

泌乳牛における授精日の卵胞長径および授精後 7 日目の 黄体長径が受胎に及ぼす影響

壁谷 早苗・小山 久一・堂地 修 (酪農学園大学大学院酪農学研究科)

はじめに

今日、乳牛において泌乳量が増加する一方で、繁殖成績の低下が世界的な問題となっている (21)。北海道における人工授精の初回受胎率は、過去 20 年の間に 59.2% (1989 年) から 47.4% (2007 年) へと著しく低下し (30)、また農林水産省調べによると全国における過去 10 年間の受精卵移植の受胎率は、新鮮胚が 50%、凍結胚が 40~45% で推移し伸び悩んでいる (10、14)。繁殖成績低下の理由として現代の乳牛は泌乳量に見合うエネルギーが摂取できず、負のエネルギーバランス状態になっていること (5)、またその状態が長引く牛が多くなっていること (21) が要因の一つとして挙げられる。高泌乳牛の慢性的な栄養不足は卵胞発育および機能的黄体の形成に影響し (3、6、21、28、33)、卵胞および黄体の大きさにも関係していると考えられる (4、8)。

人工授精で高い受胎率を得るためには卵胞の成熟と高い受精能力を有する卵子の排卵が重要である。卵胞の成熟・排卵には原始卵胞の発育開始から 60~80 日間を要し (5)、この間の卵胞発育は栄養状態の影響を受ける (29、33)。もし卵胞の発育初期に負のエネルギーバランスにあるとインシュリン様成長因子 (以下、IGF-I) が不足し、卵胞の発育・成熟、卵子の受精能低下、黄体機能の低下および受胎率の低下につながる可能性がある (5、24)。卵胞の発育低下はエストロジェンの合成低下につながり、卵胞成熟に時間を必要とし、結果的に大きな卵胞を形成する (21)。さらに排卵遅延や無排卵につながる可能性もある (33)。大きく成長しすぎた卵胞は高い濃度の黄体形成ホルモン (以下、LH) に感作され、排卵前にすでに卵子が老化しているため受胎率は低下する (21)。

受精卵移植においては移植前に機能的黄体が形成されていることが重要である (9、20) が、黄体のサイズは過去 50 年で小さくなっているという報告もある (21)。その理由として黄体形成に必要な LH や LH の合成を刺激する IGF-I の合成 (24) が負のエネルギーバランスの影響を受けて低下しているためであると考えられる (4、5)。そのため、高泌乳牛のほとんどが分娩後に負のエネルギーバランスになるため (32)、より高い受胎率を得るためには移植前に黄体を検査して受卵牛を選抜する必要がある (2、14、15、20、31)。プロゲステロン濃度は黄体の大きさに比例するとする報告 (4) があり、受卵牛が移植可能かどうか黄体の大きさによって判定する方法が用いられている (13、14、19、25)。他方で黄体の大きさとプロゲステロン濃度との間には関係が認められないとする報告 (8、21、26、33) もあり、黄体の大きさと受胎の明確な関係は明らかではない。

本試験では、ホルスタイン種経産牛の授精日の卵胞と授精後 7 日目の黄体の最大長径 (以下、長径) と受胎の関係を調べることを目的とした。また、卵胞および黄体の発育には栄養が関連していることから、ボディコンディションスコア (以下、BCS) を測定して乾乳期から受胎日までの BCS の低下と授精日の乳量が卵胞発育および黄体形成に及ぼす影響を調べた。

材料および方法

1) 供試牛と人工授精

供試牛は自動搾乳システム牛舎で飼養されている排卵を確認したホルスタイン経産牛延べ 88 頭である。供試牛の右前肢には万歩計 (コムテック社製) を装着し、1 時間毎に計測される歩行数が非発情時の 1.6 倍以上に上昇した時の開始時刻を発情開始とし、発情開始後 7~22 時間の間に AI を実施した (平均実施時間: 発情開始後より 12.6±4.9 時間)。

2) 卵胞および黄体の長径計測と妊娠鑑定

卵胞および黄体の長径は 7.5 MHz の I 型プローブを接続した超音波画像診断装置（本多電子 HS-2000）を用いて、授精日の卵胞、授精後 7 日目の黄体の長径をそれぞれ計測した。また、受胎の確認も超音波画像診断装置を用いて、授精後 30、40、50 および 60 日目に行った。

