乳牛の二排卵時の授精後における卵巢の変化, 末梢血中プロジェステロンとエストラジオール-17 β の消長および受胎成績

佐々木 恵¹⁾・大津 信一²⁾・近藤 栄³⁾・三宅 陽一・金田 義宏

岩手大学農学部獣医学科家畜臨床繁殖学研究室 〒020 岩手県盛岡市上田3-18-8

要 約 乳牛の二排卵した時の人工授精後における臨床内分泌学的な基礎資料を得ることを目的として、ホルスタイン種経産牛で自然発情期に人工授精して、二排卵した後に2個の黄体の形成が認められた17例と一排卵し正常黄体を形成して受胎した8例について卵巢の変化を調べるとともに末梢血中 progesterone (P) および estradiol-17 β (E₂) 濃度の消長を、受胎例では排卵後30日まで、不受胎例では次回排卵日まで比較検討した。さらに、二排卵後受胎例については、産子数を調べた。

その結果、17例中5例は双子、4例は単子を分娩し、2例は授精後それぞれ95日と106日に双子を流産した。受胎しなかった6例における次回排卵までの日数は、2例では20日と21日であり、他の4例では26～58日であった。双子分娩1例と単子分娩4例では、2個の黄体のうち1個が排卵後14～42日の間に、また不受胎で性周期が延長した4例では黄体の1個が排卵後15～33日に、他の1個が21～53日の間に退行し始めた。血中P値は、全例で排卵後12～13日まで一排卵受胎例の平均値 $\pm$ 2SD(以下、基準値)の範囲内で推移したが、単子分娩1例と不受胎で性周期が延長した4例では、1個の黄体の退行に伴って低下した。一方、E₂値は、受胎例では基準値の範囲内で推移したのに対して、不受胎例では、基準値の上方またはそれを上回る値で推移し、変動の範囲は広い傾向がみられた。

以上の成績から、二排卵後には胚の死滅が高率に発生し、血中E₂値が高い傾向にあることとの関連が推察された。

キーワード: Dairy cows, Twin ovulation, Fertility, Progesterone, Estradiol-17 β

(Journal of Reproduction and Development, 39: j37-j42, 1993)

牛において、交配後に二排卵した場合の受胎率は一排卵した場合と比べて低く、かつ、双子分娩の確率は低いことが認められている[1, 2]。その理由として、二排卵時における排卵後の卵子の受精能が低いこと[2]や妊娠初期における内分泌機能が一排卵の場合とは異なること[3]によることなどが考えられている。

一方、交配後の胚の追移植[4]や二胚移植[5]による双子生産技術の開発に関する研究が活発に行われているが、胚の早期死滅や流産の発生率が高いことが認められ

ており[2, 5]、その発生要因について検討する必要があることが指摘されている[5]。

牛の双子生産という繁殖技術の向上を図るためには、自然に二排卵した牛において受胎までの過程における臨床内分泌学的な変化について把握しておく必要があると考えられるが、詳細に検討した報告は見あたらない。

そこで本報告では、人工授精時に二排卵した乳牛の排卵後における卵巢の変化と血中性ステロイドホルモンの消長を調べ、受胎の成否と産子数との関連について検討した。

材料と方法

供試牛は、岩手大学附属農場で飼育されていたホルス

掲載決定: 1993年5月17日

1) 現所属: 小岩井農牧(株)・小岩井農場・技術研究センター

2) 現所属: 岩手県経済連・二戸市農協

3) 現所属: NOSAI北海道・宗谷地区農協

タイン種経産牛で、自然発情期に人工授精して2個の卵胞が排卵し、その後に2個の黄体の形成が認められた17例である。これらの牛について排卵後連日あるいは1日おきに直腸検査を行って卵巣の変化を観察するとともに、尾静・動脈から採血して受胎例では排卵後30日、不受胎例では次回排卵日までの末梢血中プロゲステロン(P)濃度を牧野の方法[6]、エストラジオール-17 β (E₂)濃度を田谷らの方法[7]により測定した。そして、1個の卵胞が排卵し正常な黄体の形成が認められて受胎した8例を対照群として比較した。妊娠診断は授精後60日前後に直腸検査により行い、受胎したものについては産子数を調べた。

