

インヒビン免疫を行った黒毛和種牛における追加免疫およびプロスタグランディン F₂α の併用が卵巣機能に及ぼす影響

竹之内直樹*・大島一修**・島田和宏***・高橋政義***・
百目鬼郁男****・門司恭典****

(平成 15 年 8 月 19 日受付/平成 15 年 10 月 30 日受理)

要約：組換え体ヒツジインヒビン α サブユニットを抗原とした能動免疫は、ウシで複数の発情卵胞の発育と複数排卵を連続した発情周期で誘起することをすでに報告した。本研究では、インヒビン免疫により誘起される卵巣反応を効率的に維持および反復させるために、免疫効果の持続期間の延長と免疫牛における発情周期の短縮について検討した。組換え体ヒツジインヒビン α サブユニットを免疫した 4 頭の黒毛和種牛について、初回免疫後 7 カ月の間、2-3 回の追加免疫を行い、その後の卵巣反応を調べた。さらに最終追加免疫後 2 カ月の間、プロスタグランディン F₂α を併用し、その後の卵巣反応と発情周期日数を調べた。対照牛の 5 頭にはアジュバントのみを投与した。卵巣の変化は直腸検査ならびに超音波画像により追跡した。2 回目の追加免疫後における発情時の卵胞数とその後の黄体数は、それぞれ 17.2±3.6, 9.6±2.9 (最小自乗平均値±標準誤差, n=6) であり、1 回目の追加免疫後 (3.0±2.8, 0.8±2.2, n=9) と比較して有意 (発情時の卵胞数; P<0.01, 黄体数; P<0.05) に増加した。さらに、3 回目の追加免疫後、2 回目の追加免疫後と同等の卵巣反応が再度誘起された。インヒビン免疫牛の発情周期日数 (43.0±5.2, n=8) は、複数の黄体形成を原因として、対照牛 (23.1±4.7, n=10) より有意 (P<0.01) に延長した。しかし、プロスタグランディン F₂α を併用した結果、発情時の卵胞数、黄体数を変化させることなく発情周期を対照牛と同等 (18.4±5.2, n=8) まで短縮させることが可能であった。以上のことから、インヒビン免疫を行った黒毛和種牛において、追加免疫により長期にわたって複数排卵を反復して誘起させることが可能であり、さらにプロスタグランディン F₂α の併用により卵巣反応に影響を及ぼすことなく発情周期を短縮させることが可能であった。

キーワード：インヒビン免疫, 追加免疫, プロスタグランディン F₂α, 卵巣機能, ウシ

緒 言

ウシ血中ではインヒビンと卵胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone: FSH) との間には、負の相関があることが明らかにされている。卵胞波の出現に先立ち高値を示す FSH の影響により卵胞の発育が開始するが、この卵胞波の出現と一致してインヒビンの上昇がおこる結果、FSH が低下し、主席卵胞の退行または排卵が起こるまで FSH は低値で推移する¹⁾。このように、インヒビンが下垂体における FSH の合成および放出を特異的に抑制する負のフィードバックの結果、ウシでは主席卵胞の発育ならびに排卵は単一の卵胞でのみ観察される。ウシではこのインヒビンを生体内で免疫学的に中和することにより、複数排卵を誘起できることが知られている²⁻⁸⁾。また、インヒビン α サブユニットを抗原として能動免疫を行った黒毛和種牛

では、免疫後 2-4 カ月の間、複数の発情卵胞の発育および複数排卵が反復して誘起され、その卵巣反応を利用することで、インヒビン免疫を過排卵誘起処置や双子生産に適用できる⁹⁾。

ウシにおいて性腺刺激ホルモンを用いた過排卵誘起処置を反復して行った場合、卵巣反応が低下することが知られている^{10,11)}。この現象は、薬物の反復投与による低反応性の状態である down-regulation^{12,13)} の発生や妊馬血清性腺刺激ホルモンを用いた処置の反復による抗性腺刺激ホルモンの産生^{11,14-17)}などを原因とする。そのため、従来の過排卵誘起処置では、短期間内での反復処置が困難であることが問題の一つとして残されている。また、妊馬血清性腺刺激ホルモンは血中半減期が長い¹⁸⁾、黄体期に持続的な高エストロゲン環境を誘発し、その内分泌環境が原因と考えられる回収胚の品質低下¹⁹⁾なども発生する。一

* 農林水産省中国農業試験場 (農業・生物系特定産業技術研究機構東北農業研究センター)

