

# 発情徴候が認められない乳牛における PGF<sub>2α</sub> 製剤と 安息香酸エストラジオール製剤との同時併用投与の 人工授精率及び繁殖率向上効果

山口佳男<sup>1)†</sup> 下田 崇<sup>1)</sup> 三好憲一<sup>1)</sup> 白砂孔明<sup>2)</sup> 宮本明夫<sup>2)</sup>

1) 十勝農業共済組合 (〒089-1182 帯広市川西町基線59-28)

2) 帯広畜産大学大学院畜産衛生学専攻動物医科学分野 (〒080-8555 帯広市稲田町西2線11)

(2012年5月11日受付・2013年12月20日受理)

## 要 約

発情及び発情徴候がない分娩後未授精及び人工授精後不受胎と診断された乳牛にPGF<sub>2α</sub> 15mgと安息香酸エストラジオール (E<sub>2</sub>B) 4mgを同時投与し、授精率と受胎率を調べた。投与後3日以内に授精した牛は79.1%で、受胎率は38.7%であった。血中プロゲステロン濃度が、1ng/ml以上を示す機能性黄体群では授精率100%、受胎率35.3%で、1ng/ml未満では授精率55.6%、受胎率30.0%であった。また、黄体を有する発情徴候がない牛にPGF<sub>2α</sub>とE<sub>2</sub>B同時投与した群では授精率79.2%、受胎率39.5%、PGF<sub>2α</sub>単独投与した群では授精率60.4%、受胎率37.9%であった。PGF<sub>2α</sub>とE<sub>2</sub>B投与は外部発情徴候発現率並びに人工授精実施率を高めることにより、受胎率の向上は認められないが、妊娠率を高め繁殖率を向上させることが示された。

——キーワード：無発情徴候、乳牛、安息香酸エストラジオール、人工授精実施率、PGF<sub>2α</sub>。

----- 日獣会誌 67, 255～258 (2014)

近年、世界的にも高泌乳牛の繁殖成績は低下している [1]。その原因の一つとして栄養環境 [2] や、乳房炎に起因すると考えられるエストロゲン (E) の分泌不足 [3] 並びに人手不足による発情監視の不十分などによる発情発見率の低下が上げられる。この対処法として歩数計の装着 [4] や定期的な繁殖検診、定時人工授精法 (Ovsynch-TAI) [5-7] が推奨されている。しかし、前者については設備費、後者については処置費や捕獲並びに処置の手間が大きな負担となり、普及度は高いとはいえない。

短期間に集中して発情を誘起し、発情発見率の向上を図り、繁殖管理を省力化する方法にPGF<sub>2α</sub>を用いた発情同期化があるが、発情を示すものは64%程である [8]。さらに発情発現率を高め、発情発現時期を短期に集中させるために安息香酸エストラジオール (E<sub>2</sub>B) を併用投与することも報告 [9] されている。その報告では、発情発現率や受胎率に有意な差はないが、発情発現までの

時間が13時間、排卵時間が18時間短縮したことが示されている。しかし、供試牛は泌乳していない未経産牛であり、血中プロゲステロン (P<sub>4</sub>) やエストラジオール-17β (E<sub>2</sub>) 濃度についての検討も行われていない。

そこで本研究にあつては経産の乳牛 (平均乳量、約1万kg/年) を対象に、分娩後に発情が認められない牛及び妊娠診断により不受胎で授精後発情の認められない牛に対して、PGF<sub>2α</sub>とE<sub>2</sub>Bを同時併用投与し、外部発情徴候が発現する割合及び外部発情徴候発現時に人工授精を行った場合の受胎率を検討した。

## 材料及び方法

**試験1**：北海道十勝管内の3町で飼養され、2009年4月～2010年6月までに正常分娩したホルスタイン種雌牛1,376頭を供試した。これらの牛は、稟告において分娩後50日以降120日頃まで発情及び発情徴候がみられず、直腸検査により卵巣嚢腫と診断した牛を除く987

† 連絡責任者(現所属)：山口佳男 (山口家畜診療所)

