

## 定時人工授精を実施したホルスタイン種メス牛の 卵巢動態の経時的变化

谷原礼諭・山下洋治・上村圭一・香川正樹・大谷徳寿<sup>1)</sup>

### Serial ovary change in timed artificial insemination carried out Holstein Cow.

Ayatsugu TANIHARA, Youji YAMASHITA, Keiichi UEMURA, Masaki KAGAWA,  
Noritoshi OHTANI

#### 要 約

定時人工授精を延べ8頭のホルスタイン種メス牛に実施し、各ステージの卵巢を超音波診断装置で観察し、以下の結果を得た。

1. 受胎したのは、延べ8頭中0頭であった。その内2頭は、排卵が確認できたが、黄体は形成していなかった。4頭は、排卵、黄体形成が確認できたが、排卵後約18日目には黄体が退行していた。2頭は、排卵、黄体形成、排卵後約18日目に黄体が維持できていたが、妊娠していなかった。
2. 相関関係では、CIDR除去時における排卵側卵巢の卵胞の大きさと発情時における排卵側卵巢の卵胞の大きさ、発情時における排卵側卵巢の卵胞の大きさと黄体形成時における黄体の大きさなどで高い正の相関関係が認められ、CIDR除去時における排卵側卵巢の卵胞数と発情期における排卵側卵巢の卵胞の大きさ、発情時における排卵側卵巢の卵胞数と黄体退行時における排卵側卵巢の黄体の大きさなどで高い負の相関が認められた。

#### 緒 言

乳牛の受胎率低下問題が指摘されて久しいが、根本的な解決策は見いだされていない。人工授精業務は、日ごろの発情観察が重要であるが、生産及び暑熱ストレスなどによる微弱発情や規模が大きくなれば発情を見逃し、人工授精の機会を逃しているのが現状である。

そのような中、受胎率向上のため、通常的人工授精のほか、後追い移植、イージーブリードショートプログラムなど、さまざまな方法の授精技術が提唱されている。特に、最近の知見では通常の微弱発情や卵巢疾患などが原因で、通常的人工授精で受胎しにくい牛でも、定時人工授精を実施することによって受胎にいたるケースが報告されている<sup>1)</sup>。

そこで、通常人工授精では受胎しにくい牛に定時人工授精を適用し、超音波診断装置を用いて卵巢動態の経時的变化と受胎との関係を調査した。

1) 現 香川県東部家畜保健衛生所

## 材料及び方法

### 1. 調査牛

調査牛は、平成 21 年 4 月から平成 22 年 3 月に定時人工受精を実施した香川県畜産試験場にて飼養しているホルスタイン種雌牛延べ 8 頭である。

### 2. 定時人工授精プロトコール

定時人工授精のプロトコールは表 1 に示した。

### 3. 卵巢動態の経時的変化の観察

卵巢動態の把握は、直腸からの触診による卵巢、卵胞及び黄体の形状及び触感並びに超音波診断装置（日立メディコ製 EUB-200V 型、昭和 62 年製）を用いた左右の卵巢横断面の超音波画像を用いた。卵巢の超音波横断面画像はスキャナーでデジタル画像化し、Scion Image（Scion 社、フリーソフトウェア）で卵巢、卵胞、黄体の大きさを計測した。

実施のタイミングは、定時人工授精開始前、CIDR 除去時、発情確認時、排卵確認時、黄体形成確認時及び黄体退行有無の確認時である。

妊娠鑑定は、処理開始から 52 日目以降に超音波診断装置により実施した。

### 4. 統計処理

統計解析は SAS の CORR プロシジャーを用いた。

表 1 定時人工授精プロトコール及び経時的卵巢変化観察のタイミング

日程	ホルモン処理、卵巢動態調査及び人工受精	
	9:00	17:00
① 0 日目	CIDR (挿入) + EB (2mg)	
② 7 日目	CIDR (除去) + PGF2 $\alpha$ (3ml)	
③ 8 日目	EB (1mg)	
④ 10 日目	ECHO (発情確認)	AI
⑤ 11 日目	ECHO (排卵確認)	
⑥ 17～20 日目	ECHO (黄体形成確認)	
⑦ 28 日目	ECHO (黄体退行有無確認)	
⑧ 52 日目～	ECHO (妊娠確認)	