** 農業・生物系特定産業技術研究機構近畿中国四国農業研究センター

*** 農林水産省中国農業試験場 (農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所)

**** 東京農業大学農学部畜産学科

方、インヒピン免疫は、ウシにおいて連続した発情周期で複数排卵を誘起できることから、連続した過排卵誘起処置や一定間隔での生体内卵子吸引に応用する場合、反復性の点で優れると考えられる。

インヒピン免疫はウシにおいて、過排卵誘起処置⁹⁾、双子生産^{4,9)} および生体内卵子吸引による卵子採取数の向上¹⁹⁾ を可能とするが、さらに免疫による卵巣反応を臨床繁殖領域に広く応用するためには、より効率的な卵巣反応の誘起が重要である。そのことに関しては、免疫効果が持続する期間が2-4カ月に限られることに加えて、複数の黄体形成時に次の発情発現が著しく遅延する可能性があり、免疫効果の持続期間中に単排卵の個体のように一定間隔での発情発現が期待しがたいことが問題点として残されている。これらの問題点については、本処置が免疫手法を利用していることから、追加免疫により卵巣反応の期間を持続させることが期待でき、複数排卵時にプロスタグランジン F₂α の投与により発情周期の長さを制御することで対応できるものと考えられる。これらの処置により、長期にわたって一定の間隔で複数排卵が誘起できれば、より効率的な卵巣反応の誘起が期待できる。

本研究では、組換え体ヒツジインヒピンαサブユニットを抗原とした能動免疫において、誘起される卵巣反応を効率的に維持および反復させる手法を確立するために、反復した追加免疫およびプロスタグランジン F₂α の併用が黒毛和種牛の発情周期日数と卵巣機能、特に発情時の複数の卵胞発育と複数排卵に及ぼす影響を調べた。

材料および方法

1. 供試動物および試験方法

試験1 (インヒピン免疫が発情周期日数に及ぼす影響)

インヒピン免疫が発情周期日数に及ぼす影響を調べた。農林水産省中国農業試験場畜産部(現 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構近畿中国四国農業研究センター畜産草地部)で繋養されていた、正常な発情周期を営む黒毛和種牛13頭を供試した。インヒピン免疫を行った8頭およびアジュバントのみを投与した5頭について、初回免疫後2-5カ月間の黄体数と発情周期日数との関係を調べた。

試験2 (追加免疫の反復が卵巣機能に及ぼす影響)

インヒピン免疫牛において反復した追加免疫が卵巣機能に及ぼす影響を調べた。同場で繋養されている、正常な発情周期を営む黒毛和種牛4頭を用いた。供試牛は試験前約1カ月の間、直腸検査を継続して行い、卵巣機能に異常が認められないことが確認された個体である。試験は、初回免疫後4.5-5カ月の間および初回免疫後6-7カ月目の2カ月間行った。初回免疫後、2-3回の追加免疫を行い、その後の卵巣反応を調べた。なお、各追加免疫は、前回の追加免疫により誘起された発情時の複数の卵胞発育および複数排卵が観察されなくなった時期に行った。最終追加免疫は初回免疫後6カ月目に行った。(図1)

試験3 (プロスタグランジン F₂α の併用が免疫牛の卵巣機能および発情周期日数に及ぼす影響)

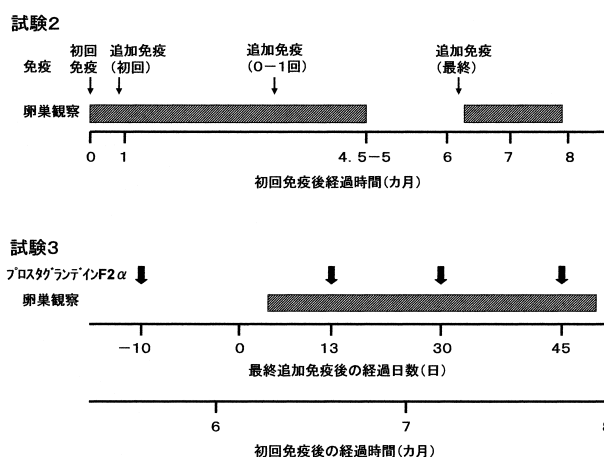


図1 インヒピン免疫牛における試験方法 (試験2, 3)

