

研 究

分娩後のホルスタイン種への黒毛和種精漿の投与効果

板橋 知子¹⁾・片桐 成二²⁾・柳川 洋二郎³⁾・佐藤秀俊¹⁾・及川 俊徳¹⁾

1) 宮城県畜産試験場 2) 酪農学園大学 3) 北海道大学

Ⅰ はじめに

乳牛において高い繁殖効率を維持するためには、分娩後にできるだけ早く受胎させることが必要であり、分娩後の卵巣および子宮機能の早期回復が求められる。

高産乳牛やリピートブリーダー牛において子宮内膜における上皮成長因子 (EGF) の発現異常が確認されており、不妊原因の一つと考えられている。正常牛では発情 2 - 4 日目および 13 - 14 日目に子宮内膜 EGF 濃度が上昇する周期的変動を示すのに対し、リピートブリーダー牛等ではピークが低下し周期的変動が消失しており¹⁾、これらの牛に対してプロジェステロン徐放剤と高用量エストラジオール製剤による治療を行うと、EGF 発現が正常化し、受胎性が回復することが報告されている²⁾。一方、げっ歯類をはじめとして、ヒトや家畜において精漿による受胎促進効果が報告されており^{3, 4)}、牛ではリピートブリーダー牛の膈内に精漿を注入することにより、EGF 発現の周期性変動が回復し、受胎性が向上したとの報告がある⁵⁾。

そこで、今回は精漿注入による分娩後の子宮内膜における EGF 発現の早期正常化と、それによる受胎性向上を目的として、分娩後のホルスタイン種への黒毛和種精漿の膈内投与効果について検討した。

Ⅱ. 材料と方法

1. 実験 1 種雄牛別子宮内膜 EGF 増強効果

(1) 精漿の分離

当場で繁殖中の黒毛和種 5 頭から精液を採取し、性状検査を実施後直ちに 2200rpm、15 分間遠心分離を行い、精漿を回収した。この操作を 2 回行い、回収した精漿を凍結融解することで残存精子を死滅させたのち、-80℃ で使用時まで保存した。

(2) 子宮内膜 EGF 濃度の測定

ホルスタイン種経産牛 45 頭を供試し、1 回目の発情日から 3 日目に非黄体側から子宮内膜を採取した。2 回目の発情日に精漿 0.5ml を PBS (-) 9.5ml に溶解したものを子宮頸管開口部を避けて膈内に注入し、発情日を 0 日目として 3 日目に非黄体側から子宮内膜を採取した。子宮内膜は採取後、子宮小丘を切除し直ちに -80℃ で測定時まで保存した。子宮内膜 EGF 濃度の測定は二重抗体サンドイッチ ELISA 法で行い、採材 1 回目の子宮内膜 EGF 濃度を 100% とした場合の、採材 2 回目の子宮内膜 EGF 濃度の比率 (%) を子宮内膜 EGF 増強効果とした。

2. 実験 2 ホルスタイン種経産牛への黒毛和種精漿の膈内注入効果

分娩後のホルスタイン種雌牛 12 頭を供試し、試験区と対照区に 6 頭ずつ振り分けた。分娩後 50 日

以降の発情日に人工授精 (AI) を行い、試験区の牛にのみ、種雄牛Cの精漿0.5mlをPBS(-)9.5mlに溶解したものを、子宮頸管開口部を避けて膈内に注入した。

Ⅲ. 結 果

1. 実験 1

採取時の精液性状検査では、採取量は4.5～10.5ml、精子数は3.7～14.1×10⁶/ml、pHは6.2～6.8、活力は75～85 (++) であった (表 1)。子宮内膜EGF増強効果は種雄牛Cが536.7±58.0%と最も高く、種雄牛Aが66.0±14.8%と最も低かった。500%以上をA、350%以上500%未満をB、100%以上350%未満をC、100%未満をDと判定したところ、A判定 1 頭、B判定 2 頭、C判定 1 頭、D判定 1 頭となった (表 2)

表 1 精液性状検査

種雄牛	採取量 (ml)	精子数 (×10 ⁶ /ml)	色	臭気	pH	活力 (++)
A	4.5	3.7	乳白	なし	6.4	75
B	10.5	5.4	乳白	なし	6.4	70
C	5.5	6.7	黄	なし	6.8	85
D	8.0	14.1	乳白	なし	6.2	80
E	6.0	5.7	乳白	なし	6.4	85

表 2 種雄牛別子宮内膜EGF増強効果

種雄牛	EGF増強効果※ (%)	判定
A	383.7 ± 49.1	B
B	287.7 ± 19.7	C
C	536.7 ± 58.0	A
D	457.7 ± 53.9	B
E	66.0 ± 14.8	D

