黒毛和種牛におけるオブシンク開始前のプレシンク処置の効果に関する検討

山崎 徹¹⁾ 上村俊一^{1)†} 安藤貴朗¹⁾ 浜名克己¹⁾ 松崎和俊²⁾

1) 鹿児島大学農学部 (〒890-0065 鹿児島市郡元1-21-24)

2) かごしま中部農業共済組合 (〒899-6201 鹿児島県始良郡湧水町木場58-3)

(2004年9月6日受付・2005年2月14日受理)

要 約

黒毛和種牛に対するオブシンク開始前のプレシンク処置の影響を検討した。牛を2群に分け、プレシンク群 ($n = 18$) は GnRH 投与と7日後に $\text{PGF}_{2\alpha}$ 投与、その12日後にオブシンク処置 (GnRH- $\text{PGF}_{2\alpha}$ -GnRH) を行い、16～20時間後に定時人工授精を行った。対照群 ($n = 20$) は、プレシンク処置時に生理食塩水を投与し、その後オブシンク処置を行った。オブシンク処置の GnRH と $\text{PGF}_{2\alpha}$ 投与時に黄体のある同期化牛は、プレシンク群 77.8%、対照群 50.0% であった。いっぽう、非同期化牛の 10/14 頭はオブシンクの $\text{PGF}_{2\alpha}$ 投与時に黄体があった。受胎率はプレシンク群 61.1%、対照群 70.0% とともに高く、両群間に差がなかった。今回、黒毛和種牛へのプレシンク処置でオブシンク開始時の発情周期を同期化できたが、受胎率の向上はみられなかった。

——キーワード：黒毛和種、オブシンク処置、プレシンク処置、同期化率、定時人工授精。

----- 日獣会誌 58, 541～545 (2005)

牛の発情・排卵同期化処置は、牛群全体の発情と排卵を短期間に集中することにより、繁殖管理業務の省力化や発情発見率と受胎率の向上、計画的生産、胚移植への応用などが可能となる [2, 5]。

GnRH- $\text{PGF}_{2\alpha}$ -GnRH の連続したホルモン投与と定時人工授精を組み合わせるオブシンクは、妊娠率低下に対応するため米国で開発され [11, 12]、その実用性の高さから肉用牛にも利用されている [4, 7, 10, 18]。しかし、オブシンク開始時の卵巢動態により、反応にばらつきがみられるという問題点がある。発情周期の1～4日の早期における処置では、オブシンクの初回 GnRH に反応する主席卵胞の発育がなく、その後2回目の GnRH 投与時の主席卵胞は過熟の状態にあり、卵母細胞の受精能は低く、また排卵しない場合もある [8]。いっぽう、発情周期の13～17日の後期では処理開始時に存在する主席卵胞は小さく、GnRH を投与しても排卵せず、また内因性の $\text{PGF}_{2\alpha}$ 分泌によりオブシンクの $\text{PGF}_{2\alpha}$ 投与前に黄体が退行し、早期に発情や排卵が起こる [8]。黒毛和種牛でも同様な問題が想定され、これに対し、オブシンク処置時にプロジェステロン徐放剤を併用することによりプロジェステロン濃度の低下を防ぎ、受胎率が向上したとする報告がある [4]。

このためオブシンク処置の開始を、その効果が最も高いとされる発情周期の5～12日になるように、事前にホルモン投与を行う発情同期化前処置 (プレシンク) が検討されている [9]。この方法では、14日間隔で2回の $\text{PGF}_{2\alpha}$ 投与を行う方法と、GnRH を投与し、その7日後に $\text{PGF}_{2\alpha}$ を投与する2種類がある。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 投与は卵巢に黄体がある場合効果があり、GnRH 投与ではいったん卵巢を賦活する効果があると思われる。しかし、これらの報告はいずれもホルスタイン種泌乳牛を用いたもので、管理形態の異なる肉用牛での検討は少ない。

