合成 LH-RH による牛の排卵誘起に関する研究

1. 分娩後の排卵誘起及び排卵障害の治療

山内 亮*・仮屋堯由**・田中幹郎・佐々木伸雄

(東京大学農学部)

1971 年に LH-RH が SCHALLY 一派によって豚の視床下部から分離され、構造決定に続いて合成が可能となり、ついで種々の LH-RH アナログが合成されるようになったが、最近これらを家畜の LH や FSH を放出させる手段として応用する試みがなされるようになった。すなわち牛、羊、豚などについて、分娩後の排卵の誘起、排卵率や受胎率の向上、羊の双胎率の増加、牛の卵胞嚢腫の治療への応用が検討されている。著者らは国内で開発された合成 LH-RH アナログを用いて牛の排卵誘起を企画し、まず分娩後の排卵誘起及び排卵障害の治療を試みたのでここに報告する。この成績の一部は第 82 回日本獣医学会 (1976) に報告した。

材料及び方法

使用した LH-RH アナログは FUJINO ら¹⁾によって合成されたもので、decapeptide である LH-RH (Pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) の C 末端 10 位の Gly-NH₂ を ethylamide で置換した nonapeptide ethylamide である [des-Gly-NH₂¹⁰-LH-RH-ethylamide] (LH-RH-A と略) で、FUJINO ら²⁾によれば LH-RH そのものに比べて *in vitro* で雄ラットの前葉からの LH 及び FSH 放出効果が約 3 倍、diestrous ラット及び持続性発情家兎における排卵誘起効果が約 6 倍強いと認められているものである。

牛の実験は 1974 年 7 月～1976 年 3 月の間に主として山梨県豊茂地区、静岡県富士宮地区で行った。

現所属：*日本獣医畜産大学；**農林水産省畜産試験場
Effects of synthetic LH-RH on ovulation in the cow. 1. Induction of ovulation in postpartum cows and cows with ovulation failure.

YAMAUCHI, Makoto*; Takayoshi KARIYA**; Mikio TANAKA & Nobuo SASAKI (Department of Veterinary Surgery and Obstetrics, Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113. Present address: *Nippon Veterinary and Zootechnical College, Musashino-shi, Tokyo 180; **National Institute of Animal Industry, Chiba-shi 280) *Japan. J. Anim. Reprod.* 25 (1), 1979.

1. 分娩後の排卵誘起

実験牛は年齢 3～11 才、1～8 産で、分娩後 12～53 日 (平均 26.1 日) を経過して未だ発情を示さない乳牛で、直腸検査によって卵巢静止の状態にあると認められるもの 20 頭を用いた。これらに対して排卵誘起の目的で、2 頭には LH-RH-A 2,000 μ g を 1 回に、残りの 18 頭には 200 μ g と 100 μ g を約 90 分の間隔で、それぞれ水溶液として筋肉内に注射した (表 1)。注射を 2 回行ったのは、KITTOK ら³⁾が乳牛に LH-RH を 100 μ g ずつ 120 分間隔で 2 回注射すると、血中の LH 量が 1 回注射後よりも 2 回注射後に著明に増加すると報告していることを考慮したものである。注射後発情の発現した牛には人工授精を行い、また排卵の有無を直腸検査によってしらべた。

2. 排卵障害の治療

材料牛は年齢 4～7 才の分娩後 60 日以上を経過した乳牛で、発情が 2～3 日以上持続し、かつ直腸検査によって发育卵胞が触知されることまたは黄体期に相当する時期に黄体形成の認められないことから排卵遅延または無排卵と診断された 11 頭を用いた。これらに対して排卵誘起の目的で、LH-RH-A 100～300 μ g を 1 回筋肉内に注射し、ついで人工授精を行った。注射後は排卵の有無を直腸検査によって追跡した (表 3)。

結 果

1. 分娩後の排卵誘起

実験の結果は表 1 に示した通りで、LH-RH-A を注射した 20 頭中 15 頭 (75.0%) に注射後 7～23 日、平均 14.9 $\pm$ 4.8 (SD) 日に排卵が誘起され、これに伴って 14 頭に発情が発現し、1 頭は鈍性発情であった。残りの 5 頭中 3 頭には注射後 34 日以後に発情、排卵が起こったが、これらは LH-RH-A 注射の効果とは認め難く、排卵の誘起されなかった 2 頭とともに反応陰性と判定した。注射後 23 日以内に発情の発現した 14 頭中 12 頭に人工授精が行われ、8 頭 (8/12: 66.7%, 8/20: 40.0%) が 1～2 回の授精で受胎した。不受胎の 4 頭中 2 頭