卵胞および黄体の長径計測は直腸内に挿入したプローブを直腸検査の要領で操作し、モニター上で最大長径像が得られた時に画像を固定し、内臓キャリパー機能を用いて測定した。

3) BCS および乳量

BCS は Ferguson ら (12) に準じて、分娩 8 週前から受胎日まで 1 週間毎に計測した。BCS は、寛骨の側望を観察し、V 型を 3.0 以下、U 型を 3.25 以上に分類した。さらに腰骨と坐骨を観察し、それぞれの脂肪の付着によって 0.25 刻みで 1～5 の範囲で測定した。乳量は授精実施月の平均日乳量を計測した。

4) 統計処理

卵胞、黄体の長径、乳量および BCS は t-検定、受胎率はフィッシャーの直接確立法を用いて行った。

結 果

本試験において授精日の卵胞長径は、受胎牛、不受胎牛ともに 2.0 ± 0.4 cm（表 1）で、卵胞長径の範囲は受胎牛が 1.4～2.5 cm で、不受胎牛が 1.0～2.8 cm であった。授精日の卵胞長径の違いが受胎率に及ぼす影響はみられなかった（表 2）。ただし、1.3 cm 以下（3 頭）と 2.6 cm 以上（2 頭）の牛はいずれも不受胎であった。また、複数排卵は全体で 10.2%（9/88）で受胎牛では 10.3%（3/29）、不受胎牛では 10.2%（6/59）であった。排卵遅延は不受胎牛で 5.1%（3/59）であり、受胎牛ではみられなかった。なお、無排卵牛はいなかった。

表 1. 泌乳牛における受胎牛と不受胎牛の卵胞、黄体長径および乳量の平均値

項目	頭数(頭)	授精日の 卵胞長径(cm)	授精後 7 日目の 黄体長径(cm)	乳量(kg/日)
受胎牛	29	$2.0 \pm 0.4^*$	2.9 ± 0.5	37.0 ± 7.8
不受胎牛	59	2.0 ± 0.4	2.8 ± 0.6	40.2 ± 7.3

* 平均値 ± 標準偏差

表 2. 泌乳牛における授精日の卵胞長径の違いが受胎率に及ぼす影響

項目	卵胞長径 (cm)			
	<1.7	1.7～2.0	2.1～2.4	2.4<
受胎牛(頭)	7	7	12	2
不受胎牛(頭)	14	21	18	6
受胎率(%)	33.3	25.0	40.0	25.0

表 3. 泌乳牛における授精後 7 日目の黄体長径の違いが受胎率に及ぼす影響

項目	黄体長径 (cm)			
	<2.5	2.5～2.9	3.0～3.5	3.5<
受胎牛(頭)	7	7	11	2
不受胎牛(頭)	17	20	16	5
受胎率(%)	29.2	30.0	40.0	28.6

表 4. 泌乳牛における授精日の BCS 別頭数

項目	全体	平均値±標準偏差	BCS				
			2.25	2.5	3.0	3.25	3.5
受胎牛(頭)	14	2.8±0.2 ^a	0	2	10	1	1
不受胎牛(頭)	42	2.7±0.2 ^b	4	10	26	2	0

a、b の符号間に有意差あり (p<0.05)

表 5. 泌乳牛における分娩 1 ヶ月前から授精日の BCS 低下の値別頭数*

項目	全体	BCS 減少値				低下の平均値**
		0.25	0.5	0.75	1.0	
受胎牛(頭)	14	6	7	0	1	0.4±0.2
不受胎牛(頭)	42	13	19	7	3	0.5±0.2

*分娩 1 ヶ月前の BCS 値から授精日の BCS を引いたもの (分娩 1 ヶ月前の BCS>授精日の BCS)

**受胎牛および不受胎牛の減少値の平均値±標準偏差

授精後 7 日目の黄体長径は、受胎牛で 2.9±0.5 cm、不受胎牛で 2.8±0.6 cm であり (表 1)、黄体長径は受胎牛で 2.0~3.9 cm で、不受胎牛は 1.3~4.3 cm であった。授精後 7 日目の黄体長径に及ぼす影響はみられなかった (表 3)。ただし、1.9 cm 以下 (2 頭) と 4.0 cm 以上 (3 頭) の牛はいずれも不受胎であった。