今回、黒毛和種牛に対するプレシンク処置がオブシンク開始前の発情同期化やその後の繁殖成績に及ぼす影響を検討した。

材 料 お よ び 方 法

供試牛：試験は2002年9月と2003年2月に行った。供試牛は、鹿児島大学農学部附属牧場において放牧主体で飼養されている黒毛和種38頭 (経産牛27頭、未經産牛11頭) で、定期検診により子宮や卵巢に異常がみられないものである。経産牛は 5.6 ± 3.0 歳 (平均 $\pm$ 標準偏差)、 3.4 ± 2.5 産次、分娩後の日数は 144.5 ± 85.6 日 (37～325日)、5段階で評価した BCS は 3.4 ± 0.7 であ

† 連絡責任者 (現所属)：上村俊一 (宮崎大学農学部獣医学科獣医臨床繁殖学研究室)

〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1 ☎・FAX 0985-58-7787

表1 卵胞直径で分けたクラスⅡ（直径6～9mm）とクラスⅢ（直径10mm以上）の卵胞数の変動（平均±標準偏差）

処置群（頭）	検 査 日				
	0日	7日	19日	26日	28日
プレシンク群（18）					
クラスⅡ	1.67±1.68	—	2.44±1.15	—	3.28±2.22
クラスⅢ	0.33±0.59	0.72±0.67	0.94±0.64	0.78±2.34	1.28±0.75
対照群（20）					
クラスⅡ	1.50±1.28	—	2.60±1.57	—	3.40±2.30
クラスⅢ	0.60±0.60	0.45±0.51	1.00±0.46	0.50±0.51	1.25±0.55
合 計（38）					
クラスⅡ	1.58±1.46 ^A	—	2.53±1.37 ^B	—	3.34±2.23 ^B
クラスⅢ	0.47±0.60 ^C	0.58±0.60	0.97±0.55 ^{Da}	0.63±1.63	1.26±0.64 ^{Db}

検査日 0日：プレシンクGnRH, 7日：プレシンクPGF_{2α}, 19日：オブシンクGnRH, 26日：オブシンクPGF_{2α}, 28日：オブシンクGnRH

—：直腸検査のため、クラスⅡ卵胞の観察なし。 A対B, C対D：P<0.01, a対b：P<0.05

り、未経産牛は2.6±0.6歳、BCSは3.1±0.5であった。経産牛のうちすでに子牛を離乳しているものが18頭あり、2つの処置群に分けた。

試験プロトコール：供試牛を無作為に2群に分け、プレシンク群（n=18）は前処置としてGnRH100μg^{a)}の筋肉内投与を行い（初回GnRH投与日=0日）、その7日後にPGF_{2α}25mg^{b)}の筋肉内注射を行った（7日）。対照群（n=20）は、プレシンク処置の間、生理食塩液を0日（2ml）、7日（5ml）に筋肉内投与した。その12日後、両群において通常のオブシンク処置（GnRH100μg：19日、その7日後PGF_{2α}25mg：26日、その2日後GnRH100μg：28日）を行った。28日のGnRH投与後16～20時間に定時人工授精を行い、人工授精後40日以降に直腸検査により妊娠鑑定を行った。人工授精の実施とは別に、オブシンク処置時の発情発現を確認するため、26日のPGF_{2α}投与時、尾根部に牛専用のテールペイント^{c)}を塗布し、発情徴候を観察した。

試験期間中、GnRH投与時は超音波検査、PGF_{2α}投与時は直腸検査を行い、超音波検査では卵胞直径が6～9mm（クラスⅡ）と10mm以上（クラスⅢ）の卵胞数、黄体の形状および子宮の状態について観察した。直腸検査ではおもにクラスⅢと思われる卵胞数について検査した。各ホルモン剤投与時に、頸静脈よりヘパリン加試験管に血液を採取し、冷却して2時間以内に遠心分離後、マイナス30℃で凍結保存した。血中プロジェステロン（P₄）濃度は、田谷ら〔15〕に従い、2抗体RIAによって測定し、第1抗体としてGDN 337^{d)}を用いた。

