ホルスタイン種乳牛に対する Progesterone releasing intravaginal device の応用

青柳敬人^{*1)} 岩住安晃^{*1)} 和地秀一^{*1)} 福井 豊^{*2)} 小野 斉^{*2)} 堀江功一^{*3)}

(昭和 60 年 6 月 14 日受理)

A Progesterone Releasing Intravaginal Device Applied to Superovulation and Abnormal Estrous Cycle in Holstein Cows
YOSHITO AOYAGI (Kitami Center, Hokkaido Livestock Improvement Association, Kunneppu, Tokorogun, Hokkaido 099-14) et al.

SUMMARY

A progesterone releasing intravaginal device with an estradiol benzoate capsule (PRID) was applied to Holstein cows.

1) In 4 cows in postparturient anestrus PRID was inserted into the vagina for 12 days and 25 mg of prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) was injected intramuscularly 24 hours before the removal of PRID. All the cows, except one, showed standing estrus within 48 hours after this removal. The estrous cows were inseminated artificially once 58 hours after the removal and became conceived, except one.

2) In 8 cows showing an abnormal estrous cycle, PRID was inserted for 12 days and superovulation treated with PMSG or FSH and $PGF_{2\alpha}$ 48 hours before the removal of PRID. The mean numbers of ova collected and normal embryos per donor were 4.4 and 2.9, respectively, and 66% of ova collected from the donors with superovulation was judged as normal.

3) In 5 donor cows 1 to 4 days after collection following the usual superovulation scheme (first) PRID was inserted for 14 days. Superovulation was treated again with PMSG or FSH in combination with $PGF_{2\alpha}$ treatment 2 days before the removal of PRID (second). The proportion of normal embryos was 65.5 and 40.0% in the first and second treatment, respectively.

In conclusion, the PRID treatment was effective for the recurrence of estrus in postpartum anestrus and for superovulation in cows showing an abnormal estrous cycle.

要 約

17頭のホルスタイン種乳牛に Progesterone releasing intravaginal device (PRID) を応用して、分娩後無発情牛の発情誘起効果、性周期不規則牛の過剰排卵処置による卵回収成績に及ぼす影響、2回連続の過剰排卵処置による卵回収成績に及ぼす影響について各々検討を行った。

1) 分娩後 64~143 日間の無発情牛 4 頭に対し PRID を 12 日間陰内に挿入し、除去 24 時間前に $PGF_{2\alpha}$ 25 mg を筋肉内投与した。除去後 48 時間で 3 頭にスタンディング発情を認め、うち 2 例は除去後 56 時間目の 1 回の人工授精で受胎した。

2) 性周期不規則牛 8 頭に対し、PRID を 12 日間陰内に挿入し、除去 48 時間前より性腺刺激ホルモン製剤と $PGF_{2\alpha}$ を用いて過剰排卵処置を行った。1 頭あたりの平均回収卵数は 4.4 個、平均正常卵数は 2.9 個、正常卵率は 65.6% であった。

3) 過剰排卵処置による卵回収を 24~28 日間隔で 2 回連続、5 頭に対して行い、2 回目の処置時に PRID を応用した。初回の正常卵/回収卵は平均で 3.8/5.8 であったが、2 回目のそれは 1.2/2.6 であった。

以上の結果より、PRID は無発情牛ならびに性周期不規則牛に対して、発情誘起およびその受胎性に効果があることが示唆された。

*1) 北海道家畜改良事業団 (北海道常呂郡訓子府町駒里 184)

*2) 帯広畜産大学畜産学部 (北海道帯広市稲田町)

*3) ホクレン畜産実験研修牧場 (北海道常呂郡訓子府町駒里 184)