インヒピン免疫牛における発情周期の短縮が卵巣機能に及ぼす影響を調べた。試験2と同じ免疫牛を供試し、初回免疫後6-7カ月目(最終追加免疫後1-2カ月目)の2カ月間を試験期間とした。最終追加免疫の10日前にプロスタグランジン F₂α として cloprostenol (エストラメイト; 住友製薬, 大阪, 日本) 0.5 mg を筋肉内に投与することにより発情を同期化し、免疫時期が黄体発育期となるよう調整した。最終追加免疫後13, 30, 45日目にプロスタグランジン F₂α として fenprostalene (シンクロセプト; 大日本製薬, 大阪, 日本) 1 mg を皮下へ投与することにより発情を同期化し、その後の卵巣反応と発情周期日数を調べた。なお、試験1で用いたアジュバントのみを投与した5頭を対照牛とした。(図1)

試験牛の観察

試験期間中、試験1では一部の個体について、試験2では全頭について卵巣の変化を直腸検査ならびに5MHz探触子(UST-588U-5, aloka, Tokyo, Japan)を装着した超音波画像診断装置(SSD-620, aloka, Tokyo, Japan)により追跡した。発情観察は適宜行った。また、試験期間中、合わせて血液を採取し、卵巣所見と血漿中プロジェステロン(progesterone: P)ならびにエストラジオール-17β(estradiol-17β: E₂β)所見とを比較検討した。

2. 免疫薬物および免疫方法

ワクチンの作成はBROWNら²¹⁾の方法に準じた。免疫薬物として、大腸菌由来の組み換え体ヒツジインヒピンαサブユニット(Biotech Australia Pty. Ltd., Sydney, Australia) 0.25 mg をアジュバント1 ml と混和しワクチン化したものを用いた。アジュバントは、鉱物オイルである Marcol 52 (Esso, Sydney, Australia) 9 容と界面活性剤である Montanide 888 (SEPPIC, Paris, France) 1 容を混和したものである。初回免疫は発情日に、追加免疫は初回免疫後28日目に、ワクチン2 ml (組み換え体ヒツジインヒピンαサブユニットとして0.5 mg) を、頸部皮下に投与し免疫を行った。2回目以降の追加免疫でもワクチン2 ml を同様に投与した。

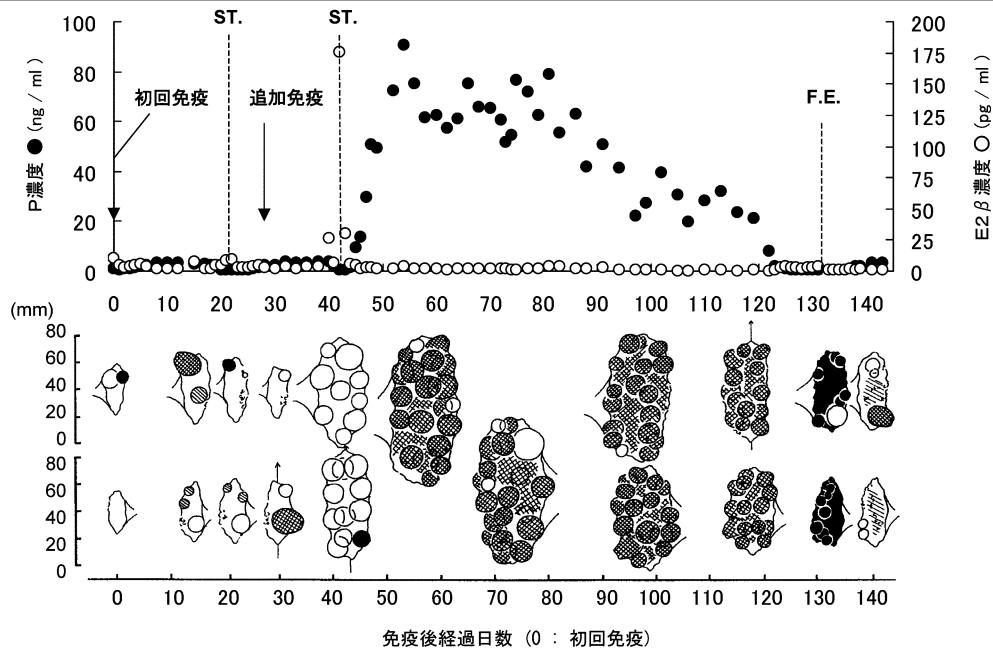


図2 インヒピン免疫牛1例におけるプロゲステロン (●), エストラジオール 17β (○) ならびに卵巣所見の推移 (JB374)
ST: 乗駕許容, FE: 鈍性発情

