

## 乳牛の分娩後早期におけるエストラジオール処置による 卵巣機能回復促進効果

山口佳男<sup>1)†</sup> 下田 崇<sup>2)</sup> 白砂孔明<sup>3)</sup> 川島千帆<sup>4)</sup> 宮本明夫<sup>3)</sup>

- 1) 十勝NOSAI南部診療センター (〒089-2106 広尾郡大樹町下大樹180-1)
- 2) 十勝NOSAI浦幌家畜診療所 (〒089-5615 十勝郡浦幌町新町15)
- 3) 帯広畜産大学大学院 畜産衛生学専攻 (〒080-8555 帯広市稲田町西2線11)
- 4) 帯広畜産大学フィールド科学センター (〒080-8555 帯広市稲田町西2線11)

(2010年12月10日受付・2011年6月10日受理)

### 要 約

分娩後最初に出現する主席卵胞が成熟する時期である分娩後14～18日に安息香酸エストラジオール (EB) 6mgを投与し、分娩後早期の卵巣機能回復及びその後の繁殖性の改善について検証した。正常分娩したホルスタイン種成熟雌牛314頭を無作為に2群に分け、試験区164頭にEB 6mgを筋肉内注射で投与し、対照区150頭は無処置とした。これらの一部について、直検及び血中プロゲステロン濃度を測定した結果、EB投与2日後に排卵し7日後に黄体化したものは86.0%であり、対照区の38.9%より有意に高率であった。さらに、分娩後60日以内の授精率は試験区で68.9%と、対照区の47.3%より高かった。初回授精受胎率は試験区51.9%、対照区43.8%だった。また100日以内の受胎率は試験区50.3%、対照区45.9%で受胎率には有意な差はなかった。しかし、100日以上無発情の牛は試験区で11.9%で、対照区の24.3%より有意に低減された。以上から、分娩後早期のEB投与による卵巣機能の回復促進及び無発情牛の低減効果が示された。——キーワード：エストラジオール、卵巣機能、排卵、受胎。

----- 日獣会誌 64, 865～869 (2011)

近年、乳牛における繁殖効率は泌乳量の増加と反比例し低下傾向が著しい。世界的にも高泌乳牛の繁殖成績は低下し、Butler [1]によれば、2000年までのアメリカ(ニューヨーク州)におけるAI成績は未経産牛初回授精受胎率が65%であるのに対し、経産牛では20～40%である。また、カナダ(ケベック州)の2007年の経産牛の初回授精受胎率は37%、2007年のアメリカでは40%と低い。さらに、2004年「世界牛病学会」で報告された北米以外の各国の経産牛初回受胎率は、イギリスで年率1%ずつの低下、オランダでは10年に10%低下、フランスでは10年に15%の低下が報告されている。北海道十勝地域においても同様の傾向にあり、かつて50%前後であった経産乳牛の初回授精受胎率は、現在39%前後に低下している。以上のことを反映して、「平成20年度と21年度の日本獣医師会年次学会」においても2年続けて「世界的な乳牛繁殖効率低下の原因と対策

に関する国際シンポジウム」が開催されている。

この問題に対して、家畜栄養学・泌乳生理学・家畜管理理学・家畜繁殖学分野などの各方面からのアプローチ・対策が提示されているが、臨床獣医療分野の視点からみると、受胎率低下の大きな要因の一つに、酪農現場における発情発見の困難さが増していることがあげられる。

Kawashimaら [2, 3]は分娩後3週間以内に最初の主席卵胞が排卵した牛では初回授精受胎率が高く、空胎日数が短くなることを示していて、分娩後早期に最初に出現した主席卵胞が排卵した場合、その後の繁殖成績の向上に繋がると述べている。主席卵胞が排卵するには、まずエネルギー状態を反映して肝臓から分泌される血中インスリン様成長因子(IGF)-1濃度がある程度の高値を維持し、それにより成熟卵胞からのエストロゲン分泌が増加し、視床下部にフィードバックしてGnRHパルスを誘起し、最終的にLHサージが起こり排卵すると考え

