合成 LH-RH による牛の排卵誘起に関する研究

2. 内視鏡による誘起排卵の観察

山内 亮*・田中幹郎・仮屋堯由**

(東京大学農学部)

著者らは国内で開発された合成 LH-RH アナログを野外の乳牛に投与して排卵誘起効果のあることを前に報告した¹⁾。しかしこの野外実験における排卵誘起効果の判定は全て直腸検査によって行われたものであった。そこで新たに実験牛についてこの LH-RH アナログを投与して排卵誘起を行い、内視鏡によって卵巣の反応を直接観察するとともに写真撮影を行ったのでここに報告する。この成績の一部は第 83 回日本獣医学会 (1977) に報告した。

材料及び方法

1. 実験牛

実験牛はつぎに示す 5 頭を使用した。

牛 No. 1: 年齢不詳, 8 産以上と推定される褐毛和種で, 使用前 3 カ月間右卵巣に中型卵胞 1 個が存続するだけで, 卵巣静止の状態にあり, 無発情であった。

牛 No. 2: 1 才, 未経産のホルスタイン種で, 使用前に 3 回以上ほぼ正常な性周期を示し, 発情徴候も明瞭で, 排卵も行われ, 卵巣機能は正常と認められた。

牛 No. 3: 2 才, 未経産のホルスタイン種で, 使用前に 3 回以上正常な性周期を示し, 卵巣機能は正常と認められた。

牛 No. 4: 年齢不詳, 3 産以上と推定されるホルスタイン種で, 使用前に 4 回以上ほぼ正常な性周期を示し, 発情徴候も明瞭で排卵も行われるが, 卵胞が同時に

数個発育したり, 黄体期に卵胞が発育したり, 黄体形成不全とみられる場合があるなどの点から卵巣機能は正常とは認め難かった。

牛 No. 5: 2 才, 牛 No. 2 と同一個体で, 1 回本実験に使用した後約 17 カ月を経て再び実験に供したものであるが, 前回と異なり卵巣静止の状態にあり, 無発情であった。

2. ホルモン剤の投与

1) ホルモン剤: i. PMS; 排卵誘起の前処置として, 複数の卵胞の発育を促す目的で使用した。ii. 合成 LH-RH アナログ; 前報¹⁾の野外実験に使用したのと同じ FUJINO 社²⁾によって合成された [des-Gly-NH₂¹⁰-LH-RH-ethylamide] (LH-RH-A と略) で, 排卵誘起の目的で使用した。

2) 投与方法: 5 頭の実験牛におけるホルモン剤投与の時期と用量を一括して表 1 に示したが, LH-RH-A の投与はいずれも PMS の前処置後 1~4 日目に数個の卵胞が発育したことを触知した上で行った。LH-RH-A の投与は 90 分の間隔を置いて 2 回行ったが, 2 回投与した理由は前報の野外実験の場合と同じである。以下各例におけるホルモン剤投与の条件と卵巣の状態について述べる。

牛 No. 1: 卵巣静止のこの牛に前処置として PMS 3,000 IU を筋肉内注射した。図 1 に示す様に, 2 日後に左卵巣に中型の卵胞 1 個が発育したほか小卵胞 2 個が触知され, 右卵巣の以前から存続していた中型卵胞がやや発育した。この様に計 4 個の卵胞の発育を触知した上で, LH-RH-A 600 µg と 300 µg を筋注した。内視鏡による卵巣の観察は LH-RH-A 注射後 2 日目と 10 日目の 2 回行った。

牛 No. 2: 右卵巣に退行期の黄体があり, 左右の卵巣に各 1 個の中型卵胞が発育している所見から, 発情前期と認められる時期に PMS 1,000 IU を筋注した。図 2 に示す様に, PMS 注射の翌日発情が発現し, 左右の卵巣にそれぞれ 2 個計 4 個の卵胞の発育を触知した上で, LH-RH-A 300 µg と 200 µg を筋注した。内視鏡による

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. 2. Observation of induced ovulation by endoscopy.

YAMAUCHI, Makoto*, Mikio TANAKA & Takayoshi KARIYA** (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.