卵胞数では、卵胞直径ごとの変動を2つの牛群で独立して検定し、また牛群全体で検査日ごとの変動を検討し

た。0日、7日あるいは19日のいずれかで血中P₄濃度が1.0ng/ml以上の場合、プレシンク処置で卵巣に黄体を形成できた、あるいは対照群ではオブシンク開始前に発情周期が回帰していると判断した。プレシンクによる同期化では、19日のオブシンク開始時（初回GnRH投与時）と26日（PGF_{2α}投与時）の卵巣に機能的黄体があり、血中P₄濃度が1.0ng/ml以上の場合、同期化されたと判定した。また19日と26日の血中P₄濃度を1.0ng/ml以上の場合（H）と1.0ng/ml以下（L）に分け、H-H区、H-L区、L-H区、L-L区の4つについて、オブシンク処置時の頭数割合とそれぞれの受胎率を比較した。プレシンク群と対照群の同期化率の比較では、2×2分割表を用い、フィッシャーの直接確率計算法により検定を行った〔19〕。血中P₄濃度は、プレシンク処置あるいは対照群でオブシンク前に同期化された牛群について各検査日の平均を求め、Student-t検定を用い解析するとともに、経産牛と未経産牛についてもその平均値を検定した。統計処理に関しては、有意水準5%以下で有意とした。

成 績

卵巣所見：クラスⅡとⅢの卵胞直径ごとの卵胞数は、プレシンクのGnRH投与日（0日）では、プレシンク群と対照群に差はみられなかった（表1）。検査日ごとの卵胞数では、両群とも超音波検査法で観察した0日、19日、28日と徐々に増加し、牛群全体でクラスⅡとⅢの卵胞数が0日に比べ19日と28日で有意に増加した（P<0.01）。しかし、群間では検査日ごとの変動に差はみられなかった。

0日、7日、19日のうちいずれかに機能的黄体を持つ牛は、プレシンク群18/18頭、対照群19/20頭で、ほとんどの牛がプレシンク処置により黄体を形成したか、オブシンク前に卵巣の周期的活動がみられた（表2）。プレ

a) スポルネン注、川崎製薬㈱、川崎。

b) プロナルゴン注、ファイザー製薬㈱、東京。

c) DETAIL、サージミヤワキ㈱、東京。

d) Niswender GD, CO, U.S.A.

表2 オブシンク処置時の19日と26日のプロジェステロン濃度で4つに分類した頭数割合とそれぞれの受胎率

プレシンク処置による同期化 ¹⁾			同期化牛		非 同 期 化 牛								合計
19日と26日のプロジェステロン(P ₄)濃度 ²⁾			H-H		H-L		L-H		L-L		計		
処 置 群	頭数	0, 7, 19日の P ₄ >1.0ng/ml ³⁾	頭数	受胎 (%)	頭数	受胎 (%)	頭数	受胎 (%)	頭数	受胎 (%)	頭数	受胎 (%)	受胎 (%)
プレシンク群													
経 産 牛	14	14	11	7 (63.6)	1	1 (100.0)	1	1 (100.0)	1	0 (0)	3	2 (66.7)	9 (64.3)
未経産牛	4	4	3	2 (66.7)	0	0	0	0	1	0 (0)	1	0 (0)	2 (50.0)
計 (%)	18	18 (100.0)	14 (77.8)	9 (64.3)	1 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)	2 (100.0)	2 (0)	4 (22.2)	2 (50.0)	11 (61.1)	
対 照 群													
経 産 牛	13	13	5	3 (60.0)	0	0	8	6 (75.0)	0	0	8	6 (75.0)	9 (69.2)
未経産牛	7	6	5	4 (80.0)	0	0	1	1 (100.0)	1	0 (0)	2	1 (50.0)	5 (71.4)
計 (%)	20	19 (95.0)	10 (50.0)	7 (70.0)	0	0	9 (77.8)	7 (77.8)	1 (0)	10 (50.0)	7 (70.0)	14 (70.0)	
合 計													
経 産 牛	27	27	16	10 (62.5)	1	1 (100.0)	9	7 (77.8)	1	0 (0)	11	8 (72.7)	18 (66.7)
未経産牛	11	10	8	6 (75.0)	0	0	1	1 (100.0)	2	0 (0)	3	1 (33.3)	7 (63.6)
計 (%)	38	37 (97.4)	24 (63.2)	16 (66.7)	1 (100.0)	1 (100.0)	10 (80.0)	8 (80.0)	3 (0)	14 (36.8)	9 (64.3)	25 (65.8)	

