牛における Prostaglandin $F_{2\alpha}$ 子宮内注入と合成黄体形成 ホルモン放出ホルモン筋肉注射による性周期同調

金田 義宏*・中原 達夫・百目鬼郁男

(農林省家畜衛生試験場 *同東北支場)

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) の子宮内注入による牛の性周期同調については最近多数の報告¹⁻⁴⁾があるが、 $PGF_{2\alpha}$ による性周期同調効果ならびに同期化された発情期における受胎性はともに従来の方法⁵⁾に比べてすぐれていることが認められている。しかし、この方法を野外の繁殖管理の実際面に適用するにあたっては、発情同期化効果を一層高めるとともに排卵に限られた短い時間帯に起こるようにすることが望まれる。

この目的で最近、合成黄体形成ホルモン放出ホルモン (LH-RH) を $PGF_{2\alpha}$ と併用する試みが行われている^{8,9)}。

本報告では、放牧牛において $PGF_{2\alpha}$ の子宮内注入後に合成 LH-RH を投与して、これらの処置が性周期の同調効果および同期化された発情期における受胎性に及ぼす影響を検討した。

試験材料および方法

本試験は青森県下の 1 放牧地において行った。試験対象牛は試験開始前 32~42 日に入牧した放牧牛で、直腸検査によって子宮の状態が正常であり、卵巢に開花期の黄体が触知されたものである。試験は A, B, C の 3 群に区分して行った。すなわち、A 群には $PGF_{2\alpha}$ を子宮内に注入した後合成 LH-RH を筋肉注射し、B 群は A 群と同様に $PGF_{2\alpha}$ 処置を施した後に合成 LH-RH の類縁物質を筋肉注射した。C 群は $PGF_{2\alpha}$ 子宮内注入のみの対照群とした。

A 群の試験牛はホルスタイン種 10 頭 (未経産牛 9 頭、経産牛 1 頭) および日本短角種 6 頭 (未経産牛 4 頭、経産牛 2 頭) 合計 16 頭、B 群の試験牛はホルスタイン種 6

頭 (未経産牛) および日本短角種 7 頭 (未経産牛 6 頭、経産牛 1 頭) 合計 13 頭、C 群の試験牛はホルスタイン種未経産牛 32 頭である。

使用した $PGF_{2\alpha}$ は、磷酸緩衝液に溶解した後凍結乾燥して保存されているものである。合成 LH-RH はデカペプチドアミド [$pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2$] で、LH-RH の類縁物質 (LH-RH-I) は排卵誘起作用が LH-RH と比べて強いことが認められている^{7,8,10)} ノナペプチド [$Des-Gly-NH_2^{10}$, Pro-ethylamide⁹⁾]-LH-RH である。 $PGF_{2\alpha}$ の投与量は 3 mg あるいは 4 mg とし、これを 0.75 ml あるいは 1.0 ml の蒸留水に溶解して用いた。 $PGF_{2\alpha}$ の子宮内注入は金属製の子宮内注入器を用いて、前報⁴⁾と同様に行った。LH-RH および LH-RH-I の投与量はいずれも 200 μg とし、5.0 ml の蒸留水に溶解して $PGF_{2\alpha}$ 子宮内注入後 52~56 時間に腎筋内に注射した。

処置後の発情観察、臨床繁殖検査、交配ならびに妊娠診断は、前報⁴⁾に準じて行った。なお、処置後の発情発現、排卵および授精までの時間は $PGF_{2\alpha}$ を子宮内に注入した時刻を 0 として起算し、0~24 時間を 1 日として示した。

試験成績

1. 処置後の発情発現状況

発情は $PGF_{2\alpha}$ 処置後 37~72 時間に、A 群では 16 頭中 10 頭 (62.5%)、B 群では 13 頭中 10 頭 (76.9%)、C 群では 32 頭中 26 頭 (81.3%) が集中して発現した (Table 1)。このうち、処置後 48 時間以内の早期に発情したものは、B 群では処置牛の 46.1% を占めており、A 群の 18.8%、C 群の 9.4% と比べて多かった。しかし、処置後 60 時間以内に発情したものは A, B および C 群においてそれぞれ 50.0%, 61.5% および 53.2% で 3 群の間に大きな差異はみられなかった。また、C 群の 2 頭 (6.2%) は処置後 73~108 時間、3 頭 (9.4%) は 11~15 日の間に発情したが、A 群の 6 頭 (37.5%)、B 群の 3 頭 (23.1%) および C 群の 1 頭 (3.1%) には発情

Synchronization of estrus with an intrauterine infusion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ and an intramuscular injection of LH-releasing hormone (LH-RH) in cows.