3. ホルモン測定

外頸静脈よりヘパリン加容器に血液を採取後、直ちに遠心分離を開始し、3,000 rpm, 1.5 hr, 4°C の条件下で血漿を分離した。得られた血漿はホルモン測定まで -20°C で凍結保存した。ウシ血漿中 P ならびに $\text{E}2\beta$ の測定は既報^{22,23)} に従って酵素免疫測定法により行った。

4. 統計処理

供試牛について、発情時の卵胞数、排卵後の黄体数および発情周期日数に関するデータを蓄積した。なお、発情時の卵胞数は直径 5 mm 以上に達したものを記録した。得られたデータについて統計解析を行い、免疫が卵巣機能に及ぼす影響を調べた。統計処理は HARVEY²⁴⁾ の最小自乗分散分析法により行った。

結 果

1. インヒピン免疫が発情周期日数に及ぼす影響 (試験 1)

インヒピン免疫牛では発情時の卵胞数、排卵後の黄体数は、それぞれ 7.0 ± 1.9 , 3.7 ± 1.2 (最小自乗平均値 \pm 標準誤差, $n=23$) であり、対照牛ではそれぞれ 1.0 ± 3.4 , 1.0 ± 1.4 ($n=10$) であった。発情時の複数の卵胞発育と複数排卵はインヒピン免疫牛でのみ観察され、対照牛では単排卵性に経過した。複数ならびに単一の黄体が形成された発情周期の日数はそれぞれ 21-89, 18-26 日であった。分散分析の結果、複数の黄体が形成された発情周期長は 39.0 ± 4.7 日 ($n=10$) を示し、単一の黄体が形成された場合 (22.5 ± 3.54 , $n=18$) と比較して有意 ($P < 0.01$) に長くなった。

インヒピン免疫牛のうち最も長い発情周期日数を示した

個体 (JB374) のステロイドホルモンならびに卵巣所見の推移を図 2 に示した。本牛は、追加免疫後の初回発情時 (初回免疫後 43 日目) に明瞭な発情徴候を示し、44 個の発情卵胞の発育が観察された。このうち 34 個で排卵が認められ、試験牛の中で最も良好な卵巣反応が誘起されたが、この時の発情周期日数は 89 日を示し、初回免疫後 132 日目まで発情は発現しなかった。また、初回免疫後 132 日目の発情は鈍性に経過し、単一の発情卵胞の発育と単排卵が観察され、免疫による卵巣反応は誘起されなかった。複数排卵が誘起された発情周期では、発情 3 日前 (初回免疫後 40 日目) から $\text{E}2\beta$ 値の上昇が観察され、発情前日に 175.6 pg/ml のピーク値に達した。その後、 $\text{E}2\beta$ 値は発情後 4 日目 (初回免疫後 46 日目) までに急激に低下し、黄体発育期から開花期の間は $0.3\text{--}3.8 \text{ pg/ml}$ の低値で推移した。なお、発情前日の $\text{E}2\beta$ ピーク値は発情時の複数の卵胞発育を反映し、単一の発情卵胞のみの発育が観察された初回免疫時および初回免疫後 22 日目の発情日でのピーク値 (それぞれ 10.1 , 9.8 pg/ml) と比較して極めて高かった。また、初回免疫後 132 日目に発現した鈍性発情時の $\text{E}2\beta$ ピーク値は 3.7 pg/ml と低かった。P 値は、複数の黄体形成が観察された発情周期では、発情後急激に上昇し、複数の黄体形成を反映して発情後 5-48 日目の間 (初回免疫後 48-91 日目) は $50.9\text{--}90.4 \text{ ng/ml}$ で、49-79 日目の間 (初回免疫後 92-119 日目) は $19.6\text{--}39.4 \text{ ng/ml}$ で推移した。その後 P 値は急激に減少し、追加免疫後 2 回目の発情日である初回免疫後 132 日目には 1 ng/ml 以下の低値を示した。この黄体開花期の P 値は、単排卵性に経過した発情周期 ($2.4\text{--}3.7 \text{ ng/ml}$) と比較して、極めて高い値で推移した。