† 連絡責任者：山口佳男 (十勝NOSAI南部診療センター)

〒089-2106 広尾郡大樹町下大樹180-1 ☎・FAX 0155-67-2416 E-mail: madoka@za2.so-net.ne.jp

表1 EB投与後の臨床検査

	投与时		投与7日後	
	対照区	試験区	対照区	試験区
GOT (IU/l)	108.5 ± 4.7	104.8 ± 4.6	100.6 ± 4.4	108.5 ± 4.7
NEFA (mEq/l)	0.59 ± 0.02	0.53 ± 0.06	0.49 ± 0.05	0.42 ± 0.04
乳ケトン+以上 (%)	37	70	62	50
BCS	2.88 ± 0.07	3.02 ± 0.09	2.87 ± 0.05	3.00 ± 0.02

(平均値 ± 標準偏差)

表2 EB投与後の血中IGF-1濃度の変化

	投与时	2日後	7日後
対照区 n=12	48.4 ± 6.3	43.8 ± 3.0 (n=10)	41.8 ± 4.5
試験区 n=50	55.1 ± 3.3	55.2 ± 2.3 (n=10)	53.1 ± 3.1

(平均値 ± 標準偏差 単位: ng/ml)

られている [4, 5]. 実際に, Kawashimaら [3] の観察実験では, 分娩後最初に出現した主席卵胞が排卵しなかった牛では血中IGF-1及びエストラジオール濃度が低かった. 一方, Simpsonら [6] はエストロジェンを卵巣除去した雌の肉牛に投与すると血中IGF-1濃度が増加することを報告している.

そこで今回, われわれは乳牛において, 分娩後最初の主席卵胞が成熟する時期である分娩後15日頃にエストラジオールを投与し, 血中IGF-1濃度とともに排卵の有無を直腸検査並びに血中プロジェステロン (P<sub>4</sub>) 濃度から推定した. あわせて分娩後60日以内の初回授精率, 受胎率, 100日以内の受胎率及び100日以上無発情を示す牛の割合を調査し, 繁殖に及ぼす影響と繁殖管理の労力軽減が図れるかを検証した.

材料及び方法

**供試牛:** 北海道十勝管内の3酪農場の2008年11月末から12月末までの間, 及び2009年3月末から6月末までに正常分娩したホルスタイン種雌牛314頭を使用した.

**試験区の設定と試験方法:** 供試牛を無作為に2群に分け試験区・対照区とした. 試験区164頭には分娩後14~18日に安息香酸エストラジオール (EB) (エストラジオール注「KMK」, 川崎三鷹製薬株, 東京) 3ml (6mg) を筋肉内注射により1回投与した. 対照区150頭は無処置とした.