KANEDA, Yoshihiro, Tatsuo NAKAHARA* & Ikuo DOMEKI* (Tohoku Branch Laboratory, National Institute of Animal Health, Shichinohe, Aomori 039-25 & *National Institute of Animal Health, Kodaira, Tokyo 187)

Jap. J. Animal Reprod. 21 (4), 1976.

Table 1. Occurrence of estrus in the cow following synthetic LH-RH given intramuscularly after intrauterine infusion of PGF_{2α}

Exp. group	Treatment	Number of cows treated	Hours from treatment to estrus							Number of ^(c) cows showed dull estrus
			37~48	49~60	61~72	73~84	85~96	97~108	109≤	
A	PGF _{2α} ^(a) +LH-RH ^(b)	16	3 ^(d) (18.8)	5 (31.2)	2 (12.5)					6 (37.5)
B	PGF _{2α} +LH-RH-I	13	6 (46.1)	2 (15.4)	2 (15.4)					3 (23.1)
C	PGF _{2α}	32	3 (9.4)	14 (43.8)	9 (28.1)	1 (3.1)		1 (3.1)	3 (9.4)	1 (3.1)

(a): 3 mg in group A and B, 4 mg in group C were deposited into the uterine horn ipsilateral to the corpus luteum.

(b): 200μg was given intramuscularly 52~56 hours after PGF_{2α} injection.

(c): Cows ovulated within 132 hours after the treatment without exhibiting behavioral estrus.

(d): (%)

Table 2. Occurrence of ovulation in the cow following the treatment with PGF_{2α} and synthetic LH-RH

Exp. group	Number of cows treated ^(a)	Hours from treatment to ovulation					
		61~72	73~84	85~96	97~108	109~120	109~132
A	16	1 (6.2)*	6 (37.5) (43.7)**	6 (37.5) (81.2)	3 (18.8) (100.0)		
B	13	3 (23.1)	8 (61.5) (84.6)	1 (7.7) (92.3)		1 (7.7) (100.0)	
C	29	4 (13.8)	3 (10.3) (24.1)	13 (44.8) (68.9)	4 (13.8) (82.7)	3 (10.3) (93.0)	2 (7.0) (100.0)

(a): Cows ovulated within 132 hours after the treatment.

* %, ** Cumulative per cent.

はみられなかった。

処置後 108 時間以内に発情した牛の発情持続時間は、他の牛の乗駕を許容するなどの性行動を指標とすると、A 群では平均 13.3 時間 (3~24 時間)、B 群では平均 12.7 時間 (3~20 時間)、C 群では平均 13.1 時間 (4~24 時間) であった。

2. 処置後の卵巣所見

PGF_{2α} 処置時に触知された黄体は、処置後 2~5 日の間に大多数は急速に退行したが、B 群の 1 頭では退行の経過が緩慢であり、C 群の 2 頭では退行の程度が軽度であった。黄体の退行にともない全頭に直径 8~18 mm の発育卵胞あるいは成熟卵胞が触知され、その数は、A、B 両群では 1~3 個 (平均 1.3 個)、C 群では 1~2 個 (平均 1.3 個) であった。

排卵は、A、B 両群の全頭および C 群の処置後 11~15 日の間に発情した 3 頭を除く全頭において、処置後 61 時間からそれぞれ 108 時間、120 時間および 132 時間に起こった (Table 2)。このことから発情発現がなかった A 群の 6 頭 (37.5%)、B 群の 3 頭 (23.1%)、C 群の 1 頭 (3.1%) は無発情排卵であることが認められた。排卵が最も集中して起こった時間帯において、とくに 24 時間に排卵した牛の割合は、C 群では 85~108 時間に 58.6% (17/29 頭) で比較的低かったが、A 群では 73~96 時間に 75.0% (12/16 頭)、B 群では 61~84 時間に 84.6% (11/13 頭) であった。なお、処置牛の 80% 以上のものが排卵した処置後の時間は、C 群に比べて A 群では 12 時間、B 群では 24 時間短かった。