乳牛の性周期の同期化、分娩後無発情牛の発情誘起、黄体遺残の治療、過剰排卵処置等に対してわが国では $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、あるいはそのアナログが広く利用されている。しかし、PG 製剤がその効果を十分に発揮するには投与時に機能性黄体を有していることが条件となる。いっぽう、ネガティブ・フィードバックの解除によって、発情を誘起する黄体ホルモン製剤は投与時期に制限がないという利点があり、かつ $\text{PGF}_{2\alpha}$ 製剤との併用でさらに高い効果が期待できる^{4,6)}。

黄体ホルモン製剤の投与方法^{2,3,7,27)}には注射法、経口法、経陰法、皮下移植法などがあるが、今回は経陰法による progesterone releasing intravaginal device (以下 PRID) の乳牛への応用を試みた。PRID の応用方法として、乳牛・肉牛の性周期の同期化^{4-6,12,17,25)}、分娩後早期の発情誘起^{20,21)}、バッファロー牛の夏期無発情に対する応用^{23,24)}、分娩後無発情牛の発情誘起²⁹⁾、過剰排卵処置時の応用²⁹⁾などが報告されている。

そこで、今回は 17 頭のホルスタイン種乳牛に PRID を応用して分娩後無発情牛の発情誘起効果、性周期不規則牛に対する過剰排卵処置による卵回収成績への影響、および 2 回連続の過剰排卵処置による卵回収成績に及ぼす影響等について検討を行った。

1. 材料および方法

試験期間は昭和 58 年 10 月より昭和 59 年 11 月までである。供試牛は北海道常呂郡訓子府町の H 牧場で飼養されている 3～11 才のホルスタイン種経産牛 17 頭である。

実験 1. 临床上、子宮疾患を認めない、分娩後 64～143 日の無発情牛 4 頭（分娩後 1 度もスタンディング発情を確認していないもの）を使用し、PRID（本体のシリコンラバー中に progesterone 2.25 g、カプセル中に estradiol benzoate 10 mg 含有、Abbott 社）を 12 日間陰内に挿入（図 1）、Folman らの方法⁹⁾に準じて、除去 24 時間前に $\text{PGF}_{2\alpha}$ （プロナルゴン F、日本 Upjon 株式会社）25 mg を筋肉内投与した。除去後、テイルペインティングによる発情行動の観察¹¹⁾、人工授精、直腸検査による排卵確認を行い、その後 60～70 日目で直腸検査によって妊娠鑑定を行った。

図 1 PRID 挿入図

実験 2. 性周期不規則牛（分娩後少なくとも 1 回はスタンディング行動を認めたが、その後スタンディング行動を示さないもの）7 例と分娩後 82 日間無発情のもの 1 例、計 8 頭を使用した。このうち 4 頭には PRID を 12 日間陰内に挿入したが、挿入開始後 10 日目に PMSG 製剤（セロトロピン、帝国臓器株式会社）2,500～4,000 IU を筋注しその 48 時間後、PRID 除去と同時に $\text{PGF}_{2\alpha}$ 35 mg を筋肉内投与した。他の 4 頭には PRID を挿入して 10 日目より FSH 製剤と LH 製剤（FSH-P・P-LH, Burns Biotech 社）を 5:1 に混合したものを、FSH 全量で 50 mg を約 12 時間間隔で 9 回、減量法（7.0, 7.0, 6.5, 6.5, 5.5, 5.5, 4.0, 4.0, 4.0）で投与し、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ は FSH 処置 4 回目の時に 10 mg を、5 回目の時点で 17.5～20 mg を筋肉内投与した。2 回目の $\text{PGF}_{2\alpha}$ 投与時に PRID 除去を行った。その後、実験 1 と同様に発情観察をして、人工授精を 12 時間間隔で 2～3 回行い、発情後 7 日目に頸管経由法で卵回収を実施した。回収卵は金川⁹⁾による A・B ランクを正常卵として、倒立顕微鏡下で判定した。