〒089-1351 河西郡中札内村東戸蔦東5線168

☎・FAX 0155-67-2416

E-mail : madoka@za2.so-net.ne.jp

頭、並びに人工授精を行ったが妊娠診断により不受胎であり、人工授精後50～60日間に発情及び発情徴候が認められない、卵巣嚢腫ではない、389頭である。

これらの牛は直腸検査を行って調べた黄体及び卵胞の状態から排卵直前の状態にあると思われるものを除いたものであり、黄体の有無及び卵胞の大きさにかかわらずPGF<sub>2α</sub>のジノプロスト15mg（動物用プロナルゴンF注射液、ファイザー(株)、東京）とE<sub>2</sub>B 4mg（エスラジオール注TKS、共立製薬(株)、東京）を混合して筋肉内に同時に注射した。

**試験2：**試験1に供試した分娩後50日以降から120日頃までの間に発情及び発情徴候が認められなかった987頭より無作為に52頭を選び、さらに、それら52頭を黄体の有無と血中P<sub>4</sub>濃度により機能性黄体を有する機能性黄体群と、機能性黄体を有しない非機能性黄体群に分けて、反応に差があるかどうかを調べた。すなわち、これらについて投与時、投与後2日と同7日に直腸検査を行って卵胞と黄体の状態を調べ、同時に採血して血漿中のP<sub>4</sub>濃度とE<sub>2</sub>濃度を調べた。この場合、処置時直前の直腸検査において黄体が触知され、かつ結果的に測定した血漿中P<sub>4</sub>濃度が1.0ng/ml以上であった34頭を機能性黄体群とした。一方、処置時前の直腸検査において黄体が触知されたが、血漿中P<sub>4</sub>濃度が1.0ng/ml未満であったもの12頭と黄体が触知されず、血漿中P<sub>4</sub>濃度が1.0ng/ml未満で中卵胞や小卵胞は触知されても、排卵前の成熟した大卵胞が触知できなかった6頭、計18頭を非機能性黄体群とした。血液は採血後アイスボックスに入れて、4℃下で検査室に持ち帰り、採血後1時間以内に4,000回転で5分間遠心分離して血漿を分離した。分離した血漿はホルモン測定時まで-20℃で凍結保存した後、P<sub>4</sub>とE<sub>2</sub>をEIA法により測定した [10]。

**試験3：**試験1及び2とは別に、PGF<sub>2α</sub>とE<sub>2</sub>B同時併用投与とPGF<sub>2α</sub>単独投与の効果を比較するため、同一期間内の繁殖検診において分娩後50日以降から120日頃までの間に発情及び発情徴候が認められないが、直腸検査により機能的な黄体が触知された牛96頭を選定し、歩数計（Nedap, Netherlands）を装着した。それらを無作為に2群に分け、一群には試験1と同様にPGF<sub>2α</sub>とE<sub>2</sub>B同時併用投与（PGF<sub>2α</sub>とE<sub>2</sub>Bの同時併用投与群）、他の一群にはPGF<sub>2α</sub> 15mgを筋肉内に1回投与（PGF<sub>2α</sub>単独投与群）した。

**外部発情徴候の観察、人工授精及び妊娠診断：**試験1, 2, 3を通して畜主による観察や歩数計による歩数増加を指標として、外部発情徴候の発現状況を調べ、発情徴候が発現したものについて人工授精師により授精適期と思われる時期に人工授精が行われた。それら2群について、人工授精実施率（処置頭数に対する人工授精実施頭数の割合）とその人工授精による受胎率（人工授精実施

頭数に対する受胎頭数の割合）を調べた。この場合、受胎率は人工授精実施後50～60日に直腸検査により妊娠診断を行って算出した。

**統計解析：**発情徴候発現率及び人工授精実施率並びに受胎率は $\chi^2$ 検定により有意差の有無を調べ、 $P < 0.05$ 以上を有意差ありとした。

## 成 績

**試験1：**PGF<sub>2α</sub>とE<sub>2</sub>Bの同時併用投与では、処置後3日以内に畜主が観察により発情徴候を認め、あるいは、歩数計による歩数の増加により発情と推定し、授精師により人工授精が行われた割合は79.1%（1,089/1,376頭）であった。その内訳は処置後1日に13.8%（190/1,376頭）、2日に56.6%（779/1,376頭）、3日に8.7%（120/1,376頭）であった。実施した人工授精による受胎率は38.7%（421/1,089頭）であった。

**試験2：**処置後3日以内に発情徴候が発現し、人工授精を行った割合は、機能性黄体群では100%（34/34頭）、非機能性黄体群では55.6%（10/18頭）であり、機能性黄体群が非機能性黄体群より有意に高かった。また、実施した人工授精による受胎率は、機能性黄体群では35.3%（12/34頭）、非機能性黄体群では30.0%（3/10頭）であり、両群間に有意差はみられなかった（ $P = 0.1584$ ）。