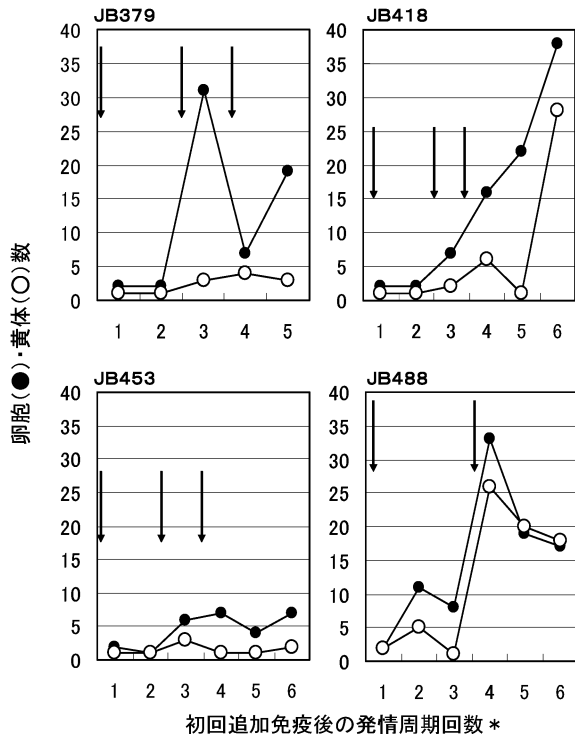


図 3 各個体における追加免疫後の発情時の卵胞数および黄体数の推移。* 初回免疫後 1-3 回目, 4-5 回目はそれぞれ連続した発情周期。3-4 回目の間に約 1-2 カ月の期間あり。矢印は追加免疫を示す。

2. 追加免疫の反復が卵巣機能に及ぼす影響 (試験 2)

各個体における追加免疫後の発情時の卵胞数および黄体数の推移を図 3 に示した。供試牛のうち JB488 については、1 回目の追加免疫後の連続した 3 および 2 発情周期において発情時に複数の卵胞発育とその後の複数排卵がそれぞれ観察されたため、試験期間中における追加免疫は、初回免疫後 28, 163 日目に行った 2 回であった。JB488 を除く 3 頭については、初回免疫後 28, 79-83, 152-162 日目に合計 3 回の追加免疫を行った。JB488 では、1 回目の追加免疫後から複数の卵胞発育と複数の排卵が誘起され、追加免疫によりその卵巣反応はより強くなった。他の個体では 1 回目の追加免疫後、複数の卵胞発育は誘起されたが、複数排卵は観察されなかった。しかし、その後の追加免疫の反復により、各個体で追加免疫後の卵巣反応はさまざまであったが、卵巣反応は増強または維持される傾向にあった。

追加免疫後の発情時の卵胞数ならびにその後の黄体数に関する分散分析結果を表 1 に示した。初回免疫後 28 日目に行った 1 回目の追加免疫後に複数の卵胞発育が観察されたが、ほぼ単排卵性に経過した。しかし 2 回目の追加免疫後では、発情時の卵胞数ならびにその後の黄体数は、1 回目の追加免疫後のそれぞれ 3.0±2.8, 0.8±2.2 (n=9) から 17.2±3.6, 9.6±2.9 (n=6) に有意に増加した (発情時の卵胞数: P<0.01, 黄体数: P<0.05)。さらに、2 回目の追加免疫により誘起された卵巣反応が消失した後に、3 回目の追加免疫を行った。その結果、発情時に複数の卵胞発育とそ

表 1 追加免疫後の発情時の卵胞数ならびにその後の黄体数の最小自乗平均値と標準誤差

変動因	観察数	最小自乗平均値±標準誤差	
		発情時の卵胞数*1	黄体数
全平均	23	12.4±1.7	6.5±1.4
供試牛			
JB379	5	13.2±3.8a	3.0±3.0a
JB418	6	14.5±3.5a	8.2±2.8b
JB453	6	4.5±3.5b	1.6±2.8a
JB488	6	17.3±3.7a	13.4±2.9b
追加免疫回数*2			
1 回 (28)	9	3.0±2.8a	0.8±2.2a
2 回 (79-163)	6	17.2±3.6c	9.6±2.9b
3 回 (152-162)	8	16.9±3.2c	9.2±2.5b

*1 直径 5mm 以上
*2 ()内は初回免疫からの日数
各変動因内で異符号間に有意差有り (a-b:P<0.05, a-c:P<0.01)