なお、二排卵した17例中5例には、二排卵後、目的の異なる実験のために排卵誘起剤を投与した。すなわち、2例には排卵後3日、他の2例には、それぞれ排卵後43日、47日にGnRH類縁物質である酢酸フェルチレリン(GnRH-A)を100 μ gまたは200 μ g投与した。さらに他の1例には排卵後6日にhCG 3000 IUを投与した。また、2個のうち1個の黄体が囊腫様を呈していた3例に対し

ては排卵後1～3日に指圧により黄体内腔液を排除した。

結 果

1. 二排卵後の受胎成績

授精後に二排卵した17例のうち受胎したものは11例(64.7%)で、5例は双子、4例は単子を分娩し、2例は授精後それぞれ95日、104日に双子を流産した。不受胎であった6例の二排卵後、次回排卵までの日数は、2例は、それぞれ20日、21日、他の4例では26～58日であった。また、二排卵後に形成された2個の黄体のうち1個が囊腫様を呈し、排卵後1～3日に指圧により黄体内腔液を排除した3例のうち2例は受胎して双子を分娩し、1例は不受胎で性周期は58日に延長した。GnRH-Aを投与した4例のうち3例が双子を分娩し、他の1例とhCGを投与した1例では不受胎で、性周期はそれぞれ44日、58日に延長した(表1)。

2. 二排卵後の卵巣の変化

二排卵後に形成された黄体の形状は、17例中5例では2個のうち1個は囊腫様を呈していたが、他の12例では

表1. 二排卵時授精後の卵巣の変化と受胎の状況

牛 No.	排卵後の処置		排 卵 卵巣側	黄体の 形 状	黄体の 長 径	黄体の ¹⁾ 退 行	妊 角 次回の 排 卵
	日	処 置					
双 子 分 娩	1 ²⁾	3	GnRH-A 200 μ g	/ R,R	/ CCL ³⁾ ,N ⁴⁾	mm / 20,22	日 / —, — R
	2			L / R	N / N	20 / 22	— / — LR
	3			L / R	N / N	25 / 23	— / — LR
	4 ²⁾	3	GnRH-A 100 μ g	L / R	CCL / N	23 / 25	— / — LR
	5	43	GnRH-A 200 μ g	L / R	N / N	22 / 23	— / 31 LR
単 子 分 娩	6			L / R	N / N	20 / 20	— / 28 L
	7			L / R	N / N	20 / 20	— / 42 L
	8			L / R	N / N	23 / 18	— / 17 L
	9			L / R	N / CCL	24 / 36	14 / — R
流 産	10			/ R,R	/ N,N	/ 20,20	/ —, — R
	11			L / R	N / N	22 / 22	— / — LR
不 受 胎	12			L / R	N / N	22 / 25	15 / 15
	13			L,L /	CCL,N /	23,22 /	17,17 /
	14			L / R	N / N	23 / 18	21 / 17
	15			L / R	N / N	23 / 22	15 / 21
	16	6	hCG 3000 IU	L / R	N / N	28 / 28	37 / 17
	17 ²⁾	47	GnRH-A 200 μ g	L / R	CCL / N	28 / 28	53 / 33

1) 排卵日を0とした日数で、排卵後60日までに観察されたもの

2) 排卵後1～3日に囊腫様黄体の黄体内腔液を排除し、その後正常黄体形成

3) CCL: 囊腫様黄体. 4) N: 正常黄体

2個とも正常であり、その長径は18~36 mmであった。

双子を分娩した5例のうち4例では、2個の黄体はいずれも妊娠黄体として存続した。しかし、他の1例(No.5)では左右両側の卵巣に形成された黄体のうち、右側卵巣の黄体は排卵後31日から退行しはじめ、左右両側の子宮角で受胎した。単子を分娩した4例では、左右両側の卵巣で排卵して形成された2個の黄体のうち1個が排卵後14~42日の間に退行し、いずれも黄体が存続した卵巣側の子宮角で受胎した。また、不受胎で性周期が延長した4例では、2個の黄体のうち1個が排卵後15~33日の間に、他の1個はその後4~20日から退行しはじめた(表1)。