なお、機能性黄体群の平均血漿中のP<sub>4</sub>濃度は処置前で $5.00 \pm 2.67$ （平均 $\pm$ SD）ng/ml、処置後2日では $0.36 \pm 0.31$ ng/ml、処置後7日では $1.77 \pm 1.27$ ng/mlであった。非機能性黄体群では処置前で $0.22 \pm 0.21$ ng/ml、処置後2日では $0.20 \pm 0.11$ ng/ml、処置後7日では $0.58 \pm 0.68$ ng/mlであった。一方、処置前及び処置後の平均血漿中E<sub>2</sub>濃度は機能性黄体群では処置前には $2.10 \pm 2.61$ pg/mlであったが、処置後2日には $17.91 \pm 13.57$ pg/mlの高値を示し、同7日には $1.76 \pm 1.12$ pg/mlに低下した。

また、非機能性黄体群では、処置前には $2.29 \pm 2.42$ pg/mlであったが、処置後2日には $7.80 \pm 11.40$ pg/mlの高値を示し、同7日には $2.34 \pm 1.04$ pg/mlに低下した。

**試験3：**PGF<sub>2α</sub>とE<sub>2</sub>B同時併用投与群では、歩数が明瞭に増加した割合は処置後1日に14.6%（7/48頭）、2日に56.3%（27/48頭）、3日に8.3%（4/48頭）、4～5日には0%（0/48頭）であり、処置後2日に集中し、処置後3日以内に歩数が明瞭に増加した割合は79.2%（38/48頭）となった。また、明瞭な歩数増加の発情徴候により人工授精を実施した牛の受胎率は39.5%（15/38頭）であった。

これに対し、PGF<sub>2α</sub>単独投与群では、歩数が明瞭に増加した割合は処置後1日では2.1%（1/48頭）、2日に

4.2% (2/48頭), 3日に39.6% (19/48頭), 4日に12.5% (6/48頭), 5日に2.1% (1/48頭)であり, 3日以内に歩数の明瞭な増加を示した割合は45.8% (22/48頭), 5日以内に増加した割合は60.4% (29/48頭)であった。また, この発情徴候発現時に人工授精を実施した牛の受胎率は3日以内に歩数が明瞭に増加したものでは40.9% (9/22頭)であり, 5日以内に歩数が明瞭に増加したものでは37.9% (11/29頭)であった。

すなわち, 処置後3日以内に歩数の明瞭な増加が認められた割合は, PGF<sub>2α</sub>とE<sub>2</sub>B同時併用投与群がPGF<sub>2α</sub>単独投与群に比べ有意に高率 (79.2% vs. 45.8%;  $P < 0.001$ )であった。また, 5日以内に歩数が明瞭に増加した割合もPGF<sub>2α</sub>とE<sub>2</sub>B同時併用投与群がPGF<sub>2α</sub>単独投与群に比べ有意に高率 (79.2% vs. 60.4%;  $P < 0.05$ )であった。

## 考 察

本試験において, 発情及び発情徴候が認められないホルスタイン種経産牛に対し, PGF<sub>2α</sub>とE<sub>2</sub>Bを同時併用投与 (試験1, 試験3) することにより投与後3日以内に79.1%が外部発情徴候を発現し, 人工授精に至った。このことは, PGF<sub>2α</sub>単独投与 (試験3) では投与後3日以内及び5日以内に外部発情徴候を発現して人工授精に至った割合が46%及び60%であったことと比べると, PGF<sub>2α</sub>とE<sub>2</sub>B同時併用投与の発情徴候誘起効果は非常に高いことを示している。さらに, 発情徴候発現時の受胎成績 (試験2, 試験3) はPGF<sub>2α</sub>とE<sub>2</sub>B同時併用投与時における機能性黄体の有無別 (試験2) にみても機能性黄体群35%と非機能性黄体群30%, また, 機能性黄体を有するものにおけるPGF<sub>2α</sub>とE<sub>2</sub>B同時併用投与とPGF<sub>2α</sub>単独投与の処置別 (試験3) にみてもPGF<sub>2α</sub>とE<sub>2</sub>B同時併用投与群40%とPGF<sub>2α</sub>単独投与群38%と差はなく, PGF<sub>2α</sub>とE<sub>2</sub>Bを同時併用投与の受胎促進効果はみられなかった。このようにPGF<sub>2α</sub>とE<sub>2</sub>Bの同時併用投与は多くのものに発情徴候を発現させ, 機能性黄体を有するものにおいてはPGF<sub>2α</sub>単独投与に比べて発情徴候発現率, 人工授精実施率を高めるが, 発情徴候発現時の人工授精による受胎率には差がないことが明らかになった。

