

乳牛における授精後の腔内留置型黄体ホルモン製剤(CIDR)の

20日間留置と早期妊娠鑑定による再授精プログラムの開発

福島宜彦¹⁾・青木直人²⁾・大川智章¹⁾

摘要：受胎率向上の目的で、人工授精後に腔内留置型黄体ホルモン製剤(CIDR)を留置する手法について、黄体ホルモンであるプロゲステロン(P4)補充効果の延長による受胎促進、妊娠維持作用を期待して、CIDR留置期間を従来法より6日長い20日間とし、授精後32日で妊娠鑑定を実施、不受胎が判明した牛には直ちに発情誘起、35日に再授精する新たなプログラムについて検討した。初回授精から2回目授精までの受胎率は従来法とほぼ同等であったが、初回授精のみの受胎率では有意差はないものの下回る傾向がみられた。

超音波画像診断装置により撮影した黄体画像の輝度値は、両試験区とも試験期間中、受胎牛においては比較的安定した値をとったが、不受胎牛では一過性の低下や、急激な上昇など大きな変動がみられた。

これらのことより CIDR 留置期間を従来法より長い 20 日間とし、早期妊娠鑑定と発情誘起、定時授精を組み合わせたプログラムは、初回授精が不受胎だった場合の確実な再授精実施、発情観察の省力化を可能にすることが確認された。また超音波画像における黄体輝度値の推移は、早期の妊否推定の判断材料になりうることが示唆された。

キーワード：乳牛、腔内留置型黄体ホルモン製剤、早期妊娠鑑定、授精プログラム、輝度値

緒言

乳牛において受胎率の低下、空胎日数の延長など繁殖成績の不振が問題となっており¹⁻³⁾、酪農経営に悪影響を及ぼしている。繁殖成績を悪化させる要因として、ホルモンバランスの不均衡、子宮の炎症などによる胚の発育・着床障害^{4,5)}、胚死滅^{3,6)}、不適切な人工授精(AI)タイミングによる受精障害⁶⁾、発情見逃し^{3,7)}などが考えられている。黄体ホルモンであるP4の血中濃度は、胚の発育⁸⁻¹⁰⁾や後期胚死滅の発生^{3,6,11)}に影響を与えることが知られており、受胎率向上の目的で人工授精後のCIDR留置が試みられている¹²⁻¹⁷⁾。既往の研究では、授精後のCIDR留置により、受胎率が向上したという報告^{12,13)}と効果がなかったという報告¹⁴⁻¹⁷⁾の両者が存在し、必ずしもP4補充による受胎率向上効果が得られているわけではない。

また授精後にCIDR(controlled internal drug release)留置を行っても、CIDR抜去後から妊娠鑑定までの間、発情観察を続ける必要があり、かつ授精の結果が不受胎であるにもかかわらず発情が発見されなかった場合には、空胎期間の延長を招く。酪農の現場では、受胎率向上を目的として、授精後5～19日の14日間CIDRを留置し、次回発情を観察するModified fast back program⁸⁾

が行われているが、今回P4補充効果の持続と再発情発見の省力化を期待して、従来法より長い授精後5～25日の20日間 CIDRを留置し、早期妊娠鑑定により不受胎が判明次第、発情誘起により再授精を行うプログラムを考案し、その効果について検討した。

材料及び方法

1 供試牛及び試験区分

愛知県農業総合試験場畜産研究部フリーストール牛舎で飼養している「ホルスタイン」種雌牛のうち、分娩後90～120日を経過し、かつ人工授精未実施の14頭(1～4産次)を供試した。

発情周期の任意の時期にCIDRショートプログラム法により定時人工授精を実施(Day0とする)した後、Day5にCIDRを挿入し、以下の2区を設定した(図1)。

(1) CIDR20日間区 (n=7)

CIDRを20日間留置し、Day25に抜去とGonadotropin releasing hormone (GnRH)投与、Day32に妊娠鑑定を実施し、不受胎だった場合はovsynch法⁷⁾により発情誘起し、Day35に定時人工授精した。

(2) CIDR14日間区 (n=7)

CIDRを14日間留置し、Day19に抜去後、発情を発見し

¹⁾畜産研究部 ²⁾畜産研究部(現東部家畜保健衛生所)