分娩 1 ヶ月前 (以下、乾乳期) の BCS は受胎牛、不受胎牛ともに 3.2±0.2 であった。また、授精日の BCS は不受胎牛 (2.7±0.2) が受胎牛 (2.8±0.2) に比べて有意に低かった (p<0.05) (表 4)。全頭で乾乳期に比べ授精日で BCS が低く、特に、不受胎牛では BCS が大きく低下している個体がみられた (表 5)。人工授精を実施した月の月間平均日乳量は受胎牛 (37.0±7.8 kg) に比べ不受胎牛 (40.2±7.3 kg) が多かった (表 1)。

考 察

一般にホルスタイン経産牛の排卵直前の卵胞の大きさは 1.4~1.7 cm とされ (1、16、28)、本試験の授精日における卵胞長径は、受胎牛、不受胎牛どちらも 2.0±0.4 cm であり、Cavalieri (7) および Chase ら (8) の報告と同様に卵胞長径の大きさの違いによる受胎率の差は認められなかった。ただし、平均的な大きさから外れる大きさの卵胞を持つ牛の受胎率は極端に低く、1.3 cm 以下 (3 頭) と 2.6 cm 以上 (2 頭) の牛はいずれも不受胎であった。高泌乳牛で平均値から大きく外れる大きさの卵胞が形成されるのは以下の理由によると考えられる。小型卵胞が形成される原因は、エストロジェン分泌の低下により卵胞発育に必要な FSH が抑制される (4、5、16、18、21)。そして、卵胞の完熟、排卵も抑制 (24、25) されることによって起こると考えられる。このようなエストロジェンおよび FSH の低下は、負のエネルギーバランスによっても起こる (16)。また、卵胞の過大や排卵遅延は黄体期の延長により主席卵胞の発育遅延が起きているためと考えられる (21、22、29)。この黄体期の延長は負のエネルギーバランスにより、高い LH パルスの感作を受け、発情から LH ピークまでの間隔が延長すること (22) により誘起される。本試験における複数排卵は全体で、10.2% (9/88) で受胎牛では 10.3% (3/29)、不受胎牛では 10.2% (6/59) であった。なお、Kirby (17) や Sartori (27) らは 20~25% の泌乳牛が発情周期中に複数排卵していると報告している。排卵遅延は不受胎牛で 5.1% (3/59) であり、受胎牛ではみられなかった。

一般にホルスタイン経産牛の発情後 7 日目の機能的黄体の長径は 1.9~2.8 cm とされ (9、23、32)、本試験では受胎牛 (2.9±0.5 cm) と不受胎牛 (2.8±0.6 cm) の間に大きな差はなかった。Donaldson (11) や久利生ら (20) は黄体長径の大きさの違いによる受精卵移植後の受胎率の差は認められなかったと報告しており、本試験でも彼らの報告を支持する結果が得られた。ただし、卵胞の場合と同様に平均的な大きさから外れる大きさの黄

体を持つ牛の受胎率は極端に低く、1.9 cm 以下 (2 頭) と 4.0 cm 以上 (3 頭) の牛はいずれも不受胎であった。高泌乳牛の黄体は過去 50 年間で小さくなってきており、プロゲステロン濃度も低下しているといわれている (21)。卵胞からのエストロゲンおよび黄体からのプロゲステロンの分泌は視床下部-下垂体-性腺で調節されているが、泌乳にともなう採食量の増加と血流量の増加によりホルモンの不活化が起きていることが末梢血中のホルモン値の低下に関係し、不受胎の原因となっている (21、28)。

本試験では、全頭が乾乳期に比べ授精日の BCS が低くなっていた。特に、授精時の BCS は受胎牛に比べて不受胎牛が有意に低かった ($P < 0.05$)。BCS はエネルギー充足を推定することができ、BCS の低い牛はエネルギーバランスが負に傾いていることを指している (12)。BCS の低下は卵胞の大きさや排卵に影響し (6、33)、卵胞や黄体からのエストロゲン、プロゲステロン分泌に影響するため受胎に大きく影響すると報告されている (21)。本試験でも BCS の低下が受胎に影響することが示されたが、BCS の低下および乳量と卵胞および黄体の大きさの間には相互関係は見出せなかった。BCS の低い牛では、黄体の大きさが 2.0 cm 以上と正常であってもプロゲステロン濃度は低く (5、8)、黄体の大きさとプロゲステロン値の間に一定の関係のないことが多くのグループによって報告されている (8、14、20、21、26、32)。また、不受胎牛は受胎牛に比べ泌乳量が多く、不受胎牛は負のエネルギーバランス状態にあるものが多いと考えられた。このようなことから、さらに詳しく栄養と卵巣機能について検討する必要がある。