れに続く複数排卵が再度誘起され、この時の発情時の卵胞数およびその後の黄体数は 2 回目の追加免疫後と同等であった。なお、インヒピン免疫による発情時の卵胞数ならびにその後の黄体数は、個体間で有意 (P<0.05) な差が認められた。

図 4 にインヒピン免疫牛 1 例 (JB418) におけるステロイドホルモンならびに卵巣所見の推移を示した。本牛では、初回免疫後に 3 回の追加免疫を行った。初回免疫を行った発情周期から 2 回目の追加免疫 (初回免疫後 83 日目) を行った発情周期までの間、免疫による卵巣反応は誘起されず、いずれの発情周期も単排卵性に経過した。しかし、2 回目の追加免疫を行った次の発情周期では、初回免疫後 98 日目に発現した発情時に 7 個の卵胞の発育とそれに続いて双排卵が観察された。さらに、免疫による卵巣反応が消失したことを確認し、初回免疫後 153 日目に 3 回目の追加免疫を行った結果、連続した 3 発情周期において、それぞれ発情時に 16, 22, 38 個の卵胞発育が認められ、続いて 6, 1, 28 個の排卵が観察された。血中 P および E_{2β} 値は黄体ならびに卵胞数を反映して、特に 3 回目の追加免疫以降で高く推移した。単排卵性に経過した初回免疫後の 1-4 回目の発情周期と比較して、P は黄体開花期で約 2-12 倍の値で推移し、E_{2β} は発情期のピーク値で 2.7-6.1 倍の値を示した。

3. プロスタグランジン F_{2α} の併用が免疫牛の卵巣機能および発情周期日数に及ぼす影響 (試験 3)

プロスタグランジン F_{2α} 投与後の卵巣反応および発情周期日数に関する分散分析結果を表 2 に示した。インヒピン免疫牛では、単排卵で経過した対照牛と比較して、発情時の卵胞数とその後の黄体数は最小自乗平均値でそれぞれ 16.5, 8.5 まで有意 (卵胞数: P<0.01, 黄体数: P<0.05) に増加したが、発情周期日数は対照牛の 23.1 日と比較して 43.0 日と有意 (P<0.01) に延長した。しかし、プロスタグランジン F_{2α} の併用により、発情周期日数は対照牛と同等の 18.4 日まで有意 (P<0.01) に短縮した。また、その時の発情時の卵胞数とその後の黄体数はそれぞれ 19.5, 13.4 を示し、有意差はないものの、インヒピン免疫を単独で行った場合より多かった。なお、最終追加免疫後

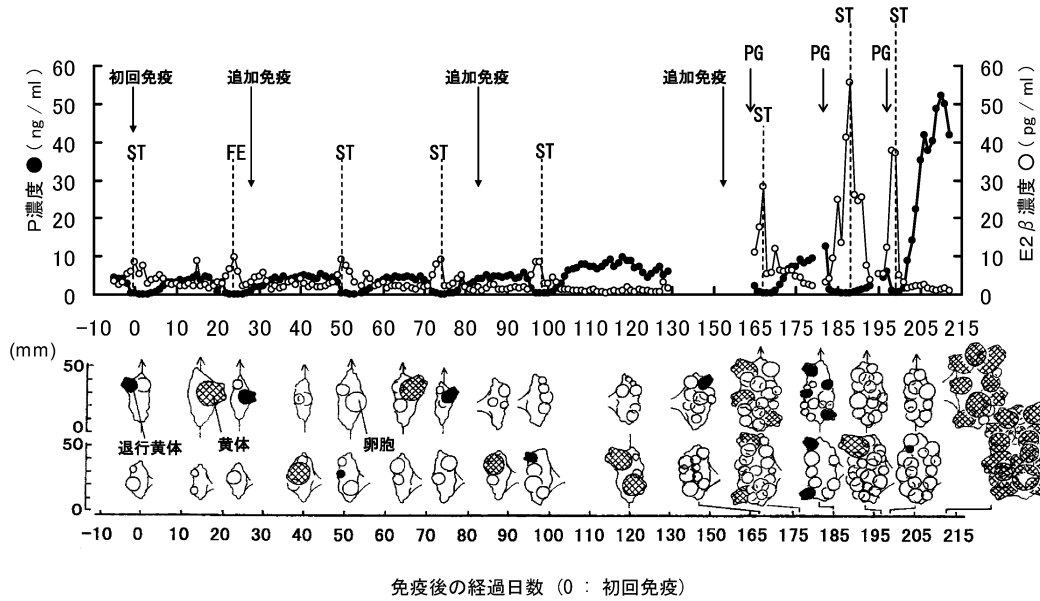


図 4 インヒピン免疫牛 1 例におけるプロゲステロン (●), エストラジオール_{17β} (○) ならびに卵巣所見の推移 (JB418)
ST: 乗駕許容, FE: 鈍性発情, PG: fenprostalene 1.0 mg s.c.