排卵数は、A 群の 1 頭が 2 個であったほかは、いずれ

Table 3. Fertility of the cow at the first estrus after the treatment with PGF_{2α} and synthetic LH-RH

Exp. group	Number of cows inseminated	Days from treatment to insemination				Conception rate at synchronized estrus		
		3	4	5	11~15 ^(b)	I ^(c)	II	Total
A	13	2/2 ^(a)	4/11			66.7% (6/9)	(0/4)	46.7% (6/13)
B	13	4/7	3/5	0/1		60.0% (6/10)	(1/3)	53.9% (7/13)
C	32	5/5	14/20	3/4	2/3	75.0% (21/28)	(1/1)	75.9% (22/29)

(a): Number of cows that conceived/Number of cows that were inseminated.

(b): Time interval 0~24 hours after the treatment was considered as one day.

(c): Cows showed behavioral estrus (I) and dull estrus (II) during the period from the treatment to insemination.

も 1 個であった。排卵した卵胞の大きさおよび成熟の状態は、大多数はほぼ正常と認められた。しかし、A、B 両群の各 1 頭の卵胞は十分発育することなく排卵した。なお、発情が同期化しなかった C 群の 3 頭に触知された発育卵胞はいずれも閉鎖退行した。

処置後 15~17 日の間に卵巣の状態を検査し得たものは、A、B および C 群においてそれぞれ 10 頭、7 頭および 29 頭で、このうち排卵後に機能的な黄体を形成していたものは、それぞれ 7 頭、5 頭および 25 頭であった。なお、検査時に機能的な黄体の形成が認められなかったものでは、A 群の 3 頭中 2 頭には囊腫様黄体の形成がみられ、他の 1 頭の黄体は発育が不十分で小さくその後卵巣静止に移行した。B 群の 2 頭の黄体は発育不十分で、このうちの 1 頭はその後卵巣静止に移行した。C 群の 4 頭中 2 頭には囊腫様黄体の形成がみられ、他の 2 頭の黄体は発育不十分で小さかった。

3. 処置後における受胎性

処置後の初回発情時に A 群では 16 頭のうち 13 頭、B、C 両群では全頭に授精した (Table 3)。A 群において授精しなかった 3 頭のうち 1 頭は畜主の希望によるものであり、2 頭は検査時にすでに排卵していたものである。処置後 3~5 日の間に授精して受胎したものは、A 群では 13 頭中 6 頭 (46.7%)、B 群では 13 頭中 7 頭 (53.9%)、C 群では 29 頭中 22 頭 (75.9%) であった。このうち処置後授精までの間に発情徴候を発現したものは、A 群では 9 頭中 6 頭 (66.7%)、B 群では 10 頭中 6 頭 (60.0%)、C 群では 28 頭中 21 頭 (75.0%) が受胎した。いっぽう、無発情排卵を示したものは、B 群では 3 頭中 1 頭、C 群では 1 頭中 1 頭が受胎したが、A 群では 4 頭全頭が不受胎であった。また、処置後 11~15 日の間に授精した C 群の 3 頭では 2 頭が受胎した。

なお、処置後 3~5 日の間の授精で不受胎に終わった牛 20 頭の発情回帰日数は、大多数は 18~22 日で正常性周期の範囲にあったが、C 群の 1 頭は 13 日で短く、A、B 両群の各 2 頭では 78~169 日で長かった。

初回授精後 13~22 日に回帰した次回発情時の授精によって、A 群では 4 頭のうち 3 頭、B 群では 4 頭のうち 2 頭、C 群では 7 頭のうち 6 頭が受胎した。