3. 二排卵後の末梢血中P値とE₂値の消長

血中P値とE₂値の消長は、双子分娩5例(図1)、単子分娩4例(図2)および不受胎で性周期が延長した4例(図3、4)を代表例として示した。

血中P値は、二排卵した全例で排卵後12~13日までの間に、一排卵し正常な黄体を形成して受胎した8例の平均値±2SD(以下基準値)の範囲内または、それを上回る値で推移した。また、双子分娩例と単子分娩例では、排卵後30日の間はほぼ同様の値で推移した。しかし、双子を分娩した2例と単子を分娩した3例の排卵後12~13

図2. 末梢血中 progesterone 値と estradiol-17β 値の消長(単子分娩例)

▲▽: 1個の黄体の退行, ☆: 1個の黄体がCCL,
 〇: 正常黄体形成受胎例の平均値±2SD.

図1. 末梢血中 progesterone 値と estradiol-17β 値の消長(双子分娩例)

*: 排卵後3日に GnRH-A 投与, ☆: 1個の黄体がCCL, 〇: 正常黄体形成受胎例の平均値±2SD.

図3. 末梢血中 progesterone 値と estradiol-17β 値の消長(不受胎・性周期延長例)

▼▲: 1個の黄体の退行, 〇: 正常黄体形成受胎例の平均値±2SD.

図4. 末梢血中 progesterone 値と estradiol-17 β 値の消長 (不受胎・性周期延長例)
 ▽: 1 個目の黄体の退行, ▽: 2 個目の黄体の退行, ☆: 1 個の黄体が CCL, 〇: 正常黄体形成受胎例の
 平均値 $\pm$ 2SD.

日における値は 3.4~4.4 ng/ml であり, 他の 12 例の 5.1~10.4 ng/ml に比べて低く, かつ, 増加の程度は緩慢であった. なお, 単子を分娩した 1 例 (No. 6) と不受胎で性周期が延長した 4 例では, 2 個の黄体のうち 1 個が排卵後 15~33 日に退行を開始したのに伴って血中 P 値の減少がみられた.

血中 E₂ 値は, 受胎した 11 例のうち 7 例では排卵後 3~5 日に基準値の範囲内で推移したのに対し, 不受胎であった 6 例のうち 4 例では 8.0 pg/ml 以上の基準値を上回る明瞭なピークの形成がみられた. さらに, 排卵後 10 日以降は, 双子分娩例では基準値の範囲内で推移したのに対して, 単子分娩例および不受胎で性周期が延長した例では, 基準値の上方またはそれを上回る値で推移して, 変動の範囲は広い傾向がみられた.

考 察

牛の二排卵時の交配後における受胎率および双子分娩率は, 一般に低いことが認められており [1, 2], 一排卵の場合に比べて胚の早期死滅が高率に発生することが指摘されている [1, 2]. 一方, 牛の胚移植による双子生産では, 移植後の胚および胎子の死滅が高率に発生することが大きな問題となっている. Izaïke ら [5] は, 左右両子宮角に胚を 1 個ずつ移植した牛で, 妊娠 27 日に双

胎と診断された 31 頭中 11 頭 (33.5%) は単胎であり, 5 頭 (16.1%) は流産したこと, また, このような生存胚数の減少は妊娠 38 日から 57 日の間に最も多い傾向であったことを報告している.

本試験では, 自然発情後の二排卵時に授精した 17 例のうち 11 例が受胎し, そのうち 5 例が双子, 4 例が単子を分娩した. すなわち, 受胎率は 64.7%, 双子分娩率は 45.5% であり, 例数は少ないもののいずれも従来の報告 [1, 2] に比べて高い成績が得られた.

左右両側の子宮角に胚を移植した場合および人工授精後に非黄体形成卵巢側の子宮角に胚 1 個を追い移植した場合には, 非黄体形成卵巢側の子宮角で胚の早期死滅が高率に発生すること [8] が示されている. また, Weems ら [9] は, 正常性周期を営む牛における子宮粘膜の P 濃度は, 黄体形成卵巢側の子宮角が反対側の子宮角と比べて著しく高いことを認めており, 左右の卵巢と子宮との血管系はそれぞれ直連的であることを指摘している. 本試験において単子を分娩した 4 例ではいずれも左右両側の卵巢に黄体が形成されたが, 1 個は排卵後 14~42 日の間に退行した. そして, 黄体が存続した卵巢側の子宮角で受胎した. これらのことから, 左右両側の 2 個の黄体のうち退行した黄体と同側の子宮角では, 反対側卵巢の黄体から分泌される P 量が妊娠を維持する