Table 1. Experimental cows

Cow No.	Breed	Age (Yr)	Partus	Previous estrous cycle length (Days)
1	Japanese Brown	?	8<	Anestrus (Quiescent ovaries contained 1 persistent foll.)
2	Holstein	1	0	20, 19, 18
3	Holstein	2	2	20, 20, 19
4	Holstein	?	3<	20, 20, 18, 21
5	Holstein	2	0	Anestrus (Quiescent ovaries)

Table 2. Hormonal treatments

Cow No.	Intramuscular injection of PMS (Pretreatment)		Intramuscular injections of LH-RH-Analog			
	Stage of estrous cycle	Dose (IU)	Days after pretreatment	Ovaries	Dose (μ g)	Interval (min.)
1	Anestrus (1 persistent follicle)	4,000	2	3 Developing F. 1 Persistent F.	600 & 300	90
2	Proestrus	1,000	1	4 Developing F.	300 & 200	90
3	Metestrus (2 days after ovulation)	2,000	2	3 Developing F. 1 Developing CL.	300 & 200	90
4	Proestrus	2,000	4	4 Involuting F. 1 Postovulatory F.	600 & 300	90
5	Anestrus (Ovarian quiescence)	1,000	1	5 Developing F.	300 & 200	90

Fig. 1. Ovarian reactions to LH-RH analog in cow No. 1.

卵巣の観察は本剤投与の翌日と 12 日目の 2 回行ったが、第 1 回の内視の際に存続する卵胞の排卵を誘起する目的で LH-RH-A 200 μ g の筋注を再行した。

牛 No. 3: 発情終了後 2 日目で、左卵巣に新生黄体があり、右卵巣に卵胞 1 個が存続している状態で PMS 2,000 IU を筋注した。図 3 に示す様に、2 日後に発育

中の黄体のほか合計 3 個の卵胞の発育を触知した上で LH-RH-A 300 μ g と 200 μ g を筋注した。内視鏡観察は本剤投与の翌日と 8 日目の 2 回行った。

牛 No. 4: 性周期の 17 日目で、左卵巣に退行期の黄体、左右の卵巣に各 1 個の発育卵胞の存在する状態で PMS 2,000 IU を筋注した。図 4 に示す様に、4 日後に

Fig. 2. Ovarian reactions to LH-RH analog in cow No. 2.

Fig. 3. Ovarian reactions to LH-RH analog in cow No. 3.

合計 5 個発育した卵胞のうち 1 個が排卵し、4 個の存在を触知した上で LH-RH-A 600 μ g と 300 μ g を筋注した。この 1 個の排卵はこの牛の性周期における本来の排卵と認められた。内視鏡観察は本剤投与後 7 日目に 1 回行った。

牛 No. 5: 卵巢静止の状態において PMS 1,000 IU を筋注した。図 5 に示す様に、PMS 注射の翌日合計 5 個の卵胞の発育を触知した上で LH-RH-A 300 μ g と 200 μ g を筋注した。内視鏡観察は本剤投与後 2 日目に 1 回行った。

3. 内視鏡による卵巢の観察

1) 内視鏡: 内視鏡はオリンパス光学 KK 製大腸 Fiberscope CF type MB₂, 光源は同社製 CLE-3 型をそれぞれ用いた。

2) 観察方法: 牛を柵場内に保定し、一侧の膝部を剪毛、消毒して、2% 塩酸プロカインで局所麻酔を行い、腹壁を約 20 cm 切開し、この切開口から腹腔に手を挿入して卵巢を把握する。さらにこの切開口から内径 5 cm、長さ 60 cm の滅菌した塩化ビニール製円筒を別の手で導入し、卵巢を円筒の先端部の内側に誘導して保

Fig. 4. Ovarian reactions to LH-RH analog in cow No. 4.

Fig. 5. Ovarian reactions to LH-RH analog in cow No. 5.

持する。これは腸管などが卵巣を覆って観察を妨げるのを防ぐためである。ついでこの円筒内に Fiberscope を挿入し、卵巣に接近させて観察と写真撮影を行った。観察後は腹壁を縫合したうえ、術後感染防止のためマイシリン 10 万単位を筋注した。この方法では一側の臍部からの Fiberscope の挿入で左右の卵巣の観察が可能であるが、同一牛で内視鏡観察を再行する場合は、反対側の臍部を同様に切開して行った。

結 果 (内視鏡による卵巣の所見)

内視鏡によって観察した個々の実験牛における卵巣の反応を以下に述べる。

牛 No. 1: LH-RH-A 注射に対する卵巣の反応は図 1 に示した。投与後 2 日目に行った内視鏡観察では、左卵巣に排卵後 24 時間以内の出血卵泡 3 個が認められ(図 6)、右卵巣には前から存続する发育卵泡 1 個が認められた。10 日目に行った 2 回目の内視では、左卵巣の前