考 察

最近、KALTENBACH ら⁹⁾、HANSEL ら⁹⁾は、PGF_{2α} と合成 LH-RH を併用して排卵の同期化あるいは授精時期の集中化をはかる試みを行っている。

本試験では、PGF_{2α} 子宮内注入と合成 LH-RH の筋肉注射を併用した A 群および PGF_{2α} と合成 LH-RH の類縁物質を併用した B 群の処置後 60 時間以内における発情発現率は、PGF_{2α} 単一処置の C 群のそれと比べて大きな差異は認められなかった。しかし、処置後 61 時間以降に発情したものが C 群ではかなり多数みられたのに対し、A、B 両群では僅かであった。

いっぽう、処置後の排卵は A、B 両群では C 群と比べて早期にしかも短い時間帯に集中して起こった。このことは、A、B 両群において無発情排卵を示したいわゆる鈍性発情牛がかなり多数みられたことによるものであり注目される。PECK ら¹¹⁾は黄体後期に、また、MAUER ら⁹⁾は性周期同調の目的で progesterone を腔内挿入した後合成 LH-RH を投与して、これと同様のことを認めている。この原因として、MAUER ら⁹⁾は、外部発情徴候を発現するのに十分量の estrogen が卵胞から産生される前に排卵が誘起されるためであろうと述べている。

PGF_{2α} によって黄体を急激に退行した場合に LH の血中濃度が最高に達する時間は、PGF_{2α} の投与量¹²⁾ や

投与方法¹³⁾によって異なることが示されている。また、合成 LH-RH に対する下垂体の反応性は、合成 LH-RH の投与量¹⁰⁾、性周期の時期⁹⁾および estrogen 濃度^{14,15)}によってかなり異なることが示されている。これらのことから、排卵の同期化効果を高めるための両薬剤の最も効果的な投与方法については、さらに検討を必要とする。

なお、ラット^{7,8,16)}、家兎⁸⁾における合成 LH-RH-I の排卵誘起効果は、合成 LH-RH のその約 5 倍ないし 10 倍であることが認められている。本試験において、B 群では A 群と比べて早期に集中して排卵したものが多くみられたが、これは B 群では合成 LH-RH-I 投与時にすでに発情していたものが多かったことによると考えられるので、2 種の合成 LH-RH の排卵誘起効果を比較することは困難であった。

また、卵胞の発育、成熟の状態、排卵後に形成された黄体の発育および授精後の発情回帰日数は、A、B 両群とも大多数の牛においてほぼ正常と認められた。しかし、両群の各 1 頭は、初回発情時において卵胞の発育程度が不十分な状態で無発情排卵を示し、かつ排卵後に形成された黄体の発育が悪くその後卵巣静止に移行したことが注目される。このことは、生理条件の単なる個体差によるものか、あるいは個体の生理的及び内分泌の諸条件がある水準以下である場合に起こりうる合成 LH-RH に対する反応であるのか、この点は興味ある問題である。

HANSEL ら⁸⁾は、PGF_{2α} 処置後 60 時間に合成 Gn-RH を投与した場合の受胎率は、PGF_{2α} 単一処置のそれと比べて大差ないことを報告している。本試験においては、外部発情徴候を発現した牛の受胎率は、A、B、C 3 群の間に著しい差異はみられなかった。

しかし、無発情排卵を示したものでは、A、B 両群とも少数例であるが受胎成績は良くなかった。この原因としては、排卵前後の性ステロイドホルモンの分泌異常、量的不均衡が関与していたと考えられる。

以上の成績から、排卵の同期化に PGF_{2α} と合成 LH-RH を併用することは効果的であると思われるが、いっぽうこの処置により無発情排卵を示す牛がかなり多くみられ、かつこれらの受胎性が低いことは、野外応用上さらに検討を要する問題であろうと考えられる。

ml に溶解した prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) 3 mg あるいは 4 mg を黄体の存在する卵巣と同側の子宮角内に注入した後、52~56 時間に合成 LH-RH 200 μg (A 群 16 頭) あるいは合成 LH-RH の類縁物質 (ノナペプチド) 200 μg を筋肉注射 (B 群 13 頭) して、処置後の発情発現と排卵の状況および初回発情の受胎性を、PGF_{2α} 子宮内注入単一処置 (C 群 32 頭) のそれと比較検討して、つぎの成績を得た。