以上より、乾乳期から授精日までの BCS 低下は受胎に影響することが認められ、BCS 低下および乳量は卵胞発育と黄体形成にも影響すると考えられた。また、授精日の卵胞長径および授精後 7 日目の黄体長径は、極端に小さいもしくは大きいものは、受胎に悪影響を与える可能性があると考えられた。

要 約

本研究では、授精日卵胞長径と授精後 7 日目黄体長径と受胎の関係および BCS の低下と乳量と受胎の関係を調べた。供試牛は排卵を確認したホルスタイン経産牛延べ 88 頭である。黄体および卵胞の最大長径 (長径) は超音波画像診断装置を用いて測定した。ボディコンディションスコア (以下、BCS) は乾乳期から受胎日まで毎週 1 回実施した。乳量は、人工授精実施月の平均日乳量を計測した。授精日の卵胞長径は、受胎牛、不受胎牛ともに 2.0 ± 0.4 cm、授精日の卵胞長径の違いが受胎に及ぼす影響はみられなかった。しかし、1.3 cm 以下と 2.6 cm 以上の牛はいずれも不受胎であった。また、授精後 7 日目の黄体長径は、受胎牛で 2.9 ± 0.5 cm、不受胎牛で 2.8 ± 0.6 cm で、授精後 7 日目の黄体長径に及ぼす影響は認められなかった。しかし、1.9 cm 以下と 4.0 cm 以上の牛はいずれも不受胎であった。授精日の BCS は不受胎牛が受胎牛に比べ有意に低かった ($p < 0.05$)。以上より、乾乳期から授精日までの BCS 低下は受胎に影響することが認められた。また、授精日の卵胞長径および授精後 7 日目の黄体長径は、極端に小さいもしくは大きいものは、受胎に悪影響を与える可能性があると考えられ、さらに詳しく栄養と卵巣機能について検討する必要がある。

引用文献

- 1) Adams, G. P. 2005. The use of ultrasonography in bovine practice. American association of bovine practitioners, Salt Lake City. 121-135.
- 2) 青木秀邦. 2004. 乳汁中のプロゲステロン濃度を指標とした受胎牛の選抜検討. 繁殖技術. 24:49-50.
- 3) Beam, S. W. and Butler, W. R. 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three of dietary fat. Biolo. Reprod. 56: 133-142.
- 4) Bossis, I., Wettemann, R. P., Welty, S. D., Vizcarra, J. A., Spicer, L. J. and Diskin, M. G. 1999. Nutritionally induced anovulation in beef heifer: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. J. Anim. Sci. 77: 1536-1546.
- 5) Britt, J. H. 1992. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. The bovine proceedings. 24: 39-43.
- 6) Buttler, W. R. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. Anim.

Reprod. Sci. 60-61: 449-457.