回の 3 個の排卵の跡にそれぞれ黄体が形成されているのが認められ(図 7), 右卵巢では前回の発育卵胞が排卵して、機能的黄体が形成されていた。これらの所見から、この牛では LH-RH-A 投与により合計 4 個の排卵が誘起されたものと判定された。

牛 No. 2: LH-RH-A 投与後の卵巢の動きは図 2 に示した。投与の翌日行った内視鏡観察では、左卵巢にこの牛本来のものと推察される排卵後間もない卵胞 1 個と、3 個の発育卵胞が認められ、右卵巢には排卵直後の卵胞 1 個と 2 個の発育卵胞が認められた。内視鏡観察中に右卵巢の発育卵胞の 1 個に指圧を加えたところ簡単に破裂し、卵胞液が流出した後、破裂口から出血がみられた。12 日目に行った内視では、左卵巢に本来の排卵に由来する黄体の他に大きな黄体 1 個及び黄体と卵胞の区別をつけ難いもの 4 個が認められ、右卵巢には破裂(人工排卵)に由来する黄体を含めて機能的黄体 3 個が認められた(図 8)。これらの所見から、この牛では性周期に伴う本来の黄体以外に少なくとも 4 個の排卵が誘起されたものと判定された。

牛 No. 3: LH-RH-A 投与による卵巢の反応は図 3 に示した。投与の翌日行った内視鏡観察では、左卵巢に本来の排卵に由来する新生黄体の他に 2 個の発育卵胞が、右卵巢にも 2 個の発育卵胞がそれぞれ認められたが、これらのうち 3 個は投与後 2 日目に排卵しているのが触知された。8 日目に行った内視では、左卵巢に本来の黄体の他に 2 個の機能的黄体が認められ(図 9), 右卵巢に 1 個の機能的黄体と 2 個の囊腫様出血卵胞が認められた。これらの所見から、本牛では本来の排卵以外に 3 個の排卵が誘起されたものと判定された。

牛 No. 4: 卵巢の反応は図 4 に示した通りで、LH-RH-A 投与後 7 日目に行った内視鏡観察では、左卵巢に本来の排卵に由来する黄体の他に排卵後形成された機能的黄体 2 個が認められ(図 10), 右卵巢には同様の黄体が 5 個認められた(図 11)。これらの所見から本例では本来の排卵以外に合計 7 個の排卵が誘起されたものと判定された。

牛 No. 5: 卵巢の反応は図 5 に示した通りで、本剤投与後 2 日目に行った内視鏡観察において、左卵巢に排卵後 24 時間以内の出血卵胞 4 個が認められ(図 12), 右卵巢にも同様の排卵後の出血卵胞 4 個と発育卵胞 1 個が認められた(図 13)。これらの所見から、本例では合計 8 個の排卵が誘起されたものと判定された。

以上の実験牛 5 頭における卵巢の内視鏡観察を通じて、PMS の前処置により数個の卵胞の発育した状態で

LH-RH-A を投与することにより、1~2 日の間に 3~8 個の排卵が誘起されたことが確認された。

考 察

上述の牛の排卵誘起実験において、まず卵胞の発育を促す目的で前処置として PMS 1,000~4,000 IU を投与し、1~4 日後に数個の卵胞の発育を触知した上で LH-RH-A を投与したが、この位の量の PMS を牛に投与すれば、単独でも排卵が起こることが知られている。しかし杉江ら³⁾、芦田ら⁴⁾、山内ら⁵⁾、藺守ら⁶⁾、村山ら⁷⁾によると、牛における過剰排卵誘起または卵巢静止の治療の目的に PMS を単独に投与した場合、多数の卵胞が発育し、そのうちで排卵するものもあるが、PMS 投与から排卵迄の時間が長短区々であり、発育した卵胞の多くは閉鎖退行したり、閉鎖黄体化することが認められている。

本実験においては、PMS の前処置によって発育した卵胞の多くが LH-RH-A 投与後 24~48 時間に集中して排卵し、かつその跡にいずれも正常と認められる黄体が形成されるのが内視鏡で確認されたことから、これらの排卵は LH-RH-A の投与によって誘起されたものと判定された。