本試験ではE<sub>2</sub>Bは効能書の上限 (5mg) に近い4mgを投与した。これは供試牛が乳量約1万kg/年であることから, ヒートシンクやCIDRシンク法において前処置やPGF<sub>2α</sub>と同時または24時間後に投与されるE<sub>2</sub>Bの投与量0.5~2.0mgでは十分な効果が期待できるかどうか不明であったため, 山口ら [11] が乳牛の分娩後の卵巣機能回復促進に用いた6mgを参考にして4mgを投与した。この処置により多くのものが外部発情徴候を発現して人工授精に至ったが, 特に血漿中P<sub>4</sub>濃度が1ng/ml

以上を示す機能性黄体を有する牛についてはPGF<sub>2α</sub>の単独投与に比べて発情が1日前後早く誘起され (試験2), その大部分は注射後2日に集中した。金田ら [9] は排卵後5日以降と判断され機能的な黄体が触知される未経産乳牛にPGF<sub>2α</sub> 15mgとE<sub>2</sub>B 0.5mgの同時併用注射を行った試験において, 処置後37~48時間に50%のもので発情が集中し, PGF<sub>2α</sub>単独注射群に比べて13時間前後早く発情が発現したことを報告している。これは今回の成績とも符合する。

本成績において血中E<sub>2</sub>濃度は処置前には低くかったが投与後48時間には通常発情時の8.6pg/ml [12] に比べ高値を示し, 同7日には低下した。Schallenbergerら [13] は卵巣摘出牛にE<sub>2</sub>B 1mgを筋肉内注射すると血中E<sub>2</sub>濃度は12~14時間後に発情時の濃度あるいはそれ以上の15pg/ml前後のピークを示し, 24時間後から減少するが, 48時間後にも10pg/ml前後の高い値を示すこと, 及び, 投与後18時間にはLHサージのピークがみられることを示している。また, Martinezら [14] も卵巣摘出牛にE<sub>2</sub>を5mg筋肉内注射すると血中E<sub>2</sub>濃度は6時間後に500~600pg/mlのピークに達し, 30時間前後に基底値となることを報告している。本試験成績及びこれら既報の研究結果から, 本研究においてPGF<sub>2α</sub>とE<sub>2</sub>B同時併用投与群における発情誘起がPGF<sub>2α</sub>単独投与に比べ1日前後早かったことには併用投与されたE<sub>2</sub>Bが大きく影響していると考えられる。

以上のように, 発情及び発情徴候のみ認められない泌乳牛にPGF<sub>2α</sub>とE<sub>2</sub>B同時併用投与する方法は, 受胎促進効果は認められないものの, 外部発情徴候を高率に誘起して人工授精実施率を高めることにより, 受胎頭数を増加させる有効な方法であることが示された。

## 引用文献

- [1] Butler WR : Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle, *Anim Reprod Sci*, 60-61, 449-457 (2000)
- [2] Canfield RW, Butler WR : Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle, *Domest Anim Endocrinol*, 7, 323-330 (1990)
- [3] Suzuki C, Yoshioka K, Iwamura S, Hirose H : Endotoxin induces delayed ovulation following endocrine aberration during the proestrous phase in Holstein heifers, *Domest Anim Endocrinol*, 20, 267-278 (2001)
- [4] 坂口 実 : 搾乳牛における歩数計を用いた発情検出, *日本畜産学会報*, 81, 413-419 (2010)
- [5] Macmillan KL : Recent advances in the synchronization of estrus and ovulation in dairy cows, *J Reprod Dev*, 56, 42-47 (2010)
- [6] McArt JA, Caixeta LS, Machado VS, Gurad CL, Galvao KN, Sáfilho OG, Bicalho RC : Ovsynch versus Ultrasynd: Reproductive efficacy of a daily cattle