表 2 インヒピン免疫におけるプロスタグランディン F_{2α} の併用が卵胞数, 黄体数ならびに発情周期日数に及ぼす影響

変動因	観察数	最小自乗平均値±標準誤差		
		発情時の卵胞数 ^{*1}	黄体数	発情周期日数
全平均	26	12.3±2.1	7.6±1.7	28.2±2.9
処置 ^{*2}				
対照	10	1.0±3.4 ^a	1.0±2.7 ^a	23.1±4.7 ^a
インヒピン免疫	8	16.5±3.8 ^c	8.5±3.0 ^a	43.0±5.2 ^c
インヒピン免疫+PG	8	19.5±3.8 ^c	13.4±3.0 ^b	18.4±5.2 ^a

* 1 直径 5 mm 以上
* 2 対照: アジュバントのみ投与
インヒピン免疫: 初回免疫+追加免疫 2~3 回
インヒピン免疫+PG: インヒピン免疫+fenprostalene 1mg s.c.
各カラム内で異符号間に有意差有り (a-b: P<0.05, a-c: P<0.01)

13, 30, 45 日目のプロスタグランディン F_{2α} の投与時期は、発情後 11-18 日目 (14.3±2.2, 単純平均値±標準偏差, n=11) に相当し、プロスタグランディン F_{2α} の投与後 1-4 日目 (2.8±1.0, 単純平均値±標準偏差, n=11) に全頭で明瞭な発情が発現した。また、プロスタグランディン F_{2α} 投与時の P 値は、いずれの個体でも 2.0-50.0 ng/ml の機能的な値であった。

図 5 にインヒピン免疫牛 1 例 (JB488) におけるステロイドホルモンならびに卵巣上構造物数の推移を示した。本牛では、1 回目の追加免疫後、連続した 2 発情周期で発情時に複数の卵胞発育と複数の排卵が誘起された (図 3 JB488)。3 回目の発情周期では、初回免疫後 97 日目に発情が発現し、複数の卵胞発育が認められたが、単排卵であった。なお、この発情周期の長さは、単一の黄体形成ながら 42 日とやや長かった。2 回目の追加免疫は、1 回目の追加免疫による卵巣反応が消失したことを確認し、初回免疫後 163 日目に行った。2 回目の追加免疫に際しては、初回免疫後 153

日目に cloprostenol 0.5 mg の投与により、初回免疫後 156 日目に発情を誘起し、免疫時期が黄体発育期になるよう調整した。その後の発情周期ではプロスタグランディン F_{2α} を併用した。最終追加免疫後 13, 30, 45 日目 (初回免疫後 175, 192, 207 日目) にそれぞれプロスタグランディン F_{2α} として fenprostalene 1 mg を投与した結果、投与後 1-4 日目に明瞭な発情が発現し、この連続した 3 回の発情周期において発情時の卵胞数およびその後の黄体数はそれぞれ 17-33, 18-26 個が観察され、1 回目の追加免疫以降の発情周期 (発情時の卵胞数: 2-11, 黄体数: 1-5) と比較して多かった。また、この連続した 3 発情周期の長さは、それぞれ 20, 15, 19 日であった。黄体開花期の P 値および発情時の E_{2β} 値は、それぞれ黄体ならびに卵胞数を反映して、特に 2 回目の追加免疫以降で高く推移した。すなわち、2 回目の追加免疫以降における発情周期中の黄体開花期における P 値ならびに発情時の E_{2β} ピーク値はそれぞれ 11.2-59.7 ng/ml, 13.9-99.2 pg/ml を示し、2 回目の追加免疫以前における値 (P; 3.0-14.2 ng/ml, E_{2β}; 8.1-22.5 pg/ml) と比較して高く推移した。特に、発情時の卵胞数および排卵数が最も多く観察された 2 回目の追加免疫後の初回発情周期では、P および E_{2β} 値は最も高く推移した。

