationship between quantity of IFNT estimated by IFN-stimulated gene expression in peripheral blood mononuclear cells and bovine embryonic mortality after AI or ET. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2012 10:21.2012
- C.A.Gifford, K.Racicot, D.S.Clark, K.J.Austin, T.R.Hansen, M.C.Lucy Regulation of interferone-Stimulated Genes IN Peripheral Blood Leukocytes in Pregnant AND Bred, Nonpregnant Dairy Cows. *J.Dairy Sci.* 90:274-280.2007
- J.C.Green, C.S.Okamura, S.E.Poock, M.C.Lucy. Measurement of interferone-tau(IFN-t) Stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18-20d after insemination in dairy cattle. *Animal reproduction Science* 121:24-33.2010

Improvement of conception rates using CIDR in dairy cows.

Takayuki KOBAYASHI, Takayasu TAKEUCHI and Morito KONDO

We investigated the influences of the early progesterone supplementation (CIDR) in conception rates after the artificial insemination (A.I) in dairy cows.

As a result, the supplement of 5 day-19 day progesterone has improved the conception rates and the rates of return of estrus after A.I. Moreover, ISG15 mRNA and progesterone concentrations in the serum on the 19 days after A.I are predictive by 80% or more of non-pregnant dairy cows.