Table 1. Induction of ovulation in postpartum cows treated with LH-RH analog

Cow No.	LH-RH treatment (im)		Estrus and ovulation	Days from LH-RH treat. to ovulation	Days from calving to ovulation	Pregnancy (Number of AI)	Result
	Dose (μ g)	Interval (min)					
1	2000		+	11	23	/	+
2	"		+	18	38	/	+
3	200~100	90'	⊕	16	36	+ (1)	+
4	" ~ "	"	⊕	7	35	+ (2)	+
5	" ~ "	"	⊕	16	42	+ (2)	+
6	" ~ "	"	⊕	23	54	-† (1)	+
7	" ~ "	60'	⊕	10	34	+ (2)	+
8	" ~ "	75'	⊕	8	24	-† (1)	+
9	" ~ "	60'	+**	13	31		+
10	" ~ "	"	⊕	24	51	- (1)	+
11	" ~ "	"	-				-
11'	" ~ "	90'	⊕	15	55	+ (2)	+
12	300~200	45'	⊕	15	68	+ (2)	+
13	200~100	90'	⊕	18	48	- (2)	+
14	" ~ "	"	-				-
15	" ~ "	"	⊕	16	47	+ (1)	+
16	" ~ "	"	⊕	13	38	+ (1)	+
17*	" ~ "	"	⊕	34	66	+ (1)	-
18*	" ~ "	"	⊕	48	69	- (1)	-
19*	" ~ "	"	⊕	64	83	+ (1)	-
Mean or Total				14.9±4.8 (SD)	39.8±12.8 (SD)	8/12 (66.7%)	15/20 (75.0%)

* Excluded from positive cases.

○ Served by AI.

** Silent ovulation.

† Endometritis.

Table 2. Hastening of ovulation in multiparous cows treated with LH-RH analog

Cow No.	Days from former calving to 1st estrus (Control period)	Days from last calving to 1st ovulation (Treatment period)
1	65	23
2	55	38
3	86	36
5	123	42
6	56	54
7	50	34
8	60	24
10	204	51
11'	282	55
15	61	47
Mean±SD	104.2±78.1	40.4±11.5*

* $P < 0.05$

には子宮内膜炎が認められた。

排卵が誘起された 15 頭における分娩から排卵までの経過は 23~68 日, 平均 39.8 ± 12.8 (SD) 日であった。

これらのうち 2 産以上の牛で, 前の産次の分娩から発情発現までの日数が記録によって判明している 10 頭について, これらと今回の分娩から誘起排卵までの日数を比較すると, 表 2 に示すように前者が平均 104.2 ± 78.1 (SD) 日であったのに比べ, 後者は 40.4 ± 11.5 (SD) 日で, 有意の短縮 ($P < 0.05$) が認められた。これらの成績から, 分娩後卵巣が静止の状態にある乳牛に対して LH-RH-A を注射することにより発情, 排卵の回帰が促進される可能性が認められた。

2. 排卵障害の治療

表 3 に示したように, LH-RH-A を注射した 11 頭の全例に注射後 24~48 時間の間に排卵が誘起されたことが触診によって認められた。注射後に人工授精を行った 10 頭中 5 頭 (50.0%) がこの時の授精で, また無処置で迎えた次回の発情期の授精で 2 頭が受胎した (計 70.0%)。これらのうち無排卵と診断された 1 頭 (2 例) における治療成績を図 1 に示した。これらの成績から, 排卵障害牛に対して LH-RH-A を投与することによって排卵が誘起されて治療効果のあることが認められた。

Table 3. Treatment of ovulation failure in dairy cows by intramuscular injection of LH-RH analog