**検査・調査項目:** 試験区43頭と対照区18頭について, EB注射前, 2日後及び7日後に直腸検査により子

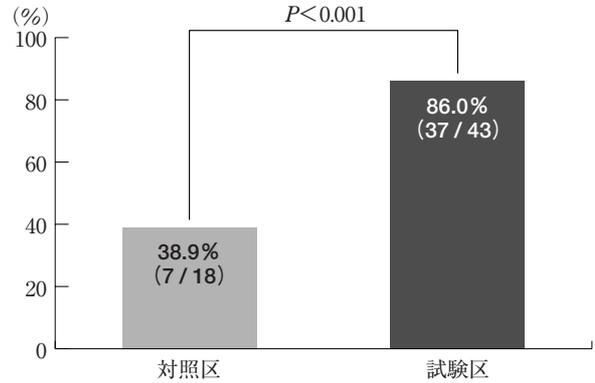


図1 EB投与後の分娩後最初の主席卵胞の排卵割合

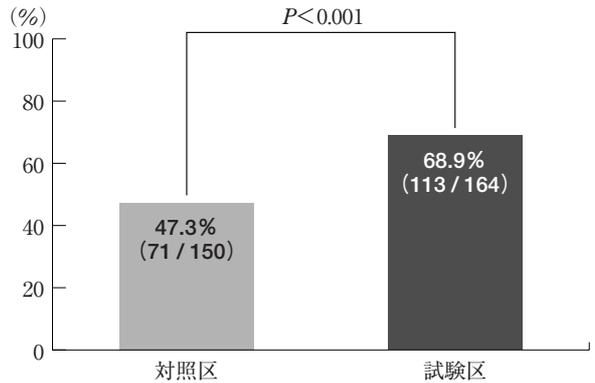


図2 EB投与後の分娩後60日以内の授精率

宮回復と卵巣の主席卵胞・排卵・黄体の有無を確認した.

**ホルモン濃度測定:** 試験区50頭と対照区12頭について, EB注射前, 2日後, 7日後に採血し, P<sub>4</sub>及びIGF-1濃度を2抗体法EIA [3, 7] により測定した.

肝臓機能の状態を確認するために, 試験区10頭と対照区8頭について, EB注射前, 2日後, 7日後に採血しGOTとNEFAを測定した. また, 糖新生・インシュリン抵抗性・肝臓機能の状態を確認するため, 乳汁中ケトン体をサンケトペーパーで目視比色判定した. あわせて, 同日に供試牛の健康と栄養状態の一つの目安としてBCS (5段階評価) の調査を行った. 授精率などについては各農場の繁殖台帳より分娩後60日以内の初回授精率, その受胎率, 100日以内の受胎率及び100日以上経過しても無発情であった牛の割合を調査した.

統計処理はフィッシャー直接確率検定を用いた (JMP statistical soft-ware, Version 5.1; SAS Institute, Cary, U.S.A.).