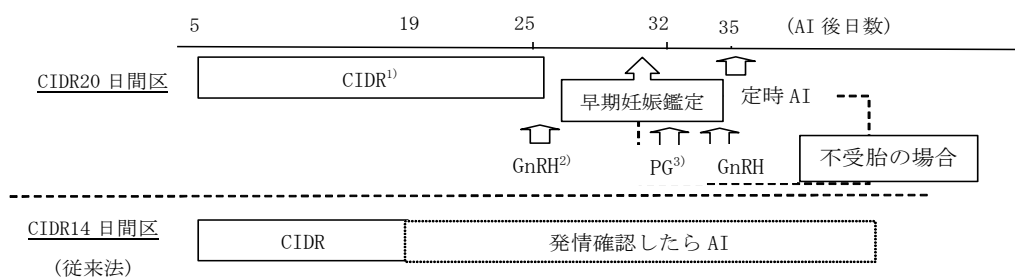


図1 試験区分及び処置

- 1) CIDR(シダー1900、ゾエティス・ジャパン株式会社、東京)
- 2) GnRH(スポルネン・注、共立製薬株式会社、東京)
- 3) PG(動物用プロナルゴンF注射液、ゾエティス・ジャパン株式会社、東京)

たら再授精を実施した。妊娠鑑定はDay35からDay40までに実施した。

両試験区とも初回授精及び初回授精が不受胎だった後の2回目授精までの成績を集計した。なお、2回目授精の際はCIDR留置を実施しなかった。

2 超音波画像診断及び血清中P4濃度の測定

Day5、16、19、22、25、28、32に超音波画像診断装置(HS-101V、本多電子株式会社、愛知)を用いて卵巣を観察し、その画像を保存した。卵巣の画像データはコンピューター上で、画像処理ソフト Image J(National Institutes of Health、ベセスダ、USA)を用いて、黄体の断面積及び酒井ら¹⁸⁾の方法に準じて撮影した黄体領域の輝度値を測定した。なお、これらの測定は黄体が退行し、周囲組織との境界が不明瞭となるまで継続した。また同日、尾静脈から採血を行い、採取した血液は3000 rpm、5分間遠心分離し、血清を-80℃で冷凍保存した。P4濃度の測定は株式会社帯広臨床検査センター(北海道)に依頼した。

3 統計処理

両群の受胎率の比較をFisherの直接確率検定を用いて行った。

結果及び考察

1 繁殖成績及び血清中P4濃度

繁殖成績を表1に示した。初回授精受胎率はCIDR20日間区が下回ったが、有意差は認められなかった。初回授精が不受胎であった後の2回目授精について、CIDR20日間区では初回授精が不受胎であった6頭全てDay35に定時授精を実施し、うち3頭が受胎した。初回授精からDay35までの間、発情徴候が認められた牛はなかった。一方CIDR14日間区で初回授精が不受胎だった2頭は、それぞれDay24とDay43に発情が発見され、2回目授精が実施されたが、ともに不受胎であった。その結果、2回目授精までの受胎率は両試験区でほぼ同等であった。

血清中P4濃度の推移について、両試験区とも初回授精で受胎したものはDay19以降、4 ng/ml以上を維持した。一方、初回授精が不受胎であったものは、黄体の退行に伴いDay22までに大きく低下した(図2)。CIDR14日間区で

表1 繁殖成績

試験区	初回授精受胎率	2回目授精までの受胎率
CIDR20日間区	14.3% (1/7)	57.1% (4/7)
CIDR14日間区	71.4% (5/7)	71.4% (5/7)
有意差	n. s.	n. s.

初回授精が不受胎であった2頭は、Day19からDay25のいずれかに0.2 ng/ml未満まで低下し、かつ排卵が確認された。CIDR20日間区の不受胎牛6頭中5頭はDay19からDay25の間0.7 ng/ml以上を維持し、全頭とも排卵は認められなかったことから、継続留置されていたCIDRにより外因性P4の補充が続いていたと考えられる。なおDay22とDay25に0.4 ng/mlとなった1頭は腔内に尿が貯留する尿腔の状態であり、そのため腔からのP4吸収が阻害されていた可能性が考えられた。