※EGF増強効果=(2回目の子宮内膜EGF濃度/1回目の子宮内膜EGF濃度)*100

2. 実験 2

過去 5 年間の当場におけるホルスタイン種経産

牛の繁殖成績は、年間受胎頭数33.4頭、初回受胎率23.0%、AI回数3.14±0.17回であった (表 3)。対照区は初回AIで6 頭中 2 頭が受胎し、初回受胎率は33.3%であった (表 4)。また、2 回目のAIでは受胎 1 頭、不受胎 1 頭で、残り 2 頭は妊娠鑑定待ちである。これらの結果に対し、試験区では初回AIで6 頭中 4 頭が受胎し、初回受胎率66.7%と最も高い結果となった (表 4)。また、残りの 2 頭も 2 回目のAIで受胎した。試験区のAI回数は1.33回と、過去 5 年間の成績と比較して少ない結果となった (表 4)。

表 3 過去 5 年間の繁殖成績

年度	受胎 頭数	初回 受胎率	AI回数	
H21	38	28.9%	2.84 ±	0.31
H22	39	7.7%	3.62 ±	0.32
H23	34	32.4%	2.59 ±	0.37
H24	34	23.5%	3.68 ±	0.48
H25※	22	22.7%	2.91 ±	0.35
平均	33.4	23.0%	3.14 ±	0.17

※精漿を注入した牛を除く

表 4 分娩後のホルスタイン種への精漿投与効果

	牛No.	AI回次			初回 受胎率	平均 AI回数
		1	2	3		
試験区	Ex-1	◎				
	Ex-2	◎				
	Ex-3	◎			66.7% (4/6)	1.33回
	Ex-4	◎				
	Ex-5	×	◎			
	Ex-6	×	◎			
対照区	C-1	◎				
	C-2	◎				
	C-3	×	◎		33.3% (2/6)	-
	C-4	×	▲			
	C-5	×	▲			
	C-6	×	×	▲		

※◎:受胎, ×:不受胎, ▲妊娠鑑定待ち

Ⅳ. まとめおよび考察

今回の試験から、黒毛和種種雄牛精漿を分娩後のホルスタイン種の膣内に投与することにより受胎率が向上することが明らかとなった。子宮内膜の回復は、分娩後40～60日ごろに完了するとされ、この時期と一致するように、子宮内膜におけるEGF発現の周期性も回復することが報告されている⁶⁾。分娩後60日までに約70%の牛において子宮内膜のEGF発現の周期性が回復したことが報告されているが、一方で約10%の牛は分娩後90日までに周期性が回復せず、また、周期性の回復時期が遅くなるほど初回受胎率が低下することが報告されている⁶⁾。会場における過去5年間の初回受胎率は7.7～32.4%であり、今回の試験では対照区で33.3%と過去5年間の受胎率と同様に3割程度にとどまったのに対し、精漿を投与した試験区では66.7%と高い受胎率であった。また、過去5年間の平均AI回数は2.59～3.68回であったのに対し、試験区では全頭が2回以内のAIで受胎した(平均AI回数1.33回)。これらの結果から、今回の実験では、初回AI時に精漿を投与することで、子宮内膜におけるEGF発現が早期に正常化し、試験区の受胎率が高くなったと考えられた。

子宮内膜におけるEGF発現異常が認められる事例としてリピートブリーダーがあるが、精漿を投与することで発情後3日目における子宮内膜EGF濃度が増加し、受胎性が向上したとの報告があり^{5,7)}、会場においても同様の結果を確認している。

精漿の効果は種雄牛によって個体差があることが報告されており⁷⁾、今回の実験においても、5頭の種雄牛の精漿のEGF増強効果は、66.0～536.7%と

大きく異なり、この報告を支持する結果であった。従って、種雄牛精漿を用いる場合、あらかじめEGF増強効果を確認することが重要であることが示唆された。

以上のことから、牛精漿の膣内投与は分娩後のホルスタイン種の受胎性向上に効果があり、AI回数を少なくすることが可能となることが示唆された。

引用文献

- 1) S Katagiri, Y Takahashi (2004) Changes in EGF concentrations during estrous cycle in bovine endometrium and their alterations in repeat breeder cows. *Theriogenology* 62 : 103-112.
- 2) S Katagiri, Y Takahashi (2008) A Progestin-based treatment with a high dose of estradiol benzonate normalizes cyclic changes in endometrial EGF concentrations and restores fertility in repeat breeder cows, *J. Reprod. Dev.*, 54. 473-479.
- 3) Robertson SA (2007) Seminal fluid signaling the female reproductive tract: Lessons from rodents and pigs. *J. Anim. Sci.*, 85 : E36-44.
- 4) Rozeboom KJ, Troedsson MH, Hodson HH, et al. (2000) The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial insemination in swine, *J. Anim. Sci.*, 78. 443-448.
- 5) 片桐成二 (2013) 性ステロイドホルモン製剤および精漿を用いた子宮でのEGF発現正常化処置による乳用牛の妊娠率の向上, 第155回日本獣医学会学術集会講演要旨集, 145.
- 6) 片桐成二 (2011) 精漿成分による牛の子宮機能調節, 平成23年度 問題別研究会 牛における人工授精の現状と今後の研究展開. 23-26.
- 7) 白澤篤, 片桐成二, 金子絵美, ほか (2009) 牛精漿による子宮内膜上皮成長因子の発現増強および受胎促進効果, *J. Reprod. Dev.*, 55. j93.