本実験において、牛の卵巢の内視観察と写真撮影に使用した Fiberscope は既に森ら⁸⁾、INOUE ら⁹⁾が牛に使用したものと同類のもので、Fiberscope の導入のルートとしては森ら⁸⁾の方式に準じて一側臍部の切開口から腹腔に挿入した円筒を通して行ったが、写真に示した様に卵巢の状態をかなり鮮明にとらえることができた。またこの内視観察は実験牛 5 頭中 2 頭ではそれぞれ 1 回だけ行ったが、3 頭では 2 回あて行っており、とくに牛 No. 5 は No. 2 と同一個体で合計 3 回観察を行っているが、いずれも前回の観察による卵巢の損傷や癒着などの悪影響は認められなかった。これらの結果から、この内視鏡による方法は牛の卵巢の状態を確認する方法として有力なものと考えられる。

要 約

性周期を示す牛 3 頭、卵巢静止牛 2 頭の計 5 頭について、合成 LH-RH アナログ (des-Gly-NH₂¹⁰-LH-RH-ethylamide; LH-RH-A と略) の投与による排卵誘起実験を行い、卵巢の反応を Fiberscope によって直接観察するとともに写真撮影を行った。まず前処置として PMS 1,000~4,000 IU を筋肉内注射し、1~4 日後に数個の卵胞が発育したことを触知した上で、LH-RH-A

を2頭には 600 μ g と 300 μ g, 3 頭には 300 μ g と 200 μ g それぞれ 90 分間隔で筋肉内注射した。その結果, 全例に LH-RH-A 注射後 1~2 日の間に 3~8 個の排卵が誘起され, ついで正常とみられる黄体が形成されるのが内視鏡によって観察された。これらの結果から前に報告した本剤による野外科における排卵誘起効果が裏付けされた。

(1978. 7. 26 受付)

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の意を表します。

文 献

- 1) 山内(亮)・仮屋(堯)・田中(幹)・佐々木(伸): 本誌 25, 12, 1979.
- 2) 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.

- 3) 杉江(信)・西川(義): 本誌 3, 21, 1957.
- 4) 芦田(浄)・山内(亮)・大塚(佳)・山本(芳)・乾(純)・円山(八)・川島(秀)・高村(礼): 本誌 3, 21, 1957.
- 5) 山内(亮)・中原(達)・大塚(佳)・乾(純)・円山(八)・久米井(信)・高村(礼): 本誌 3, 117, 1958.
- 6) 蘭守(竜)・高橋(正): 本誌 4, 8, 1958.
- 7) 村山(耕)・柳田(満)・小原(弘)・重松(武): 本誌 3, 11, 1958.
- 8) 森(純)・仮屋(堯)・辻村(信): 本誌 23, 126, 1977.
- 9) INOUE, T., Y. MIYAKE, K. KAWATA & T. ISHIKAWA: *Japan. J. Anim. Reprod.* 24, 6, 1978.

Summary

Ovulation inducing experiments in the cow by administration of a synthetic LH-RH analog were performed. The ovarian reactions to LH-RH were observed and photographed by endoscopy with the aid of a fiberscope.

Three cyclic cows and 2 anestrus cows with quiescent ovaries were given a single intramuscular injection of 1,000~4,000 IU of PMS for causing multiple follicular developments. The preliminary treatments were followed by intramuscular injections with 600 μ g and 300 μ g or 300 μ g and 200 μ g at 90 minutes interval within 1~4 days when some follicular developments were noticed by rectal palpation (Table 1). The endoscopy revealed that 3~8 ovulations were induced 1~2 days after the LH-RH analog injection as shown in Fig. 1~5 and Plate: Fig. 6~13. From these results, the ovulation inducing effects of the LH-RH analog on the cow observed in the previous report were confirmed experimentally.

Explanation of Plate

- Fig. 6. Left ovary of Cow No. 1 (2 days after LH-RH injection): 3 postovulatory follicles.
 Fig. 7. Left ovary of Cow No. 1 (8 days after LH-RH injection): 3 additional corpora lutea.
 Fig. 8. Right ovary of Cow No. 2 (12 days after LH-RH injection): 3 additional corpora lutea.
 Fig. 9. Left ovary of Cow No. 3 (8 days after LH-RH injection): 1 primary corpus luteum and 2 additional corpora lutea.
 Fig. 10. Left ovary of Cow No. 4 (7 days after LH-RH injection): 1 primary corpus luteum and 2 additional corpora lutea.
 Fig. 11. Right ovary of Cow No. 4 (7 days after LH-RH injection): 3 of 5 additional corpora lutea were seen.
 Fig. 12. Left ovary of Cow No. 5 (2 days after LH-RH injection): 4 postovulatory follicles.
 Fig. 13. Right ovary of Cow No. 5 (2 days after LH-RH injection): 4 postovulatory follicles.

PLATE Bovine ovaries observed by endoscopy