1)：同期化牛は19日と26日の両日に機能的黄体あり (P₄>1.0ng/ml)。2)：H：P₄>1.0ng/ml, L：P₄<1.0ng/ml。3)：0, 7, 19日のいずれかでP₄>1.0ng/mlである発情回帰牛。

図1 プレシンク処置により同期化された牛群の血中プロジェステロン濃度の推移

* (プレシンク群の0日対7日)：P<0.05, a対b (7日のプレシンク群と対照群)：P<0.05

シンク処置による同期化牛 (H-H) は、プレシンク群 (77.8%) で、対照群 (50.0%) より高くなった。プレシンクによる同期化の有無と受胎率を比較すると、同期化牛ではプレシンク群 64.3% と対照群 70.0% で差がな

く、また全体でも同期化牛 66.7% と非同期化牛 64.3% の間に差がみられなかった。プレシンク群では L-H 区の牛はわずかであったが (1/18 頭)、対照群では約半数がこの区に属していた (9/19 頭)。また、プレシンク群および対照群の両方で、H-L 区および L-L 区に属する牛の数は非常に少ないか、あるいは皆無であった (表 2)。

血中 P₄ 濃度：プレシンク群では黄体の形成に伴い 0 日に比べ 7 日では血中 P₄ 濃度が有意に増加したが、対照群では変化がみられなかった (図 1)。また、7 日でプレシンク群と対照群に有意差がみられたが、それ以後では差がなかった。各群とも、28 日の第 2 回目の GnRH 投与時には 1ng/ml 以下に低下した。

テールペイントでの観察の結果、28 日までにプレシンク群 4 頭、対照群 4 頭のいずれも経産牛の 8 頭 (29.6%) でペイントの剥がれがあり、発情行動が観察された。未経産牛ではテールペイントはそのまま残り、発情の発現はみられなかった。

考 察

今回、超音波検査法により卵巣を観察したところ、各検査日において卵胞直径で 2 群に分けた卵胞数の変動にプレシンク群と対照群で差がみられなかった。プレシンク-オブシンク併用群はオブシンク単独よりも妊娠率を 12% (37% から 49%) [3]、または 18% (25% から

43%) [9] 上昇させたという報告がある。しかし、今回の試験ではプレシンク群 (61.1%) と対照群 (70.0%) に違いがみられなかった。また、オブシンク時の19日と26日の両日に黄体が存在する同期化牛 (H-H) とそれ以外の非同期化牛の受胎率にも差はみられなかった。今回、対照群のほとんどすべての牛で (19/20頭)、オブシンク処置開始時までに卵巣が活動 (cycling) しており、さらに受胎率の低下する可能性の高いH-Lの牛はまったく含まれていなかった (0/20頭)。このため、本試験でプレシンクの効果がみられなかった理由として、対照群で卵巣が周期的に活動している牛を使用したためであり、さらに受胎率の低下する可能性の高い発情後期の牛 (H-L) がまったく含まれていなかったことが考えられる。