Cow No.	Estrus	Ovaries	Diagnosis	Injection of LH-RH (μ g)	Ovulation (Days after treatment)	Pregnancy (Number of AI)
1	2nd day	DF 1, DCL 1	Delayed ov.	100 AI	+ (2)	+ (2)
2	2nd day	DF 1, DCL 1	"	100 AI	+ (1)	+ (1)
3	—	MF 1	Anovulation	300	+ (2)	/
3'	3rd day	DF 1	"	300 AI	+ (1)	+ (1)
4	2nd day	DF 1	Delayed ov.	300 AI	+ (1)	+ (1)
5	Silent	DF 1, DCL 1	"	300 AI	+ (1)	—
6	5th day	DF 1, DCL 1	"	100 AI	+ (1)	+ (1)
7	2nd day	DF 1	"	200 AI	+ (2)	+ (1)
8	2nd day	DF 1, DCL 1	"	200 AI	+ (1)	—*
9	2nd day	DF 1, DCL 1	"	200 AI	+ (1)	—*
10	3rd day	DF 1	"	200 AI	+ (1)	+ (2)
Total				100~300	11/11 (1~2)	7/10

DF: Developed follicle.

MF: Medium follicle.

DCL: Degenerated corpus luteum.

*: Endometritis.

Fig. 1. Treatment of anovulation in a dairy cow by intramuscular injection of LH-RH analog.

考 察

分娩後の牛に LH-RH を投与して発情、排卵の回帰を促進しようとする試みが最近かなり行われている。すなわち、SCHAMS ら⁴⁾は分娩後 12~18 日の牛 6 頭に LH-RH 1,500 μ g を筋肉内注射したところ、血中の LH 濃

度は 60 分後に約 35 ng/ml のピークを示し、急速に卵胞が発育し、翌日排卵が誘起されたと報じている。また BRITT ら⁵⁾は分娩後 14 日の乳牛 20 頭の皮下に LH-RH 100 μ g を含んだゲラチンカプセルを植込んだところ、血中の LH 値は 4 時間後に 15.0 ± 1.9 ng/ml のピークを示し、排卵が分娩後 14.4 ± 0.6 日に起こり、無処置の対照牛 8 頭における 23.6 ± 2.6 日に比べ促進されることを認めた。FERNANDES ら⁶⁾は分娩後 3, 10, 20, 30, 40 日の乳牛各 5 頭に LH-RH 100 μ g を筋肉内注射して血中 LH 値の変動をしらべた結果、2 時間後の各群のピークの平均値がそれぞれ 3.31, 12.47, 17.77, 14.64, 15.92 ng/ml で、彼らはこの結果から前葉の LH-RH に対する反応性は分娩後 10 日以降にならないと回復しないと結論しており、KESLER ら⁷⁾もほぼ同様のことを述べている。また BRITT⁸⁾は分娩後 2 週間目の牛に LH-RH を投与すると翌日排卵が誘起されるが、発情休止期または発情前期にある牛に LH-RH を投与しても排卵誘起効果はみられないと述べている。いっぽう STUDER ら⁹⁾は分娩後 50 日を経て子牛を哺乳中で、卵巢静止の状態にある肉牛 7 頭に LH-RH 500 μ g を注射したが、対照牛に比べてとくに卵巢機能の促進はみられなかった。また MANNS ら¹⁰⁾は分娩後 11 日目の搾乳牛に LH-RH 500 μ g 単独、LH-RH+10 mg estradiol 17- β , estradiol 単独、LH-RH+estradiol+25 mg PGF_{2 α} などの投与を行ったところ、血中 LH のピークは LH-RH 単独投与群において最高値を示したが、性周期の回帰はこれら

の処置によってとくに促進されなかったと報じている。

乳牛の分娩後の卵巢周期の回帰は一般に飼養、環境、搾乳などの条件に左右されるところが大きいと認められている。著者らが今回行った排卵誘起実験では厳密な意味での対照区を設けることができなかったが、実験牛のうち前産次における分娩から発情発現までの日数の判明している個体について、これらと今回の日数を比較した結果、今産次において有意の短縮が認められたことから、LH-RH-A の注射により分娩後の発情、排卵の回帰が促進されたものと推察される。