成績

**臨床検査結果:** 試験区・対照区ともに, ボディコンディションスコアや乳中ケトン, GOTやNEFAの結果から負のエネルギーバランスの状態であることが考えられたが, 両区に有意な差はみられなかった (表1).

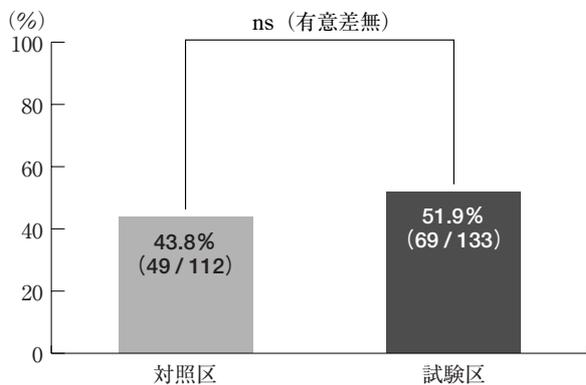


図3 EB投与後の初回授精受胎率

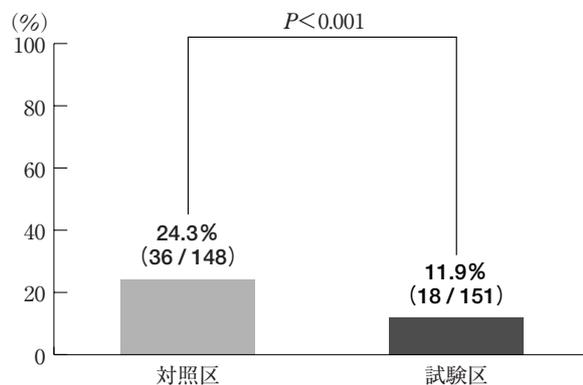


図5 EB投与後の分娩後100日以上は無発情牛

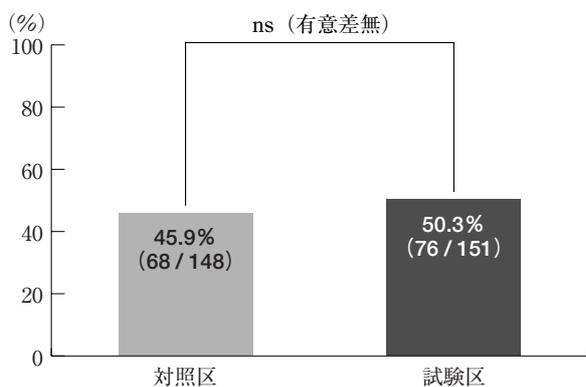


図4 EB投与後の分娩後100日以内の受胎率

## 考 察

今回供試した3農場の乳牛は平均乳量10,000kg近く(乳量検定平均)であり、肝機能などを測定した18頭の状態も総じて負のエネルギーバランスにあると推定されるものであった。しかし、このような状態を呈する牛に対しても、分娩後14～18日の間にEBを投与することにより、最初に出現する主席卵胞を86%ときわめて高い率で排卵させることができた。今回の方法では、EB投与で発情を誘起した際に授精するのではなく、排卵によって黄体形成を促し、卵巢機能回復を刺激して次の発情のタイミングを容易に予知し、授精業務を補助することが可能であると考えられる。実際にEB投与により発情徴候の発現が明確になることで、酪農家が次回発情のタイミングを把握することが容易となり、授精適期の発情発見に繋げることができたと考えられ、EB投与による繁殖性向上への有効性が伺えた。このことは今回の試験で分娩後60日以内の授精率の向上によって示されたと考えている。

Beamら[8]は分娩後20日以内に45%の乳牛が排卵することを報告していて、今回の試験においても試験区でEBを投与した86%が排卵したのに比べ対照区では39%であったことから、EB投与は排卵率の増加に効果があったと考えられる。興味深い点として、試験開始時点では両区ともに5～6mm程度の卵胞の存在が同程度で確認されたが、卵胞直径が8mmを超える一般的な前排卵胞・主席卵胞を直腸検査では認めなかった。Sartoriら[9]は、卵胞直径が10mm以上にならないと排卵は起きないと述べており、またKulickら[10]は、卵胞は8時間に0.5mmずつ発育すると報告している。これらの報告をふまえて考察すると、試験開始時に5～6mm程度の卵胞は、2日後には最大でも8～9mm程度までしか成長することができない可能性がある。しかし、EB投与2日後に主席卵胞や排卵前卵胞、あるいは排卵を認めた割合は試験区で100%に対し対照区50%であり、投与7日後のP<sub>4</sub>の値が1ng/ml以上に上昇した

**ホルモン濃度測定と直腸検査による排卵と黄体形成：**血中IGF-1濃度は試験区で53～55ng/ml、対照区で42～48ng/mlとEB投与時、2日後、7日後において大きな変化はなく、両区ともに低値で推移した(表2)。

注射時に直腸検査において明瞭な黄体や卵胞直径が8mmを超える主席卵胞の認められた個体はほとんどなかった。5～6mm程度の卵胞を触知したものは試験区53%(23/43)、対照区50%(9/18)であった。注射後2日に卵胞の出現や排卵が認められ、7日後に黄体を触知し、血中P<sub>4</sub>が1.0ng/ml以上に上昇した牛は試験区で86.0%、対照区で38.9%と試験区で有意(P<0.001)に多かった(図1)。

**授精率、受胎率、無発情率に関する調査結果：**分娩後60日以内の初回授精率は試験区68.9%、対照区47.3%と有意(P<0.001)に高かった(図2)。

初回授精受胎率は試験区51.9%に対し、対照区43.8%と有意差はなかった(図3)。また、100日以内の受胎率は試験区50.3%、対象区45.9%と有意差はなかった(図4)。