※使用薬剤 CIDR：膈内留置プロゲステロン製剤（イージーブリード、社団法人家畜改良事業団）

EB：安息香酸エストラジオール（エストラジオール注、川崎三鷹製薬）

PGF2 $\alpha$ ：（プロナルゴン F、ファイザー株式会社）

## 結 果

### 1 受胎状況

供試牛延べ8頭はすべて受胎しなかった。

### 2 卵巢の経時的な変化

AI から排卵までの時間は、-17 時間から 12 時間と 29 時間の幅があった。中でも、-17 時間は AI のタイミングが大きく遅れた。大きく遅れた個体については、2 回目に実施したところ、AI 後 12 時間後に排卵した。

排卵の有無については、延べ8頭すべてが排卵した。

AI 後約 8 日目の黄体形成については、7 頭が黄体形成し、1 頭が黄体形成せずに卵胞囊腫となった。黄体形成した卵巢は、排卵した側であり、1 頭は排卵しなかった卵巢でも黄体形成が観察された。

AI 後約 19 日目時点での黄体退行の有無については、5 頭が黄体退行、1 頭が卵胞囊腫から黄体化、2 頭が黄体を維持していた（表 2）。

表 2 定時人工授精の実施状況と経時的卵巢変化

調査牛	処理開始日	AI より排卵	⑤ <sup>※3</sup>	⑥	⑦	⑧
		までの時間 (時間) <sup>※2</sup>	排卵有無 (左右)	黄体形成 (左右)	黄体退行 (所見)	受胎 有無
H474 <sup>※1</sup>	2009. 4. 20	-17	有 (右)	有 (右)	退行	無
H711	2009. 4. 20	-17	有 (左右)	有 (左右)	退行	無
H474	2009. 7. 7	12	有 (右)	有 (左右)	退行	無
H711	2009. 7. 7	12	有 (右)	有 (右)	黄体維持	無
H583	2010. 3. 23	7	有 (右)	有 (右)	黄体維持	無
H452	2010. 3. 23	7	有 (右)	有 (右)	退行 (右卵胞囊腫)	無
H515 <sup>※4</sup>	2010. 3. 29	7	有 (右)	有 (右)	退行	無
H567 <sup>※4</sup>	2010. 3. 29	6	有 (右)	無 (右卵胞囊腫)	囊腫黄体化 (右)	無

※1 2008 年 6 月 29 日に妊娠 4 箇月齢で流産し、その後正常な発情周期があるものの不妊の状態継続中。

※2 AI より排卵までの時間は、超音波診断装置による卵巢観察と膣内の状態から排卵時刻を推定して求めた。

※3 ⑤～⑧は、表 1 に示した観察のタイミングにおける卵巢の状態。

※4 定時人工授精では受胎しなかったがその後の人工授精で受胎。

### 3 卵巢、卵胞、黄体の大きさの各ステージ相互の関係

## 定時人工授精を実施したホルスタイン種メス牛の卵巢動態の経時的変化

CIDR 除去時に排卵卵巢側の卵胞が大きいと発情時及び排卵時に排卵側卵巢の卵胞が大きく ( $r=0.87$  など)、黄体形成時の排卵側卵巢における形成された黄体 ( $r=0.94$ ) や排卵後約 18 日後の黄体退行期における黄体の大きさも大きい関係 ( $r=0.98$ ) にあった。また、発情時に排卵側の卵胞が大きいと、排卵時の排卵側卵胞の卵胞 ( $r=0.96$  など) や黄体形成時の黄体が大きい ( $r=0.86$ ) 傾向にあった。逆に、ほとんどの個体で黄体退行が認められたところから、黄体退行期には黄体の大きさが小さい傾向にあった ( $r=-0.97$ )。