プレシンク群ではGnRH投与後7日では経産牛や未経産牛のいずれも血中 P_4 濃度が増加し、卵巣にある主席卵胞の排卵により新たな黄体が形成され、血中 P_4 濃度が増加したものと考えられる。その後、新しい卵胞波が形成され、卵巣活動が刺激されたことにより、オブシンクの19日と26日には機能的な黄体が存在し、また発情周期のステージがより揃うことにより血中 P_4 濃度が高くなったものと思われる [2]。オブシンク開始時の発情周期が5~9日の適期にある牛群では、オブシンク処置の初回GnRH投与で96%が排卵するが、1~4日の発情周期の牛群では23%の排卵しかなかったとする報告がある [17]。一般にオブシンクでは、初回GnRHに反応して主席卵胞が排卵すると、その後の同期化率が高まり、受胎率も高まるとされる [16]。今回は非同期化牛ではL-H群が多く、またPGF_{2α}投与の26日に黄体が存在しなかった4頭を含めいずれも28日のGnRH投与時には P_4 濃度が低下し、高い受胎率につながるものと思われる。

未経産牛は経産牛に比べてオブシンクによる妊娠率の低くなることが指摘されている [14]。この原因はオブシンクの最初のGnRHによって排卵が起こる確率が低いことや、PGF_{2α}投与の前に高い確率 (17.3%) で発情がみられることにある [13]。その結果、2回目のGnRH投与で排卵する確率は経産牛の64~90% [11, 17] に比べ、未経産牛は50~56% [6, 12] と低くなり、未経産牛のオブシンク後の定時人工授精の妊娠率は低下する。しかし、本研究ではオブシンク開始時の同期化率は経産牛59.3% (16/27頭)、未経産牛72.7% (8/11頭) であり、受胎率は経産牛66.7%、未経産牛63.6%となり、両群に違いはみられなかった。

今回、テールペイントで観察した発情はPGF_{2α}投与後8頭の経産牛にみられた。通常オブシンク処置では発情徴候の発現は少なく、また発情の有無と受胎率の間には

有意差がみられないとされ [1, 8]、今回も同様の成績であった。

今回、GnRH-PGF_{2α}投与によるプレシンク処置で、オブシンク開始時の発情周期を適期に調節できたが、プレシンク処置の受胎率に及ぼす効果はみられなかった。

稿を終えるにあたり、プロジェステロンの第1抗体を提供していただいたColorado State Univ.のDr. GD Niswenderに感謝するとともに、供試薬剤を提供していただいた川崎製薬 (GnRH)、ファイザー (PGF_{2α}) に深く感謝する。本研究の一部は、文科省科学研究費補助金 (課題番号16580263) によった。

引用文献

- [1] de la Sota RL, Burke JM, Risco CA, Moreira F, DeLorenzo MA, Thatcher WW : Theriogenology, 49, 761-770 (1998)
- [2] El-Zarkouny SZ, Cartmill JA, Hensley BA, Stevenson JS : J Dairy Sci, 87, 1024-1037 (2004)
- [3] El-Zarkouny SZ, Cartmill JA, Richardson AM, Medina-Britos MA, Hensley BA, Stevenson JS : J Anim Sci, 79, 249 (Abstract) (2001)
- [4] Kawate N, Itami T, Choushi T, Saitoh T, Wada T, Matsuoka K, Uenaka K, Tanaka N, Yamanaka A, Sakase M, Tamada H, Inaba T, Sawada T : Theriogenology, 61, 399-406 (2004)
- [5] Macmillan KL : NZ Vet J, 50, Supple 67-73 (2002)
- [6] Martinez MF, Adams GP, Kastelic JP, Bergfelt DR, Mapletoft RJ : Theriogenology, 54, 757-769 (2000)
- [7] Martinez MF, Kastelic JP, Adams GP, Cook B, Olson WO, Mapletoft RJ : Theriogenology, 57, 1049-1059 (2002)
- [8] Moreira F, de la Sota RL, Diaz T, Thatcher WW : J Anim Sci, 78, 1568-1576 (2000)
- [9] Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW : J Dairy Sci 84, 1646-1659 (2001)
- [10] Osawa T, Morishige D, Ohta D, Kimura Y, Miyake Y : J Vet Med Sci, 65, 459-464 (2003)
- [11] Pursley JR, Kosorok MR, Wiltbank MC : J Dairy Sci, 80, 301-306 (1997)
- [12] Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC : Theriogenology, 44, 915-923 (1995)
- [13] Roy GL, Twagiramungu H : Theriogenology, 51, 413 (Abstract) (1999)
- [14] Schmitt EJP, Diaz T, Drost M, Thatcher WW : J Anim Sci, 74, 1084-1091 (1996)
- [15] 田谷一善, 渡辺 元, 笹本修司 : 家畜繁殖誌, 31, 186-197 (1985)
- [16] Thatcher WW, Moreira F, Pancarci SM, Bartolome JA, Santos JEP : Domest Anim Endocrinol, 23, 243-254 (2002)
- [17] Vasconcelos JLM, Silcox RW, Rosa GJM, Pursley JR, Wiltbank MC : Theriogenology, 52, 1067-1078 (1999)
- [18] Williams SW, Stanko RL, Amstalden M, Williams GL : J Anim Sci, 80, 1173-1178 (2002)
- [19] 柳井久江 : エクセル統計, 81-222, オーエムエス出版, 所沢 (2001)