実験 3. 分娩後正常性周期を示した 5 頭を使用し、過剰排卵処置（4 頭は FSH- $\text{PGF}_{2\alpha}$ 法、1 頭は PMSG- $\text{PGF}_{2\alpha}$ 法）を施し、卵を回収後 1～4 日目に PRID を陰内に挿入し、同時に、過剰排卵処置後存在する多数の黄体を退行させるため、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 30 mg を筋肉内投与した。PRID の挿入期間は 14 日とし、12 日目より前回 FSH 処置したものは PMSG で、PMSG 処置したものは FSH で実験 2 と同様の過剰排卵処置、卵回収、卵検査を行った。

なお、実験 1 の 4 例、実験 2 の PMSG 処置 2 例、FSH 処置 2 例については PRID 挿入後、尾動・静脈より 1～4 日間隔で採血を行い、遠心分離後、血清をホルモン測定時まで -20°C で保存し、牧野の RIA 法¹³⁾で血中プロゲステロン値（以下 P 値）を測定した。

2. 結果

実験 1. PRID 除去後 48 時間で 3/4 例にスタンディング行動を認め、うち 2 例は除去後 56 時間目、1 回の人工授精で受胎した。スタンディング行動を認めなかつ

表 1 無発情牛に対する PRID の成績

牛 No.	無発情 期間 (日)	スタン ディング	除 去 後 発情発現 (時間)	除去後 排卵* (時間)	受胎
1	143	+	48	72	—
2	90	—		108	—
3	121	+	48	72	+
4	64	+	48	72	+

注) *: PRID 除去から約 12～24 時間間隔で直腸検査によって確認

図2 無発情牛の血中P値の推移

図3 性周期不規則牛の血中P値の推移

た1例は除去後108時間で排卵を認めたが、PRID除去後56, 80, 108時間目の3回の人工授精の結果、不受胎であった(表1)。Cow No. 4のPRIDは挿入後6日目に膣より脱出したため新たに新しいPRIDを挿入した。PRID挿入時の血中P値は2/4例で1 ng/ml以下であった。また、3/4例はPRID挿入後1日目～除去までの間、血中P値は1 ng/ml以上の値で推移した(図2)。

実験2. FSH-PGF_{2α}法による4頭(分娩後82日間の無発情牛1頭を含む)で、PRID除去後48時間に、明瞭なスタンディング行動を示したものが3例、1例は同時刻にペイントは消失しなかったが数回のスタンディング行動を認めた。これら1頭当たりの平均回収卵数は

2.3個、平均正常卵数は2.0個で正常卵率88.9%(8/9)であった。いっぽう、PMSG-PGF_{2α}法による4頭ではPRID除去後48時間にスタンディング行動を認めたものは3頭であった。なお、1例はスタンディング行動を認めなかった。それら1頭当たりの平均回収卵数は6.5個、正常卵数は3.8個で、正常卵率は57.7%(15/26)であった(表2)。性周期不規則牛4例のPRID挿入時の血中P値は3例で1 ng/ml以下の値を示した。またPRID挿入後4日目よりPRID除去時まで1 ng/ml以上の値で推移したものは3例であった。正常卵が無回収であったNo. 10の乳牛はPRID挿入後10日目、すなわち、PMSG処置時にすでに0.8 ng/mlを示していた

表2 性周期不規則牛に対するPRID応用による過剰排卵処置の成績

Cow No.	処置	スタンディングの発現	推定黄体数**	推定卵胞数***	回収卵数	正常卵数	正常卵率
5	FSH	+	5	0	2	2	100
6	FSH	+	8	2	3	3	100
7	FSH	±	8	1	0	0	0
8*	FSH	+	7	1	4	3	75
9	PMSG	+	5	0	9	7	78
10	PMSG	—	8	1	4	0	0
11	PMSG	+	9	0	8	7	87
12	PMSG	+	6	1	5	1	20
平均			7.0	0.8	4.4	2.9	65.6