- 7) Cavalieri, J., Hepworth, G., and Macmillan, K. L. 2004. Ovarian follicular development in Holstein cows following synchronisation of oestrus with oestradiol benzoate and an intravaginal progesterone releasing insert for 5-9 days and duration of the oestrous cycle and concentrations of progesterone following ovulation. *Anim Reprod Sci.* 81: 711-193.
- 8) Chase, C. C. Jr., Kirby, C. J., Hammond, A. C., Olson, T. A. and Lucy, M. C. 1998. Patterns of ovarian growth and development in cattle with growth hormone receptor deficiency. *J. Anim. Sci.* 76: 212-219.
- 9) 堂地 修、高倉宏輔、今井 敬. 1991. 受胎牛の選抜方法としての超音波断層の利用と血中プロジェステロンの測定. 福島県獣医畜産総合研究会誌. 19-21.
- 10) 堂地 修. 2000. 胚移植における受胎率向上. 繁殖技術. 20:36-39.
- 11) Donaldson, L. E. 1985. Matching of embryo stages and grades with recipient oestrous synchrony in bovine embryo transfer. *Vet. Rec.* 117: 489-491.
- 12) Ferguson, J. D., Galligan, D. T and Thomsen, N. 1994. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J. Dairy. Sci.* 77: 2695-2703.
- 13) Fricke, P. M. 2002. Scanning the future - Ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 85: 1918-1926.
- 14) 福田美保、澤村 健、福田徳彦、新居 徹. 2004. 乳牛の授精後 7 日目の黄体の長径と乳汁中の Progesterone 値および受胎の関係. 繁殖技術 23:21-52.
- 15) 星野洋平、潮 大輔、小田島雅信、佐々木尚洋、佐藤省三、佐藤健志、長瀬 舞、平井俊哉、奥村晃人、瀬野 翼. 2007. 発情別による受胎牛の選抜方法. 繁殖技術. 26:57-58.
- 16) 金子浩之、野口純子、菊池和弘、轟木淳一. 2001. ウシの卵胞発育に対する内分泌調節. *J. Reprod. Dev.* 47 (Suppl.):j 11-j 18.
- 17) Kirby, D. H., Michael, F. S, Keisler, D. H. and Luc, M. C. 1997. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. *J. Dairy. Sci.* 80: 273-285.
- 18) 木之下昭弘、上村俊一、今村英晃、木久津昌治、吉田光敏、中西喜彦. 2001. 乳牛における栄養充足率の違いが卵胞の発育動態に及ぼす影響. *J. Anim. Sci.* 72:j 20-j 27.
- 19) 北 満夫、大橋愛美、田中孝一、金田信春、松田達彦、町井倉生、畑中 昭. 2005. 移植前の黄体検査による受はい牛の選定. 石川県畜産総合センター研究報告. 37:14-16.
- 20) 久利生正邦、堂地 修、宮田幸路、下平乙夫. 1992. 受胎牛の黄体形状と血中プロジェステロン値. 繁殖技術会誌. 14:181-184.
- 21) Lucy, M. C. 2001. Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End?. *J. Dairy. Sci.* 84: 1277-1293.
- 22) Mapletoft, R. J. 2005. Fertility and reproductive management in high producing dairy cows.北海道アルパータ酪農科学技術交流協会. 海外農業技術セミナー. p 3-22.
- 23) McDougall, S. and Rhodes, F. M. 1999. Detection of a corpus luteum in apparently anoestrous cows by manual palpation, transrectal ultrasonography and plasma progesterone concentration. *New Zealand Veterinary Journal.* 47: 47-52.
- 24) 森 純一. 1997. 家畜繁殖研究の最近の進展. 獣医界. 140:1-49.
- 25) 奥田 潔、上野山賀久、作本亮介. 1997. 妊娠成立のための卵巣機能とその調節. *J. Reprod. Dev.* 43: j 65-j 73.
- 26) 奥村晃人、潮 大輔、桜井 拓、深見 亮、中洞 要、中原 健一、佐藤省三、氏平健太郎、能登康幸、中畑孝徳、瀬野 翼. 2006. 胚移植実施にともなう受胎牛の選定方法. 繁殖技術. 26:34-35.
- 27) Sangsritavong, S., Combs, D. K., Sartori, R., Armentano, L. and Wiltbank, M. C. 2002. High feed

- intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and 17β estradiol in dairy cows. J. Dairy. Sci. 85: 2831-2842.
- 28) Sartori, R., Haughuan., Rosa, G. J. M., Shaver, R. D. and Wiltbank., M. C. 2000. Differences between lactating cows and nulliparous heifers in follicular dynamics, luteal growth, and serum steroid concentrations. J. Anim. Sci. 78 (Suppl.): 212. (Abstr.).
- 29) Stock, A. E. and Fortune, J. E. 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. Endocrinology. 132: 1108-1114.
- 30) 社団法人 北海道家畜人工授精師協会. 平成 19 年度北海道乳、肉用牛人工授精、受精卵移植実施成績.
- 31) 田中芳実. 1994. 牛胚移植における黄体形状と凍結胚の取扱いが受胎におよぼす影響. 日本胚移植研究会誌. 1:18-23.
- 32) Wathes, D. C., Fenwick, M., Cheng, Z., Bourne, N., Llewellyn, S., Morris, D. G., Kenny, D., Murphy, J and Fitzpatrick, R. 2007. Influence of negative energy balance on cyclist and fertility in the high producing dairy cow. Theriogenology. 68 S: 232-241.
- 33) Taylor, C. and Rajamahendran, R. 1991. Follicular dynamics and corpus luteum Growth and function in pregnant versus nonpregnant dairy cows. J. Dairy Sci. 74: 115-123.