授精後にCIDR留置を行った既往の研究¹²⁻¹⁷⁾の多くは、発情周期の前半にCIDR留置を開始し、P4濃度の上昇を促すことで受胎率の向上を期待するものである。一方、妊娠20日前後の黄体ホルモン濃度が低いと胚死滅が増加する³⁾ことが知られており、また、秋田¹¹⁾は、授精後25~35日の「ホルスタイン」種雌牛に注射用P4製剤を単回投与したところ、胚死滅の発生率が低下したことを報告している。そこで今回の試験では、発情周期の前半におけるP4濃度の上昇を補助しつつ、授精後20日以降もP4を補充することで胚の生存性を高めることで受胎率の向上を期待し、CIDRを授精後5~25日まで留置する手法を考案した。しかしながら、本手法によっても受胎率の向上が認められなかった原因について、CIDRからのP4補充量が徐々に低下し、授精後19日以降のP4濃度が受胎促進効果を発揮するには不十分であったか、供試牛における胚の発育不良や後期胚死滅の影響が小さかったため、P4補充による効果が顕在化しなかったことなどが推測される。

また、高橋¹⁹⁾はDay14からDay21にCIDRを留置した14頭中8頭で発情回帰が見逃されたことを報告している。北原ら²¹⁾は「黒毛和種」牛で授精後17日から24日までCIDRを留置した場合でもCIDR除去後7日以内の発情発見率は70%としており、30%程度の牛でCIDR除去後の発情が不明瞭であったと考えられる。今回の試験でも、CIDR20日間区では初回授精不受胎の6頭全てを発情誘起したので

Day35に再授精を実施できたが、従来法であるCIDR14日間区では初回授精不受胎の2頭には発情誘起せず、発情を発見した時点での授精実施としたため1頭はDay43まで明確な発情を発見できずCIDR抜去直後の発情が見逃されたものと推察され、CIDR抜去後数日間の発情観察においても発情が見逃される可能性があることが示唆された。近年、乳牛の発情徴候の微弱化³⁾や牛群の大規模化による発情観察に要する労力の増大と発情発見率低下⁷⁾が問題となっているが、今回の手法のように定時人工授精と組み合わせることで、発情観察の労力をかけることなく、確実に再授精を行うことができ、かつ再授精の受胎率も問題がないことが確認された。

2 超音波画像診断装置による黄体画像の解析

超音波画像診断装置により撮影、測定した黄体断面積、輝度値とも、CIDR20日間区の受胎牛及びCIDR14日間区的不受胎牛頭数が少なかつたため、両試験区間の比較は困難であり傾向の違いは見出せなかつた。

黄体断面積について、両試験区に共通して、受胎牛

においては黄体断面積がDay25以降3cm²以上となった。不受胎牛においてはDay25までに2cm²未満に縮小したが、黄体断面積が減少に転じた時期は、Day16以前からDay22まで開きがあつた。

また黄体画像の輝度値は、受胎牛における妊娠黄体と不受胎牛における黄体で輝度値の推移に違いが見られた。すなわちDay5における輝度値を100として比較したところ、受胎牛では試験期間中80以上130未満を維持し比較的安定した値をとつたが、不受胎牛ではDay19までに80未満となる一過性の低下や、Day19~22に140以上となる急激な上昇など大きな変動がみられた(図3、図4)。黄体画像の輝度値は黄体の血流量や黄体細胞の充実度を反映して、妊娠黄体で最も低く、機能性黄体、退行期黄体の順に高くなること¹⁸⁾が報告されている。また、今回の試験の不受胎牛で黄体の輝度値が低下する牛がみられたのは、黄体退行直前に一過性に血流が増加する^{21, 22)}現象によるもので、その後黄体が退行するにつれ輝度値も上昇したものと考えられる。黄体の血流量を測定することは黄体機能評価法として有用である²³⁾が、非常に高価