注) *: 分娩後82日間無発情牛 ** : 卵回収時の直腸検査による推定黄体数 *** : 卵回収時の直腸検査による推定卵胞数

表3 PRID 利用による2回連続の過剰排卵処置

Cow No.	処置	ST*	卵回収日	正常卵/回収卵	処置	ST*	卵回収日	正常卵/回収卵
13	FSH	+	59.10. 8	4/6	PMSG	+	59.11. 1	0/0
14	FSH	+	59.10. 8	5/5	PMSG	+	59.11. 1	2/2
15	PMSG	+	59.10. 5	7/8	FSH	+	59.11. 1	0/4
16	FSH	+	59.10. 6	3/6	PMSG	—	59.11. 2	1/1
17	FSH	+	59.10. 5	0/4	PMSG	+	59.11. 2	3/6

注) *: スタンディング行動の有無

た。PRID 除去後 1 日目には全例 1 ng/ml 以下となり、発情日も同様に推移して、その後卵回収日には平均 7.7 ng/ml と上昇した (図 3)。

実験 3. 第 1 回目の過剰排卵処置時には 5 例全頭にスタンディング行動を認めたが、2 回目の PRID 利用による過剰排卵処置時では 4 例にスタンディング行動が出現した。初回過剰排卵処置では全例において胚が回収できたが、2 回目の過剰排卵処置では 1 例が無回収であった。正常卵が得られなかった例は 1 回目で 1 例、2 回目で 2 例であった。1 頭当たりの平均回収卵数は 1 回目で 5.8 個、2 回目のそれは 2.6 個と減少した。また、1 頭当たりの平均正常卵数は 1 回目で 3.8 個、2 回目は 1.2 個と回収卵数と同様に減少した。正常卵率は 1 回目が 65.5%、2 回目が 46.2% であった (表 3)。

3. 考 察

分娩後 40 日までに 1 ないし 2 回の発情が現われた場合、または初回授精が分娩後 60 日以内になされた場合には、その後の高い繁殖能力が維持されると考えられている²⁶⁾。しかし、分娩後の発情回帰を遅らせる要因は複雑で、子宮内の感染¹⁵⁾、泌乳量や季節の影響、さらには飼養管理の問題¹⁶⁾などがある。守野ら(1984)¹⁹⁾は直接的要因となる分娩後の卵巢機能の回復状況を乳汁中 P 値を測定することにより、規則的なパターンを持つ正常性周期を示すもの、P 値が低値で持続するもの、高値で持続するもの等があることを報告している。実験 1 の No. 3 と No. 4 の 2 例の PRID 挿入時の血中 P 値は 1 ng/ml 以下の低値を示し、すなわち、機能性黄体を有していないことから、この時点で PGF_{2α} 製剤を単独投与したとしても、今回のように 3 例にスタンディング発情を誘起することは難しいと考えられた。また、No. 1 と No. 2 の PRID 挿入時の血中 P 値は 1 ng/ml 以上の高値であることより、PRID 除去前に PGF_{2α} を投与することによって、No. 3 と No. 4 の内因性 P 値を No. 1 と No. 2 の低 P 値にそろえることができたと考えられた。分娩後無発情牛の発情誘起は今回少数例であるのでさらに検討を要するが、PRID と PGF_{2α} 製剤の併用は 2 例の受胎例を得たことから応用可能と考えられた。

金川 (1984)¹⁰⁾ は、ドナーの選抜において若いときから発情周期が一定している雌牛を選択することを最優先事項にあげている。また、HASLER ら (1983)⁹⁾ は通常の過剰排卵処置で受精卵が無回収であったものは健康牛で 14%、繁殖障害牛で 51% であり、1 供卵牛当たりの平均受精卵数は前者で 6.7 個、後者で 2.4 個であったと述べている。今回の PRID を応用した性周期不規則牛の過剰排卵処置による卵回収では、正常受精卵が無回収であったものは 2/8 (25%) で、1 頭当たりの正常受精卵数は 2.9 個で、上記の HASLER ら (1983)⁹⁾ の成績よ