しかし、分娩後100日を過ぎても無発情の牛は試験区11.9%に対し対照区24.3%と、試験区で有意(P<0.01)に少なかった(図5)。

牛は試験区86.0%, 対照区38.9%であった。このことから、EBを投与することで5~6mm程度の中卵胞の機能を刺激したと考えられる。Robertsら[11]はエストラジオールは卵胞膜細胞におけるアンドロステンジオン生産を強く刺激するので、これが卵胞内の顆粒層細胞におけるエストラジオールの基質をより多く提供することとなり、結果として卵胞内のエストラジオール産生が刺激されたと思われる。EB投与はこのような卵胞膜と卵胞内の性ステロイドホルモン産生を相乗的に刺激することで、結果として卵胞の機能増加と成長を増長して排卵を引き起こしたのかもしれない。今後、EB投与が卵胞発育及び排卵に与える影響を詳細に検討する必要がある。また、分娩後100日以上を経過しても無発情であった牛は試験区11.9%に対して対照区では24.3%であり、分娩後100日以降における繁殖検診や診療の頭数を大幅に低減させた。

Kawashimaら[3]は、卵巣割去牛や若齢牛にEBを投与すると末梢血中のIGF-1濃度が上昇すると報告している。またNonakaら[12]は、卵巣割去山羊や子宮摘出山羊での試験においてEB投与後1~3日でIGF-1濃度は有意に上昇したと報告している。しかし、今回の試験では末梢血中のIGF-1濃度は投与前より低値であり、わずかに上昇したものは認められたが有意な差はなかった。今回供試した牛が実際のコマーシャル農場で搾乳を開始して14~18日目であり、産褥期ストレスから回復する時期と乳量の増加が著明に始まる時期とが重なり、IGF-1濃度はEB投与前も非常に低い値であったと考えられる。実際に、試験区・対照区ともに肝機能の低下を強く示唆するGOT値100(IU/l)以上及びNEFA値0.5(mEq/l)以上を示し、機能が低下した肝臓のGHレセプターの感受性が低下し、肝臓のIGF-1分泌は変わらなかったものと思われる。

今回の試験の結果から、EB投与により実際に排卵と黄体形成を促進するメカニズムを考察した。まず、EBを投与することで血中のエストラジオール濃度が増加し、視床下部へのフィードバックによりGnRHの放出を誘起し、LHサージを起こさせた可能性が強く推察される[5]。さらに、EB投与が直接的に卵胞構成細胞に作用した可能性があげられる。実際に、エストラジオールは卵巣顆粒層細胞においてFas ligandによるアポトーシスを抑制することや、細胞周期を調節して細胞増殖を促すことが報告されている[13]。また、EB投与により繁殖性が改善した理由として、子宮回復が十分でない分娩後早期にEBを投与することで子宮平滑筋のオキシトシン受容体を増加させ[14]、搾乳時のオキシトシン分泌刺激により子宮回復を促進できる可能性も考えられる。今回のEB投与における視床下部や子宮などへの全身性及び卵巣局所性の効果についてはさらなる検討が必

要である。

以上のことから、分娩後14~18日の間にEB 6mgを投与することにより、いまだ卵巣活動が鈍く、初回排卵が起らない牛に排卵を促し、黄体化させることにより卵巣機能の回復を促進し、その後のスムーズな授精に至ったと考えられる。したがって、今回の方法は牛群の繁殖管理や獣医師の検診、診療への労力を軽減できると考えられた。

## 引用文献

- [1] Butler WR : Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle, *Anim Reprod Sci*, 60-61, 449-457 (2000)
- [2] Kawashima C, Kaneko E, Amaya Montoya C, Matsui M, Yamagishi N, Matsunaga N, Ishii M, Kida K, Miyake Y, Miyamoto A : Relationship between the first ovulation within three weeks postpartum and subsequent ovarian cycles and fertility in high producing dairy cows, *J Reprod Dev*, 52, 479-486 (2006)
- [3] Kawashima C, Fukihara S, Maeda M, Kaneko E, Montoya CA, Matsui M, Shimizu T, Matsunaga N, Kida K, Miyake Y, Schams D, Miyamoto A : Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows, *Reproduction*, 133, 155-163 (2007)
- [4] Chagas LM, Bass JJ, Blache D, Burke CR, Kay JK, Lindsay DR, Lucy MC, Martin GB, Meier S, Rhodes FM, Roche JR, Thatcher WW, Webb R : Invited review : New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows, *J Dairy Sci*, 90, 4022-4032 (2007)
- [5] Diskin MG, Austin EJ, Roche JF : Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle, *Domest Anim Endocrinol*, 23, 211-228 (2002)
- [6] Simpson RB, Chase CC Jr, Spicer LJ, Carroll JA, Hammond AC, Welsh TH Jr : Effect of exogenous estradiol on plasma concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein activity, and metabolites in ovariectomized Angus and Brahman cows, *Domest Anim Endocrinol*, 14, 367-380 (1997)
- [7] Miyamoto A, Okuda K, Schweigert FJ, Schams D : Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum *in vitro*, *J Endocrinol*, 135, 103-114 (1992)
- [8] Beam SW, Butler WR : Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows, *J Reprod Fertl Suppl*, 54, 411-424 (1999)
- [9] Sartori R, Fricke PM, Ferreira JC, Ginther OJ, Wiltbank MC : Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles, *Biol Reprod*, 65, 1403-1409 (2001)