のに不十分であったために胚が死滅し、結局単子であったことが考えられる。

一方、単子を分娩した2例と不受胎で性周期が延長した4例中3例では、2個の黄体のうち1個は、排卵後14～17日の間に退行し始めて寿命の短いことが認められた。このことは胚が早期に死滅したことによると考えられるが、Kidderら[2]が指摘しているように、排卵後の卵子が受精能を欠いていたか、あるいは受精したとしても直ちに死滅するような活力に乏しいものであったことも考えられる。

また、不受胎で性周期が26～58日に延長した4例は胚の死滅によるものと考えられ、その発生率は二排卵した17例に対して23.5%と高かった。

Erbら[1]は牛の双胎妊娠における授精後3か月以降の流産率は、単胎妊娠の場合に比べて高く30～40%であると推定している。本試験では、双胎妊娠した7例のうち2例がそれぞれ排卵後95日、104日に双子を流産し、流産率は28.6%であり、先の報告[1]とほぼ同様の値を示した。この原因としては、2例のうち1例では右側の子宮角で双胎妊娠していたことから、一側の子宮角では二胎子を収容し、發育させ得る能力が備わっていなかったこと[10]が考えられる。

Morrisら[3]は、二排卵して双子を分娩した牛の妊娠初期における血中P値は2.83 ng/mlであったのに対して一排卵して単子を分娩した牛では3.13 ng/mlであり、二排卵後双子を分娩した牛では低いことを報告している。

本試験における二排卵後12～13日までの血中P値の増加の程度は、全例とも、一排卵し正常な黄体を形成して受胎した牛の基準値の範囲内で推移した。このことから、血中P値は黄体数による差異はなく、また黄体初期における血中P値の高低は胚の生存に特に影響を与えるものではないように思われた。

また、1個の黄体の退行に伴って血中P値の減少がみられた単子分娩1例(No.6)と不受胎で性周期が延長した4例の計5例の退行前における血中P値は、基準値の上方あるいはそれを上回る値で推移したのに対して、減少がみられなかった双子分娩1例(No.5)と単子分娩3例の計4例では基準値の下方で推移した。このように、1個の黄体の退行に伴い血中P値の減少がみられた例では、2個の黄体はいずれも機能的であったのに対し、P値の減少がみられなかった例では早期に退行した1個の黄体の機能は不十分であったことが考えられる。

排卵後の血中E値と受胎との関連について Henricks

ら[11], Wettmanら[12]は、妊娠初期では、きわめて低値であると述べている。また、百目鬼ら[13]は排卵後数日～十数日の妊娠初期に高値を示しても一過性であれば、妊娠は維持される可能性があることを示唆している。本試験では、受胎例の多くは排卵後3～5日に基準値を越える値を示す例はみられなかったのに対し、不受胎例の多くは基準値を越える明瞭なピークを形成した。そして、排卵後10日以降は、双子分娩例では基準値の範囲内、単子分娩例および不受胎で性周期が延長した例では上方またはそれを上回る値で推移し、変動の範囲は広い傾向がみられた。黄体期における血中E値の増加は、この時期に出現する卵胞の發育に伴う卵胞上皮および卵胞膜の細胞分裂の増加および卵胞上皮細胞の肥大と関連のあることが示唆されている[14]。本試験において、不受胎で性周期が延長した4例のうち3例では二排卵後も直径15～22 mm前後の卵胞が周期的に發育し閉鎖退縮を繰り返していたことから、血中のE₂はその時期に出現した卵胞に由来するものと考えられた。