Effects on Japanese Black Cows of Presynch Treatment in the Ovsynch Protocol

Toru YAMAZAKI*, Shunichi KAMIMURA†, Takaaki ANDO, Katsumi HAMANA
and Kazutoshi MATSUZAKI

* Kagoshima University, Korimoto 1-21-24, Kagoshima, 890-0065, Japan

SUMMARY

To determine the effects on Japanese Black cows of presynch treatment in the ovsynch protocol, one group of animals (presynch group, $n = 18$) was subjected to GnRH injection, which was followed by $\text{PGF}_{2\alpha}$ seven days later. Then the ovsynch protocol (GnRH- $\text{PGF}_{2\alpha}$ -GnRH) was initiated 12 days later with timed AI 16-20 hours after the second GnRH injection. A control group ($n = 20$) received saline injections during the presynch treatment preceding the ovsynch protocol. Synchrony, evaluated with a corpus luteum function at the time of GnRH and $\text{PGF}_{2\alpha}$ injection during the ovsynch protocol was 77.8% in the presynch group and 50.0% in the control group. CL were present in 10 out of 14 asynchronous cows at the time of $\text{PGF}_{2\alpha}$ injection. Conception rates were high in both groups (61.1% in the presynch group and 70.0% in the control group) with no differences between the two. Although presynch treatment contributed to higher synchrony before the ovsynch protocol in Japanese Black cows, there was no increment in conception rate.

—Key words : Japanese Black cows, ovsynch protocol, presynch treatment, synchronization, timed AI.

† Correspondence to : Shunichi KAMIMURA (Miyazaki University)

Nishi 1-1, Gakuen-Kibanadai, Miyazaki, 889-2192, Japan TEL · FAX 0985-58-7787

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 58, 541 ~ 545 (2005)

日本産業動物獣医学会誌編集委員会委員

【編集委員】

◎澤田 勉 (元・大阪府立大学大学院農学生命科学研究科)
○小川 博之 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
金田 義宏 (元・東京農工大学農学部)
佐藤 繁 (宮城県農業共済組合連合会県南家畜診療センター)
八木 行雄 (動物衛生研究所企画調整部)
明石 博臣 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
今井 壯一 (日本獣医畜産大学獣医学部)

梅村 孝司 (北海道大学大学院獣医学研究科)
月瀬 東 (日本大学生物資源科学部)
中澤 宗生 (動物衛生研究所安全性研究部)
(◎委員長, ○副委員長)

編集人 日本産業動物獣医学会
会長 酒井 健夫

『*投稿を希望される方は、学会誌投稿規程(第57巻第12号819頁)及び三学会誌投稿の手引き(第58巻第6号419頁)をご参照ください』