牛の排卵障害の治療については、LH-RH-A 100~300 μg を発情期に 1 回注射した 11 頭の全例に 1~2 日の間に排卵誘起が確認され、かつ受胎成績も正常であることから、本剤投与による治療効果があることが認められた。牛に LH-RH を投与すると、血中 LH 濃度は急速に上昇し、2 時間前後でピークに達することが認められている^{3,9,11~13)}が、著者らが排卵障害牛に本剤を投与した際にも同様に血中 LH 濃度が上昇し、その結果排卵が誘起されたものと考えられる。また本剤投与後 1~2 日の間に排卵が誘起されたが、牛の性周期における血中 LH サージは排卵前 6~32 時間に起こると報告されている^{14~16)}ことから、今回の治療においても本剤の投与が正常周期における排卵前の LH サージと同じような効果をもたらしたものと推察される。

GRUNERT¹⁷⁾は牛の人工授精の際に LH-RH 1,000~1,500 μg または HCG 1,000~1,500 IU を注射すると受胎率が有意に向上することを認め、その理由として受胎の妨げになっている排卵遅延がこれらの処置によって改善されることをあげている。GÜNZLER ら¹⁸⁾も牛の分娩後最初の人工授精の際に LH-RH 400 μg を注射することにより受胎率の有意の向上が得られたと報告している。なお最近 BRITT ら¹⁹⁾が分娩後 8~23 日、平均 14.8 $\pm$ 0.4 日の乳牛 106 頭に LH-RH 200 μg を注射したところ、その後不妊の理由で廃用されるものが対照群 98 頭における 57% に比べて 26% と少なく、とくに卵胞嚢腫の発生率が対照群の 15.2% に比べ 5.7% と低かったことから、分娩後の乳牛への LH-RH の投与が繁殖障害の発生を予防する上に意義があると示唆していることは興味深い。

要 約

最近国内で開発された合成 LH-RH アナログ (des-Gly-NH₂¹⁰-LH-RH-ethylamide; LH-RH-A と略) を乳牛に投与して分娩後の排卵誘起及び排卵障害の治療を試

みた。

1. 分娩後の排卵誘起: 分娩後 12~53 日 (平均 26.1 日) を経過して卵巢静止の状態にある乳牛 20 頭を用い、2 頭には LH-RH-A 2,000 μg を 1 回に、18 頭には 200 μg 及び 100 μg を約 90 分の間隔で 2 回に亘りそれぞれ水溶液として筋肉内に注射した。その結果、20 頭中 15 頭 (75.0%) に注射後 7~23 日、平均 14.9 $\pm$ 4.8 (SD) 日に排卵が誘起され、これに伴って 14 頭に発情が発現し、1 頭は鈍性発情であった。正常発情を示したもののうち 12 頭に人工授精が行われ、8 頭 (66.7%) が 1~2 回の授精で受胎した。排卵の誘起された 15 頭における分娩から排卵までの経過は 23~68 日、平均 39.8 $\pm$ 12.8 (SD) 日であった。これらのうち 2 産以上の牛で、前回の分娩から発情発現までの日数の判明しているもの 10 頭について、これらと今回の分娩から誘起排卵までの日数を比較すると、前者の平均 104.2 $\pm$ 78.1 (SD) 日に対し後者は 40.4 $\pm$ 11.5 (SD) 日で有意の短縮 ($P < 0.05$) が認められた。

2. 排卵障害の治療: 発情が 2~3 日以上持続し、排卵遅延または無排卵と診断された乳牛 11 頭に LH-RH-A 100~300 μg を 1 回筋肉内注射し、ついで人工授精を行った。その結果、全例に注射後 1~2 日の間に排卵が誘起され、人工授精を行った 10 頭中 5 頭がこの時の授精で、また 2 頭が無処置の次回発情期の授精で受胎した。この成績から LH-RH-A の投与は牛の排卵障害の治療に有効であると認められた。

終わりに本研究に合成 LH-RH アナログを提供して下さった武田薬品工業株式会社に感謝するとともに、野外実験に協力頂いた山梨県豊茂家畜診療所、静岡県富士開拓農協、富士宮家畜診療所、森永乳業富士工場、茨城県美野里家畜診療所の各位に謝意を表します。

(1978. 7. 26 受付)

文 献

- 1) 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.
- 2) FUJINO, M., I. YAMAZAKI, S. KOBAYASHI, T. FUKUDA, S. SHINAGAWA, R. NAKAYAMA, W. F. WHITE & R. H. RIPPEL: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57, 1248, 1974.
- 3) KITTOCK, R. J., J. H. BRITT & E. M. CONVEY: *J. Anim. Sci.* 37, 985, 1973.