以上のことから、人工授精後に二排卵した場合における胚の生存性および受胎性には、血中P値よりはE₂値の推移が関与していることが推察された。

文 献

1. Erb RE, Morrison RA. Effects of twinning on reproductive efficiency in a holstein-friesian herd. *J Dairy Sci* 1959; 42: 512-519.
2. Kidder HE, Barrett GR, Casida LE. A study of ovulation in six families of holstein-friesians. *J Dairy Sci* 1952; 35: 436-444.
3. Morris CA, Day AM, Peterson AJ, Amyes NC, Bragging TJ. Twinning in cattle: Selection line differences in ovulation and plasma progesterone. New Zealand, Ministry of Agriculture and Fisheries. Agricultural Research Division. *Annual Report* 1985/86. 1987: 34-35.
4. Diskin MG, McDonagh T, Sreenan JM. The experimental induction of twin calving in beef cows by embryo transfer. *Theriogenology* 1987; 27: 224.
5. Izaike Y, Suzuki O, Shimada K, Fujita K, Kosugiyama M. Twin pregnancy diagnosis and early embryonic loss after bilateral transfer in beef cattle. *Jpn J Anim Reprod* 1988; 34: 236-242.
6. 牧野拓雄. 性ステロイドホルモンの Radioimmunoassay. *日内分泌誌* 1973; 49: 629-645.
7. 田谷一善, 渡辺 元, 笹本修司. ¹²⁵I 標識ホルモンを用いたプロジェステロン、テストステロンおよびエストラジオール-17β のラジオイムノアッセイについて. *家畜繁殖誌* 1985; 31: 186-197.
8. Sreenan JM, Beehan D, Mulvehill P. Egg transfer in the cow: Factors affecting pregnancy and twinning rate fol-

- lowing bilateral transfer. *J Reprod Fert* 1975; 44: 77–85.
9. **Weems CW, Lee CN, Weems YS, Vincent DL.** Distribution of progesterone to the uterus and associated vasculature of cattle. *Endocrinol japon* 1988; 35: 625–630
 10. **Vandeplasseche M, Butaye R, Bouters R.** The capacity of the uterus of heifers and cows to carry twins. *Dtsch Tierärztl Wschr* 1979; 86: 470–473.
 11. **Henricks DM, Hill JR, Dickey JF.** Plasma ovarian hormone levels and fertility in beef heifers treated with melengestrol acetate (MGA). *J Anim Sci* 1973; 37: 1169–1175.
 12. **Wettman RP, Hafs HD.** LH, Prolactin, Estradiol and Progesterone in bovine blood serum during early pregnancy. *J Anim Sci* 1973; 36: 51–56.
 13. **百目鬼郁男, 中原達夫.** 性周期および妊娠初期の牛末梢血中 Estrogen 及び Progesterone の動態. *家畜繁殖誌* 1977; 23: 29–34.
 14. **Hansen W, Echternkamp SE.** Control of ovarian function in domestic animals. *Amer Zoologist* 1972; 12: 225–243.

Relationships between Changes of the Ovaries, Plasma Progesterone and Estradiol-17 β Levels, and Pregnancy in Cows with Spontaneous Twin Ovulation

Megumi SASAKI, Shin-Ichi OHTSU, Sakae KONDOH, Yoh-Ichi MIYAKE and Yoshihiro KANEDA

Laboratory of Theriogenology, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020, Japan

Summary. Changes in the ovaries and plasma progesterone (P) and estradiol-17 β (E₂) levels were examined and compared to pregnancy and twinning rate in 17 Holstein-Friesian cows with twin ovulations after insemination. Plasma P and E₂ levels of 8 cows that conceived following a single ovulation were used as normal controls. Of the 17 cows, 11 cows conceived; 5 cows delivered twins, 4 cows had a single, and remaining 2 cows aborted fetuses at 95 and 106 days of pregnancy, respectively. In 6 other non-pregnant cows, 2 cows ovulated again 20 & 21 days after insemination, and 4 cows ovulated 26–58 days after the service. Plasma P levels in all cows changed within the range of mean $\pm$ 2SD of the levels in control cows during the period of 12–13 days after insemination. The levels decreased coincident with the regression of either of the 2 corpora lutea in 1 cow which delivered a single, and in 4 non-pregnant cows which showed a prolonged estrous cycle. Plasma E₂ levels in pregnant cows changed within the range of the control level, but the levels in non-pregnant cows changed above or over the control level. The results indicated that there was a high incidence of the embryonic death after twin ovulation, and an increase of plasma E₂ level after ovulation may adversely affect embryo survival rate. No relationships between plasma P profiles and pregnancy rate were observed.