CIDR 除去時における排卵側卵巢の卵胞数が多いと発情期における排卵側卵巢の卵胞が小さくなる傾向にあり ( $r=-0.91$ )、発情時における排卵側卵巢の卵胞数が多いと黄体退行時における非排卵側卵巢の黄体の大きさが小さくなる傾向 ( $r=-0.97$ ) が認められた (表 3-1、表 3-2)。

### 4 定時人工授精で不受胎時の卵巢の変化とその後の通常人工授精で受胎時の卵巢変化の比較

H515 及び H567 については、定時人工授精で受胎しなかったが、その後、通常人工授精で受胎した。特に、H515 は、定時人工授精で不受胎を確認した直後に発情が確認できたため、通常人工授精を実施したところ、受胎した。発情時には、左右卵巢ともに卵胞嚢腫が疑われる卵胞があり、人工授精後、GnRh を投与した。その後、左右ともに排卵が認められ、排卵後 7 日後の観察において、左側に黄体が形成された。形成された黄体は、排卵後 18 日後には共存卵胞があったが、黄体が充実し、受胎した。

H567 は、定時人工授精を実施した際には、排卵後、黄体が形成されず、卵胞嚢腫になった。その後、治療を行ったが、卵胞嚢腫を繰り返す、暑熱ストレスのかかる夏となった。その後、涼しくなり、通常人工授精 (定時人工授精から約 7 ヶ月後の 11 月実施) を実施したところ、受胎した。

定時人工授精を実施したホルスタイン種メス牛の卵巢動態の経時的変化

表3-1 CIDR除去時の卵巢動態とその後の卵巢動態との相関係数

	CIDR除去時				排卵側卵巢				非排卵側卵巢						
	卵巢 短径 (mm)	卵巢 数	1 卵胞 長径 (mm)	2 卵胞 短径 (mm)	1 卵胞 長径 (mm)	2 卵胞 短径 (mm)	3 卵胞 短径 (mm)	黄体 の有 無 (%)	黄体 短径 (mm)	黄体 断面 積 (mm <sup>2</sup> )	1 卵胞 長径 (mm)	1 卵胞 短径 (mm)	2 卵胞 長径 (mm)	3 卵胞 長径 (mm)	黄体 の有 無 (%)
発情時	卵巢短径 (mm)		0.87	0.85											
	1 卵胞長径 (mm)		-0.91	0.82			0.91								
	1 卵胞短径 (mm)			0.85											
	2 卵胞長径 (mm)					-1.00									
	3 卵胞短径 (mm)							0.96							
非排卵側卵巢	卵巢短径 (mm)														
	1 卵胞長径 (mm)								1.00						
	1 卵胞短径 (mm)														
	2 卵胞長径 (mm)														
	3 卵胞短径 (mm)														
排卵時	卵巢長径 (mm)														
	1 卵胞長径 (mm)														
	2 卵胞短径 (mm)														
	3 卵胞長径 (mm)														
	黄体の有無(有=1、無=0)														
非排卵側卵巢	卵巢長径 (mm)														
	1 卵胞長径 (mm)														
	1 卵胞短径 (mm)														
	2 卵胞長径 (mm)														
	2 卵胞短径 (mm)														
黄体形成時	卵巢短径 (mm)														
	1 卵胞短径 (mm)														
	1 卵胞長径 (mm)														
	2 卵胞長径 (mm)														
	黄体断面積 (mm <sup>2</sup> )														
黄体退行時	1 卵胞長径 (mm)														
	1 卵胞短径 (mm)														
	黄体退行有無(有=1、無=0)														
	黄体長径 (mm)														
	2 卵胞長径 (mm)														