り良好であった。これは、PRID の効果によるものと考えられる。また、実験 1, 2 の血中 P 値の測定より PRID の黄体ホルモンは血中 P 値に反映していることから、PRID を使用して人工的黄体期を作れば過剰排卵処置は可能であり、かつ、いかなるステージからも過剰排卵処置のプログラムには入れることと、最終的手段として、性周期不規則牛であっても卵回収を行えることが大きい利点と考えられる。MAPLETOFT ら (1980)¹⁴⁾、VOSS ら (1983)²⁰⁾ は皮下移植法での黄体ホルモン製剤を利用し、過剰排卵処置を行い良好な成績を得ており、今後はこの方法での検討も行いたい。

短期間に反復した過剰排卵処置が行えれば確実にその産子数を増すことができ、さらにドナー牛の分娩間隔への影響は少なくなり、その意義は大きいと考えられる。しかし、今回の実験では初回時よりも回収卵数、正常卵数ともに PRID を利用した 2 回目で低下した。MONNIAUX ら (1983)¹⁸⁾ によれば乳牛の過剰排卵処置の卵回収成績は、性腺刺激ホルモン製剤に反応し得る卵巢内の小卵胞数によって各乳牛間に個体差が生じると報じているが、今回の 2 回目の回収卵数、正常卵数の低下は、1 回目の過剰排卵処置のため、ホルモンの反応し得る卵巢内の小卵胞数が減少していたためとも考えられる。さらに、初回の卵回収後の残存卵胞と FSH 放出抑制因子であるインヒビンの関係²²⁾ も考慮する必要があるかも知れない。また正常卵率の低下の主要因は、卵回収間隔が 24~28 日と短いために 1 回目の卵回収後の子宮、卵管等の修復が完全ではなかったためではないかと考えられる。乳牛で過剰排卵処置を行い、スタンディング行動を認めれば、その卵回収成績は良好であるという報告^{1, 9)}があるが、今回の 2 回目の処置時の成績はそれらに一致しなかった。その要因を知るためにも、今後ホルモン測定を追加し卵回収間隔を延長しての検討、あるいは 2 回目の過剰排卵処置前に卵巢内に小卵胞を形成させるための何らかの前処置を検討する必要があると思われる。

文 献

- 1) 青柳敬人, 岩住安晃, 和地秀一, ほか: 繁殖技術, 4, 27~28 (1984).
- 2) BATTISTA, P. J., REXROAD, C. E. and WILLIAMS, W. F.: *Theriogenology*, 22, 47~58 (1984).
- 3) BEAL, W. E., GOOD, G. A. and PETERSON, L. A.: *Theriogenology*, 22, 59~66 (1984).
- 4) FOLMAN, Y., MCPHEE, S. R. and CUMMIN, I. A.: *Anim. Reprod. Sci.*, 4, 117~126 (1981).
- 5) FOLMAN, Y., MCPHEE, S. R., CUMMIN, I. A., et al.: *Aust. Vet. J.*, 60, 44~47 (1983).
- 6) 福井 豊, 武藤浩史, 椿 実, ほか: 家畜繁殖誌, 30, 117~126 (1984).
- 7) GHALLAB, A. M., OTT, R. S., CMARIK, G. F., et al.: *Theriogenology*, 22, 67~74 (1984).