- synchronization protocol incorporating corpus luteum function, *J Daily Sci*, 93, 2525–2532 (2010)
- [7] Bartolome JA, van Leeuwen JJ, Thieme M, Sáfilho OG, Melendez P, Archbald LF, Thatcher WW : Synchronization and resynchronization of insemination in lactating dairy cows with the CIDR insert and the Ovsynch protocol, *Theriogenology*, 72, 869–878 (2009)
- [8] López-Gatius F, Mirzaei A, Santolaria P, Bech-Sabat G, Nogareda C, García-Ispierto I, Hanzen Ch, Yániz JL : Factors affecting the response to the specific treatment of several forms of clinical anestrus in high producing airycows, *Theriogenology*, 69, 1095–1103 (2008)
- [9] 金田義宏, 加茂前秀夫, 百目鬼郁男, 尹漢武, 中原達夫 : 牛におけるPGF<sub>2α</sub>とEBの同時筋肉内注射による発情同期化, *家畜繁殖誌*, 24, 169–172 (1978)
- [10] Miyamoto A, Okuda K, Schwegert FJ, Schams D : Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta and never growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum *in vitro*, *J Endocrinol*, 135, 103–114 (1992)
- [11] 山口佳男, 下田 崇, 白砂孔明, 川島千帆, 宮本明夫 : 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, *日獣会誌*, 64, 865–869 (2011)
- [12] Ectors F, Beckers JF, Ballman P, Derivaux J : Bovine 17β-estradiol during estrus cycle, *CR Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 281, 1257–1260 (1975)
- [13] Schallenberger E, Prokopp S : Gonadotrophins and ovaarian steroids in cattle. IV. Reestablishment of the stimulatory feedback action of oestradiol-17β on LH and SH, *Acta Endocrinologica*, 109, 44–49 (1985)
- [14] Martinez MF, Kastelic JP, Colazo MG, Mapletoft RJ : Domestic Animal Endocrinology, 33, 77–90 (2007)

Effect of Simultaneous Administration with Prostaglandin F<sub>2α</sub> and Estradiol Benzoate on Insemination and Conception Rates in Dairy Cows without Estrus Signs

Yoshio YAMAGUCHI<sup>1)†</sup>, Takashi SIMODA<sup>1)</sup>, Kenichi MIYOSHI<sup>1)</sup>, Koumei SHIRASUNA<sup>2)</sup> and Akio MIYAMOTO<sup>2)</sup>

1) *Medical Care Center of Tokachi NOSAI, Kisen 59–28, Kawanishi-cho, Obihiro, 089–1182, Japan*

2) *Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Nishi 2–11, Inada-cho, Obihiro, 080–8555, Japan*

SUMMARY

To examine the effect of prostaglandin (PG) F<sub>2α</sub> and estradiol benzoate (E<sub>2</sub>B) in inducing estrous signs in dairy cows without estrous signs, 15 mg PGF<sub>2α</sub> and 4 mg E<sub>2</sub>B were injected simultaneously into dairy cows with functional corpus luteum (CL) and acyclic or non-functional CL. Within 3 days after the injection, 79.1% of the cows showed estrous signs and were inseminated. The conception rate was 38.7% for those inseminations. Based on the plasma progesterone (P<sub>4</sub>) level, the cows were defined as the functional CL group (P<sub>4</sub> > 1 ng/ml) and the acyclic or non-functional CL group (P<sub>4</sub> < 1 ng/ml). In the functional CL group, 100% of the cows were inseminated, and the conception rate was 35.3%. In contrast, 55.6% of the cows were inseminated and the conception rate was 30.0% in the acyclic or non-functional group. In the cows with functional CL and no estrous signs, the insemination rate was 79.2% and the conception rate was 39.5% when PGF<sub>2α</sub> and E<sub>2</sub>B were injected simultaneously. In contrast, the insemination rate was 60.4% and the conception rate was 37.9% when only PGF<sub>2α</sub> was injected. The simultaneous injection with E<sub>2</sub>B and PGF<sub>2α</sub> brought about clear estrous signs and a higher insemination rate, although the conception rate was not improved. In conclusion, simultaneous injection with E<sub>2</sub>B and PGF<sub>2α</sub> may improve reproductive performance in cows showing no estrous signs.

— Key words : anestrus, dairy cow, estradiol benzoate, insemination rate, prostaglandin F<sub>2α</sub>.

† Correspondence to (Present address) : Yoshio YAMAGUCHI (*Yamaguchi Livestock Clinic*)

168 Higashi-Totsuta, Higashi 5 sen, Nakasatsunai, Kasai-gun, 089–1351, Japan

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

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 67, 255 ~ 258 (2014) —