1. 発情発現は、処置後 37~72 時間に A 群では 10/16 頭 (62.5%)、B 群では 10/13 頭 (76.9%)、C 群では 26/32 頭 (81.3%) に集中して起こった。また、処置後 73~108 時間に発情したものは、C 群の 2/32 頭 (6.2%) のみで A、B 両群ではみられなかった。

2. 処置後 132 時間以内に無発情排卵を示した牛が、A 群では 6/16 頭 (37.5%)、B 群では 3/13 頭 (23.1%) にみられ、C 群の 1/32 頭 (3.1%) と比べてかなり多かった。

3. 排卵は、A 群では処置後 73~96 時間に 12/16 頭 (75.0%)、B 群では 61~84 時間に 11/13 頭 (84.6%)、C 群では 85~108 時間に 17/29 頭 (58.6%) に集中して起こった。また、処置牛の 80% 以上のものが排卵した時間帯は、C 群と比べて A 群では 12 時間、B 群では 24 時間短く、合成 LH-RH の併用によって排卵は早期に、しかも短い時間帯に集中して起こることを認めた。

4. 処置後 3~5 日の間の授精により、発情徴候を発現した牛では A 群で 6/9 頭 (66.7%)、B 群で 6/10 頭 (60.0%)、C 群で 21/28 頭 (75.0%) が受胎した。いっぽう、無発情排卵牛では、A、B、C 各群でそれぞれ 0/4 頭、1/3 頭、1/1 頭が受胎した。

5. 以上の成績から、PGF_{2α} と合成 LH-RH の併用によってかなり効果的に排卵を同期化することが可能なことを認めたが、この処置によって生ずる無発情排卵ならびにこれらの牛の低受胎性の原因については、今後の追究を必要とする。

稿を終わるに当たって、本試験に使用した PGF_{2α} を御提供下さった富士薬品工業株式会社、2 種の合成 LH-RH を御提供下さった武田薬品工業株式会社に深く感謝の意を表します。

(1975. 7. 30 受付)

要 約

文 献

放牧牛 61 頭 (ホルスタイン種 48 頭、日本短角種 13 頭) において、黄体期に蒸留水 0.75 ml あるいは 1.0

- 1) INSKEEP, E.K.: *J. Anim. Sci.*, **36**, 1149, 1973.
- 2) 中原(達)・金田(義)・百目鬼(郁)・山内(亮): 本

- 誌, 20, 62, 1974.
- 3) HANSEL, W. *et al.*: Annual Report of Cooperative Regional Research Project NE-72, Cornell University. 1973. (VM/SAC, 880, July 1974 から引用)
 - 4) 金田 (義)・中原 (達)・百目鬼 (郁): 本誌, 21, 18, 1975.
 - 5) 中原 (達): 家畜試験報, 62, 174, 1971.
 - 6) KALTENBACH, C.C., T.G. DUNN, T.E. KISER, L.R. CORAH, A.M. AKBAR & G.D. NISWENDER: *J. Anim. Sci.*, 38, 357, 1974.
 - 7) FUJINO, M., S. KOBAYASHI, M. OBAYASHI, S. SHINAGAWA, T. FUKUDA, C. KITADA, R. NAKAYAMA, I. YAMAZAKI, W.F. WHITE & R.H. RIPPEL: *Biochem. Biophys. Res. commun.*, 49, 863, 1972.
 - 8) FUJINO, M., S. SHINAGAWA, I. YAMAZAKI, S. KOBAYASHI, M. OBAYASHI, T. FUKUDA, R. NAKAYAMA, W.F. WHITE & R.H. RIPPEL: *Arch Biochem. Biophys.*, 154, 488, 1973.
 - 9) MAUER, R.E. & R.H. RIPPEL: *J. Anim. Sci.*, 35, 249 (Abstr.), 1972.
 - 10) ZOLMAN, J., E.M. CONVEY, J.H. BRITT & H.D. HAFS: *Proc. Soc. Experi. Biol. Med.*, 142, 189, 1973.
 - 11) PECK, C.C., J.R. REEL, W.C. DERMODY & R.W. COPPOCK: *J. Anim. Sci.*, 37, 300 (Abstr.), 1973.
 - 12) STELLUFLUG, J.N., T.M. LOUIS, B.E. SEGUIN & H.D. HAFS: *J. Anim. Sci.*, 37, 330 (Abstr.), 1973.
 - 13) LOUIS, T.M., H.D. HAFS & B.F. SEGUIN: *Proc. Soc. Experi. Biol. Med.*, 143, 152, 1973.
 - 14) WETTEMANN, R.P., H.D. HAFS, L.A. EDGERTON & L.V. SWANSON: *J. Anim. Sci.*, 34, 1020, 1972.
 - 15) ZOLMAN, J., E.M. CONVEY & J.H. BRITT: *J. Anim. Sci.*, 39, 355, 1974.
 - 16) 梅津 (元)・三浦 (源)・竹内 (三): 本誌, 20, 101, 1974.