- [10] Kulick LJ, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ : Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers, *Theriogenology*, 52, 913-921 (1999)
- [11] Roberts AJ, Skinner MK : Estrogen regulation of thecal cell steroidogenesis and differentiation : thecal cell-granulosa cell interactions, *Endocrinology*. 127, 2918-2929 (1990)
- [12] Nonaka S, Hashizume T, Horiuchi M, Mikami U, Osawa T, Miyake Y, Hara S : Origin of plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) during estrus in goats, *J Reprod Dev*, 49, 253-258 (2003)
- [13] Kulick SM, Cowan RG, Harman RM : The susceptibility of granulosa cells to apoptosis is influenced by oestradiol and the cell cycle, *J Endocrinol*, 189, 441-453 (2006)
- [14] Murata T, Narita K, Honda K, Higuchi T : Changes of receptor mRNAs for oxytocine and estrogen during the estrous cycle in rat uterus, *J Vet Med Sci*, 65, 707-712 (2003)

---

## Treatment of Estradiol During Early Postpartum Enhances the Recovery of Ovarian Activity in Dairy Cows

Yoshio YAMAGUCHI\*†, Takashi SHIMODA, Koumei SHIRASUNA,  
Chiho KAWASHIMA and Akio MIYAMOTO

\* *Medical Care Center of Nanbu, Tokachi NOSAI, Shimo Taiki 180-1, Taiki-cho, Hiroo, 089-2106, Japan*

### SUMMARY

To improve the recovery of ovarian activity and reproductive performance after parturition, 6 mg of estradiol benzoate (EB) was injected intramuscularly once during days 14-18 (around the period of maturation of the first postpartum dominant follicle) after parturition in dairy cows. The cows were randomly assigned to an estradiol treated-group (n = 164) and an untreated-control group (n = 150). Judging by rectal palpation and progesterone concentration in plasma, 86.0% of estradiol-treated cows ovulated on day 2 and formed a corpus luteum on day 7 after EB injection, compared to only 38.9% in the control group. The ratio of insemination within 60 days of parturition was higher in the estradiol-treated group (68.9%) compared with the control (47.3%). In contrast, there were no significant differences in conception rate after the first insemination and within 100 days after parturition between the estradiol-treated and control groups. The number of anestrous cows more than 100 days after parturition was lower in the estradiol-treated group (11.9%) compared with the control group (24.3%). In conclusion, the injection of EB in the early phase after parturition in dairy cows has significant potential to stimulate the recovery of ovarian activity and decrease the incidence of anestrous cows within 100 days of parturition. — Key words : estradiol, ovarian activity, ovulation, pregnancy.

† *Correspondence to : Yoshio YAMAGUCHI (Medical Care Center of Nanbu, Tokachi NOSAI)*

*Shimo Taiki 180-1, Taiki-cho, Hiroo, 089-2106, Japan*

*TEL · FAX 0155-67-2416 E-mail : madoka@za2.so-net.ne.jp*

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 64, 865 ~ 869 (2011)