- 8) HASLER, J. F., MCCAULEY, A. D., SCHERMERHORN, E. C., et al.: *Theriogenology*, 19, 83~99 (1983).
- 9) 金川弘司：繁殖技術, 94, 特別号 1~16 (1976).
- 10) 金川弘司：牛の受精卵移植, 金川弘司編, 60~65, 近代出版, 東京 (1984).
- 11) 木田克弥, 前田宅明, 堀川忠広, ほか：北獣会誌, 27, 146~148 (1983).
- 12) LOKHANDE, S. M., PATIL, V. H., MAHAJAN, D. C., et al.: *Theriogenology*, 20, 397~406 (1983).
- 13) 牧野拓雄：日内分誌, 49, 629~645 (1973).
- 14) MAPLETOFT, R. J., JOHNSON, W. H. and ADAMS, W. M.: *Theriogenology*, 13, 102 (1980).
- 15) MARTINEZ, J. and THIBIER, M.: *Theriogenology*, 21, 569~581 (1984).
- 16) MARTINEZ, J. and THIBIER, M.: *Theriogenology*, 21, 583~590 (1984).
- 17) MCPHEE, S. R., DOYLE, M. W., DAVIS, I. F., et al.: *Aust. Vet. J.*, 60, 40~43 (1983).
- 18) MONNIAUX, D., CHUPIN, D. and SAUMANDE, J.: *Theriogenology*, 19, 55~81 (1983).
- 19) 守野 繁, 中尾敏彦, 角田修男, ほか：家畜繁殖誌, 30, 61~67 (1984).
- 20) PETERS, A. R., HEWITT, D. S. and LAMMING, G. E.: *Anim. Reprod. Sci.*, 6, 103~110 (1983).
- 21) RAJAMAHENDRAN, R. and THAMOTHARAM, M.: *Anim. Reprod. Sci.*, 6, 111~118 (1983).
- 22) 笹本修司：家畜繁殖学全書, 望月公子編, 23~39, 朝倉書店, 東京 (1984).
- 23) SINGH, G., SINGH, G. B., SHARMA, R. D., et al.: *Theriogenology*, 19, 323~329 (1983).
- 24) SINGH, G., SINGH, G. B., SHARMA, R. D., et al.: *Theriogenology*, 21, 859~867 (1984).
- 25) SPROTT, L. R., WILTBANK, J. N., SONGSTER, W. N., et al.: *Theriogenology*, 21, 349~356 (1984).
- 26) STEVENSON, J. S. and CALL, E. P.: *Theriogenology*, 19, 367~375 (1983).
- 27) 菅原七郎：畜産の研究, 38, 84~88 (1984).
- 28) TROXEL, T. R. and KESLER, D. J.: *Theriogenology*, 21, 699~711 (1984).
- 29) VOSS, H. J., OLIVERA-ANGEL, M. and HOLTZ, W.: *Theriogenology*, 20, 615~625 (1983).

乳清総蛋白量の簡易測定による乳房炎診断法

白井良一*¹⁾ 長谷川生夫*²⁾ 田中享一*³⁾

(昭和 60 年 6 月 14 日受理)

Two Simple Methods of Determination of Total Whey Protein for Diagnosis of the Type of Mastitis
RYOICHI USUI (Tochigi Livestock Hygiene Service Center, Prefecture of Tochigi, Tochigi, Tochigi 328) et al.

SUMMARY

Total whey protein was considered to be useful for the diagnosis of the type of Mastitis. Two simple methods were devised to determine total whey protein.

Bromophenol blue (BPB) tube method (temporary name): Mix 0.5 ml of 0.2M acetic acid buffer solution, pH 4.0, and 0.5 ml of milk. Centrifuge at 2,000 rpm for 5 minutes. Isolate whey. Dilute whey 10~20 times with acetic acid buffer solution. Mix 1 ml of diluted whey and 4.0 ml of BPB solution (dissolve 5 mg of BPB with 100 ml of 0.2M citrate-HCl buffer solution pH 3.0). Determine with spectrophotometer at wavelength of 610 μ m.

BPB filter paper method (temporary name): Mix 0.2M acetic acid buffer solution, pH 4.0, and an equal volume of milk. Add 5 μ l of mixed solution to BPB filter paper (dissolve 100 mg of BPB with 100 ml of 1.0% citrate solution. Dip a piece of filter paper in the solution and dry). Compare the color and yellow ring size with the standard (made with bovine serum albumin).

*¹⁾ 栃木県栃木家畜保健衛生所 (栃木市箱森町 22-27)

*²⁾ 栃木県宇都宮家畜保健衛生所 (栃木県宇都宮市若草町 2-3-39)

*³⁾ 麻布大学獣医学部 (神奈川県相模原市淵野辺 1-17-71)