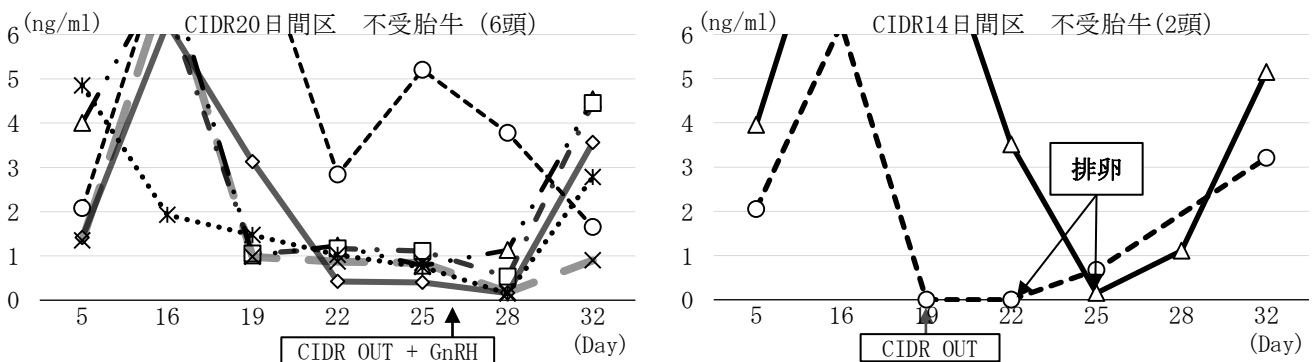


図2 不受胎牛の血清中プロゲステロン濃度の推移

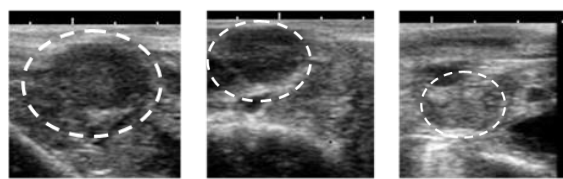


図3 超音波画像診断装置により撮影した黄体画像(点線円内が黄体)CIDR20日間区 不受胎牛

- 左 : Day5 断面積 2.8 cm² 輝度値 55(=100 とする)
- 中央 : Day16 断面積 2.1 cm² 輝度値/Day5 86
- 右 : Day22 断面積 0.8 cm² 輝度値/Day5 189

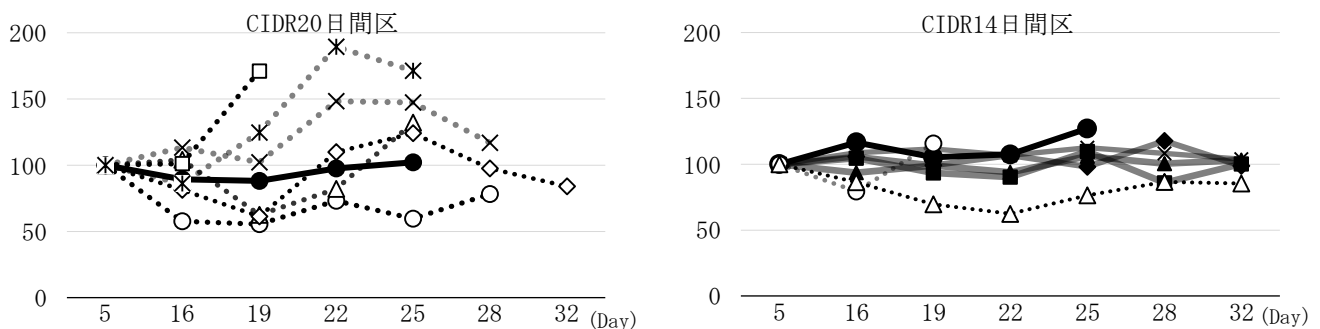


図4 超音波画像診断装置による黄体画像の輝度値の推移

Day5における計測値を100とした。実線：受胎牛(20日間区1頭、14日間区5頭)、点線：不受胎牛(同6頭、2頭)

なカラードプラ機能搭載の超音波画像診断装置が必要である。今回の試験ではカラードプラ機能を有しない超音波画像診断装置を使用し、黄体画像の輝度値を測定することで黄体機能を推定できることが示唆された。これにより授精後19日前後の輝度値が授精後5日頃と比較して大きく低下もしくは上昇している場合は不受胎の可能性がある、より早期に不受胎牛を推定する際の判断材料の一つになり、今後空胎期間を短縮させる技術の開発に寄与する可能性があると考えられる。

以上のことからP4補充効果の延長による受胎促進、妊娠維持作用を期待して、CIDR留置期間を従来法より長い20日間とした本手法により、今回の試験で受胎率の向上は認められなかったが、早期妊娠鑑定と発情誘起、定時授精を組み合わせることで、確実な再授精実施、発情観察の省力化が見込まれた。

超音波画像における黄体輝度値の推移は、妊娠牛において比較的変動が少なく、非妊娠牛においては授精後19日前後で大きく上昇あるいは低下することから、早期の妊否推定の判断材料になりうることが示唆された。しかしながら個体により傾向にばらつきがあり、今後さらなる検討が必要である。