Summary

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) and two synthetic LH-RH preparations; i.e. pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (LH-RH) and its analog [Des-Gly-NH₂¹⁰, Pro-ethylamide⁹]-LH-RH (LH-RH-I), were used for the estrous synchronization in the grazing cows, and the occurrence of estrus, ovulation after the treatments and the fertility at the first synchronized estrus were investigated.

A total of 61 cows (48 Holstein and 13 Japanese Shorthorn) in the luteal stage of the estrous cycle were allotted to three experimental groups; i.e. Group A including 16 cows received a single intrauterine infusion of 3 mg or 4 mg of $PGF_{2\alpha}$ and an intramuscular (i.m.) injection of 200 μ g of LH-RH, Group B including 13 cows received the same $PGF_{2\alpha}$ treatment as in Group A and an i.m. injection of 200 μ g of LH-RH-I, and Group C including 32 cows received the $PGF_{2\alpha}$ treatment alone. Each dose of $PGF_{2\alpha}$ dissolved in 0.75 ml or 1.0 ml of aq. distillata was deposited through the cervix into the uterine horn ipsilateral to the corpus luteum. LH-RH and LH-RH-I preparations dissolved in 5.0 ml of aq. distillata was injected during the period between 52 and 56 hr after the $PGF_{2\alpha}$ treatment.

Estrus occurred in 10 (62.5%) of 16 cows in Group A, 10 (76.9%) of 13 cows in Group B and 26 (81.3%) of 32 cows in Group C during the period of 37~72 hr after the $PGF_{2\alpha}$ treatment. Estrus did not occur during the period of 73~108 hr in all cows of three groups except two (6.2%) in Group C. Quiet ovulation was observed in 6 cows (37.5%) in Group A, in 3 cows (23.1%) in Group B and in 1 cow (3.1%) in Group C within 132 hr after the treatment. The remaining 3 cows in Group C exhibited estrus between the period of 11 and 15 days.

Ovulation occurred in 12 (75.0%) of 16 cows during the period of 73~96 hr in group A, in 11 (84.6%) of 13 cows during the period of 61~84 hr in Group B and in 17 (58.6%) of 29 cows during the period of 85~108 hr in Group C. The interval elapsing from the treatment to the time that ovulation being detected in more than 80% of cows in Group A and B were shortened by 24 hr and 12 hr, respectively, as compared to that in Group C.

In the cow that exhibited behavioral estrus, the conception rates were 66.7% (6 of 9 cows) in

Group A, 60.0% (6 of 10 cows) in Group B and 75.0% (21 of 28 cows) in Group C by the insemination during 3~5 days of the post treatment period. Whereas, the cow which occurred quiet ovulation in Group A, B and C conceived in 0 of 4, 1 of 3 and 1 of 1, respectively.

These results suggest that an intramuscular injection of synthetic LH-RH preparations following an intrauterine infusion of $\text{PGF}_{2\alpha}$ during the luteal stage of the estrous cycle may be applicable to the synchronization of ovulation in cows. However, the cause of the occurrence of quiet ovulation and the low fertility of the cow which showed dull estrus followed by the treatments must be further investigated.