- 4) SCHAMS, D., F. HÖFER, B. HOFFMAN, M. L. ENDER & H. KARG: *Acta Endocrinol. (Kbh)*, Suppl. 177, 296, 1973.
- 5) BRITT, J. H., R. J. KITTOCK & D. S. HARRISON: *J. Anim. Sci.* 39, 915, 1974.
- 6) FERNANDES, L. C., W. W. THATCHER & C. J. WILCOX: *J. Anim. Sci.* 42, 269, 1976.
- 7) KESLER, D. J., H. A. GARVERICK, R. S. YOUNGQUIST, R. G. ELMORE & C. J. BIERCHWAL: *J. Anim. Sci.* 43, 291, 1976.
- 8) BRITT, J. H.: *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 15, 221, 1975.
- 9) STUDER, E. & A. HOLTAN: *Vet. Med. / Small Anim. Clinician* 1047, 1975.
- 10) MANNS, J. G. & G. RICHARDSON: *Can. J. Anim. Sci.* 56, 467, 1976.
- 11) SEGUIN, B. E., E. M. CONVEY & W. D. OXENDER: *Amer. J. Vet. Res.* 37, 135, 1976.
- 12) CONVEY, E. M., W. E. BEAL, B. E. SEGUIN, K. J. TANNEN & Y. C. LIN: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151, 84, 1976.
- 13) SEGUIN, B. E., W. D. OXENDER & J. H. BRITT: *Amer. J. Vet. Res.* 38, 1153, 1977.
- 14) HENRICKS, D. M., J. K. DICKEY & G. D. NISWENDER: *Biol. Reprod.* 2, 346, 1970.
- 15) SWANSON, L. V. & H. D. HAFS: *J. Anim. Sci.* 33, 1038, 1971.
- 16) CHRISTENSEN, D. S., M. L. HOPWOOD & J. N. WILTBank: *Ibid.* 38, 577, 1974.
- 17) GRUNERT, E.: *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 53, 558, 1976.
- 18) GÜNZLER, O., H. KRIEGER & E. JORDAN: *Berlin u. Münch. Tierärztl. Wschr.* 89, 451, 1976.
- 19) BRITT, J. H., D. S. HARRISON & D. A. MORROW: *Amer. J. Vet. Res.* 38, 749, 1977.

Summary

1. Twenty dairy cows with quiescent ovaries were given synthetic LH-RH analog for inducing ovulation at 12~53 days (av. 26.1 days) postpartum. Intramuscular injections with 200 μ g and 100 μ g LH-RH at about 90 minutes interval were performed in these cows except 2 animals in which 2000 μ g of LH-RH were administered by single intramuscular injection. Ovulation was induced 7~23 days (14.9 ± 4.8 (SD) days) after the treatment in 15 (75.0%) of 20 cows. The ovulation was preceded by estrus in these cows except 1 animal of silent ovulation. Eight (66.7%) of 12 cows which were served by 1~2 inseminations during the induced estrus became pregnant (Table 1). Mean days from the last calving to the 1st ovulation for 10 cows treated with LH-RH (treatment period: 40.4 ± 11.5 (SD) days) were significantly shorter ($P < 0.05$) than those from former calving to the 1st estrus for the same cows (control period: 104.2 ± 78.1 (SD) days) (Table 2). From these results it seems that LH-RH is effective to induce estrus and ovulation in postpartum dairy cows.

2. Eleven dairy cows, exhibiting estrus for 2~3 days, diagnosed as delayed ovulation or unovulation were treated with a single intramuscular injection of 100~300 μ g LH-RH. The treatment was followed by artificial insemination in 10 cows. Ovulation was induced within 1~2 days after the injection in all of the treated animals. Five cows (50.0%) conceived after the 1st insemination and 2 cows became pregnant by the 2nd insemination performed during the next untreated estrous period (Table 3). Ovarian responses to LH-RH in 2 cases of unovulation are shown in Fig. 1. The results indicate that LH-RH is effective to treat ovulation failure in dairy cows.