引用文献

1. 松井基純. 受胎率向上を目指したホルモン剤によるウシ子宮機能制御. 家畜感染症学会誌. 1(3), 85-90(2012)
2. 高橋透. 繁殖研究の新展開. LIAJ News. 147, 2-5(2014)
3. 平子誠, 高橋ひとみ, 榎弓史郎. 乳牛の繁殖生産低下の現状と子宮環境. 日本家畜臨床感染症研究会誌. 6(3), 123-130(2011)
4. 小山毅. 超音波画像診断による牛の子宮修復評価の試み. 北海道重医師会雑誌. 56, 10-15(2012)
5. 中尾敏彦, 津曲茂久, 片桐成二編. 獣医繁殖学第4版. 文永堂出版株式会社. 東京. P313-317(2012)
6. 片桐成二. 乳牛における胚死滅 - 発生状況とその背景. MPアグロジャーナル. 6, 5-8(2011)
7. 大澤健司. 牛の排卵同期化・定時人工授精プログラムの現状と最近の進歩. 日獣会誌. 65, 673-681(2012)
8. Stronge, A. J. H., Sreenan, J. M., Diskin, M. G., Mee, J. F., Kenny D. A. and Morris, D. G. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*. 64(5), 1212-1224(2005)
9. Mann, G. E., Fray, M. D. and Lamming, G. E. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in the cow. *Vet J*. 171(3), 500-503(2006)
10. McNeill, R. E., Diskin, M. G., Sreenan, J. M. and Morris, D.G. *Theriogenology*. 65(7), 1435-41(2006)
11. 秋田真司. ホルスタイン種における後期胚死滅の発生状況とプロゲステロン製剤による防止効果. 広島県獣医学会雑誌. 26, 7-10(2011)
12. 川手憲俊. ウシの人工授精後の黄体機能増強処置および黄体ホルモン投与の受胎に及ぼす効果. 家畜診療. 65(8), 511-518(2018)
13. Garcia-Ispuerto, I. and López-Gatius. F. Progesterone supplementation in the early luteal phase after artificial insemination improves conception rates in high-producing dairy cows. *Theriogenology*. 90(1), 20-24(2017)
14. Garcia-Ispuerto, I., López-Helguera, I., Serrano-Pérez, B., Paso, V., Tuono, T., Ramon, A., Mur-Navales, R., Tutusaus, J. and López-Gatius, F. Progesterone supplementation during the time of pregnancy recognition after artificial insemination improves conception rates in high-producing dairy cows. *Theriogenology*. 85(7), 1343-1347(2016)
15. Stevenson, J. S., Portaluppi, M. A., Tenhouse, D. E., Lloyd, A., Eborn, D. R., Kacuba, S. and DeJarnette, J. M. Interventions after artificial insemination: Conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. *J Dairy Sci*. 90(1), 331-340(2007)
16. Monteiro, P. L. Jr., Nascimento, A. B., Pontes, G. C. S., Fernandes, G. O., Melo, L. F., Wiltbank M. C. and Sartori, R. Progesterone supplementation after ovulation: Effects on corpus luteum function and on fertility of dairy cows subjected to AI or ET. *Theriogenology*. 84(7), 1215-1224(2015)
17. Parr, M. H., Crowe, M. A., Lonergan, P., Evans, A. C. O., Rizos, D. and Diskin, M. G. Effect of exogenous progesterone supplementation in the early luteal phase post-insemination on pregnancy per artificial insemination in Holstein-Friesian cows. *Anim Reprod Sci*. 150, 7-14(2014)
18. 酒井亮, 前田陽平, 木下啓三, 河野俊朗, 山形光正, 石川生夫, 岡本誠. 乳用牛における超音波画像診断装置を用いたエコーレベル差による黄体評価の検討. 広島県獣医学会雑誌. 26, 23-26(2011)
19. 高橋透. 「授精後23日で不受胎を確定して翌日に定時再授精を実施する牛の繁殖プログラムの開発」の研究に関する報告書. 平成30年度畜産生産に関する研究調査成果報告書. 一般財団法人畜産ニューテック協会. 東京. p.75-83(2019)
20. 北原豪, 日高亨介, 鈴木義人, 峯雄太, 加治佐誠, 小林郁雄, 上村俊一. 定時人工授精後のプロゲステロン製剤留置が黒毛和種牛の繁殖成績に及ぼす影響. 日獣会誌. 64, 870-873(2011)
21. 松井基純. 超音波カラードプラ法. 畜産技術. 749, 54-56(2017)
22. 金澤朋美. ウシの繁殖領域における超音波ドプラ法の活用. 産業動物臨床医学雑誌. 6(2), 101-102(2015)
23. 金澤朋美. 乳牛の黄体血流量に基づく新規受胎牛選定法と超早期妊娠診断法に関する研究. 岐阜大学大学院連合獣医学研究科博士学位論文. 甲第485号(2017)