※ □はp<0.01、他は; ※ □はp<0.01、他はp<0.05

定時人工授精を実施したホルスタイン種メス牛の卵巢動態の経時的変化

表3-2 発情時の卵巢動態とその後の卵巢動態との相関係数

		排卵側卵巢						非排卵側卵巢							
		1 卵胞数	1 卵胞短径 (mm)	2 卵胞長径 (mm)	2 卵胞短径 (mm)	3 卵胞長径 (mm)	3 卵胞短径 (mm)	1 卵胞長径 (mm)	1 卵胞短径 (mm)	2 卵胞長径 (mm)	2 卵胞短径 (mm)	3 卵胞長径 (mm)	3 卵胞短径 (mm)		
排卵時	排卵側卵巢	卵巢短径 (mm)	0.86												
		卵胞数			0.96										
		1 卵胞長径 (mm)	0.96				1.00								
		1 卵胞短径 (mm)	0.96				1.00								
		2 卵胞長径 (mm)	0.95				1.00								
		2 卵胞短径 (mm)													
		3 卵胞長径 (mm)													
		3 卵胞短径 (mm)													
		卵巢長径 (mm)							0.86						
		卵巢短径 (mm)								0.91					
黄体形成時	排卵側卵巢	卵巢長径 (mm)	0.85												
		卵巢短径 (mm)	0.89												
		卵胞数	0.86												
		黄体短径 (mm)	0.83	0.86											
		卵巢長径 (mm)	0.85	0.88				0.96							
		卵胞数													
		1 卵胞長径 (mm)													
		1 卵胞短径 (mm)													
		黄体個数	-0.90												
		黄体断面積 (mm <sup>2</sup> )													
黄体退行時	排卵側卵巢	卵巢長径 (mm)	0.87												
		卵胞数	0.94												
		1 卵胞長径 (mm)													
		1 卵胞短径 (mm)													
		2 卵胞長径 (mm)													
		2 卵胞短径 (mm)													
		黄体退行有無													
		黄体断面積 (mm <sup>2</sup> )													
		卵巢短径 (mm)	-0.90												
		卵胞数													

※ □はp<0.01、他はp<0.05

## 考 察

最近、乳牛の受胎率低下が指摘されているが、中尾<sup>2)</sup>は、山口県、北海道米国の繁殖成績は初回受胎率 36.6%~40.0%であり、その牛群で繁殖正常な牛群は全体の 40%で平均空胎日数が 72 日と正常な繁殖成績であるのに対し、24%の繁殖不良群が全体の繁殖成績を著しく低下させているとしている。本試験では、延べ 8 頭の牛に定時人工授精を実施したが、その結果、すべてが不受胎であり、受胎した個体との比較ができなかった。結局 2 頭は廃用となったが、廃用となった内の 1 頭は、本試験実施約 10 ヶ月前に妊娠 4 カ月で流産し、その後、正常な性周期が認められたものの、通常人工授精では受胎していなかった。この個体の卵巢は定時人工授精でも排卵、黄体形成は正常な状態であったが、黄体退行時まで黄体を維持できていなかった。このことから、たとえ、ホルモンプログラムを実施して発情、排卵、黄体形成までの卵巢の動きを適正に導くことができても、受精卵の着床やその後の妊娠維持までには至らないために不受胎となったものと考えられた。

排卵卵胞の大きさと人工授精後の受胎率との関係を調べた報告では、オブシンクなどの定時人工授精を用いた場合、排卵卵胞のサイズが小さいと受胎率が低下することが報告されている<sup>3,4)</sup>。本試験では、定時人工授精を実施したものでは受胎しなかったため、比較ができなかったが、排卵卵胞が大きい方が黄体形成時の黄体が大きい傾向が認められた。一方、通常人工授精では、排卵卵胞の大きさと受胎との関係は認められないとの報告もあり<sup>4)</sup>、このことは、排卵誘起を行う定時人工授精においては、卵胞の大きさが卵胞及び卵子の発育に強く影響するが、自然発情では必ずしも卵胞のサイズによっては発育を規定できないものであることを示している。今後、卵胞機能と卵子品質との関係について、排卵直前の卵胞液を微量採取後人工授精を実施し、卵胞機能の解析とその後の受胎性の関係を調べることで卵胞機能と受胎性の因果関係を明らかにできるであろう<sup>10)</sup>。

黄体の大きさと受胎率に関しては、妊娠牛では黄体重量が大きいという報告<sup>5)</sup>や、排卵卵胞が大きな個体では、その後形成される黄体が大きく、受胎率も高いことが示されている<sup>6)</sup>。本研究では、サンプル数や受胎の問題から、比較検討ができなかったが、通常人工授精で受胎した個体と定時人工授精で不受胎の群も同様の大きさの黄体形成が認められた。不受胎の原因は、黄体形成せずに卵胞嚢腫となった個体を除いて、発情期周辺の排卵、黄体形成に問題があるのではなく、受精卵が着床し、妊娠を維持するための子宮内環境が影響したと考えられる。

本研究では検討していないが、一般に黄体機能については、血中プロゲステロン (P4) 濃度を解析することで評価されるが、受胎性と血中 P4 濃度との関係については、受胎牛と不受胎牛との間で、黄体退行の始まる時期まで差異がないとする報告<sup>7)</sup>と授精後早期 (授精後 6 日目ごろ) から差異がみられるとする報告<sup>8)</sup>、授精後 6 日から 14 日目の P4 濃度の上昇率は受胎牛の方が高い傾向であるという報告もある<sup>11)</sup>。また、授精後 5 から 9 日まで、あるいは、授精後 12 から 16 日まで、膈内留置型 P4 製剤による処置を行い、肺の発育への影響を調べた研究では、授精後早期の P4 処置が胚の成長を促すことが明らかとなっている<sup>9)</sup>。さらに、授精後 6 日目の主席卵胞では受

胎牛と不受胎牛とに差はないが、血中エストラジオール (EB) 濃度は、不受胎牛で有意に高い値であることが示された<sup>11)</sup>。受胎成立のためにはすみやかな血中 P4 濃度上昇が必要であるが、高い血中 EB 濃度は、P4 優位であるべき子宮環境を胚にとって不適切な環境に導く可能性が考えられる。本研究においては、超音波診断画像から排卵後 7 日から 18 日までの黄体は、形状を大きく変えているものと変えていないものが存在することも観察された。今回、黄体の運動性については評価していないが、運動性が P4 濃度の速やかな上昇と関係するとすれば大変興味深いことである。いずれにしても、受胎成立のためには、排卵後の良好な黄体形成が重要であることには変わりはないと思われる。

### 引用文献

- 1) 永淵他. 乳牛の分娩間隔短縮を主体とした飼養管理技術の確立一定時授精法の検討ー. 佐賀県畜産試験場研究報告 (2007) p24-26
- 2) 中尾 俊彦. 乳牛の繁殖性低下原因の解明と繁殖性向上プログラムの開発. 家畜人工授精 256, 2010
- 3) M. W. Peters J. R. Pursley, Timing of final GnRH of the Ovsynch protocol affects ovulatory follicle size, subsequent luteal function, and fertility in dairy cows. *Theriogenology* 60, 1197-1204, 2003
- 4) George A. Perry et al. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 5268-5273. 2005
- 5) M. P. Green et al. Relationship between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Animal Reproduction Science* 88, 179-189. 2005
- 6) J. L. M. Vasconcelos et al. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56, 307-314. 2001
- 7) J. Chagas e Silva, L. Lopes da Costa. Luteotrophic influence of early bovine embryos and the relationship between plasma progesterone concentrations and embryo survival. *Theriogenology* 64, 49-60. 2005
- 8) G. E. Mann and G. E. Lamming. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121, 175-180. 2001
- 9) G. E. Mann et al. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- $\tau$  production in the cow. *The Veterinary Journal* 171, 500-503. 2006
- 10) J. A. Atkins et al. Factors affecting preovulatory follicle diameter and ovulation rate after gonadotropin-releasing hormone in postpartum beef cows. Part II: Anestrous cows. *J. Anim Sci.* 88, 2311-2320. 2010
- 11) 平成 20 年度問題別研究会「牛における受胎率低下要因の解明と対策技術の開発」資料. 2008