考 察

本研究では、組換え体ヒツジンヒピン α サブユニットを抗原として能動免疫を行った黒毛和種牛において、誘起される卵巣反応を効率的に維持および反復させる手法を検討した結果、追加免疫により、長期にわたって複数排卵を反復して誘起でき、さらにプロスタグランディン F_{2α} を併用することで、卵巣反応に影響を及ぼさず発情周期の短縮を可能にすることを示した。

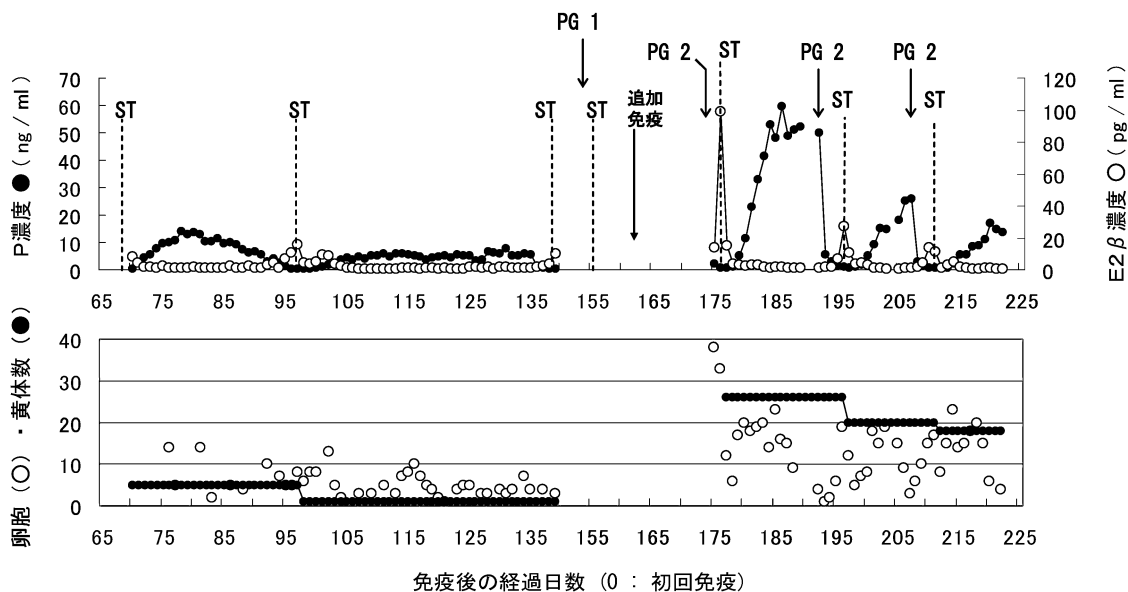


図 5 インヒピン免疫牛 1 例におけるプロゲステロン (●), エストラジオール 17β (○) ならびに卵胞 (5 mm ≤) および黄体数の推移 (JB488)
ST: 乗駕許容, PG 1: cloprostenol 0.5 mg i.m., PG 2: fenprostalene 1.0 mg s.c.

インヒピン免疫における免疫後の抗体価と卵巣反応との間には関連性のあることが知られている。ウシにインヒピンの合成ペプチド断片を免疫した報告⁷⁾では、免疫後の抗体価と複数排卵の発生率との間には有意な正の相関が認められることが明らかにされており、ブタに組み換え体ウシインヒピン α サブユニットを免疫した報告²¹⁾では、排卵数の変異に対する抗体価の相対寄与率は 38% であるとされている。一方、インヒピン免疫を行った家畜において約 3-8 週間間隔で 2-6 回の追加免疫を行い、血中抗体価の推移を調べた報告では、血中抗体価の上昇開始時期は初回免疫後とする報告^{7, 20, 25)}と追加免疫後とする報告^{26, 27)}がある。しかし、いずれの場合でも血中抗体価は追加免疫後さらに上昇し、ピークに達した後も追加免疫により高く維持されるとある。また、用いた抗原の由来は合成ペプチド断片、卵胞液からの部分的な精製物または組み換え体インヒピン α サブユニット等さまざまであるが、最終免疫後に血中抗体価が高く検出される期間は、ウシ^{2, 7)}では約 3 カ月、ヒツジ^{26, 28)}では約 4-11 カ月と長期に及ぶことが明らかにされている。これらのことから、追加免疫を反復することで血中抗体価を上昇させ、さらに持続的に血中抗体価を高く維持させることができる結果、免疫による卵巣反応を増強または維持できるものと考えられる。今回、血中抗体価の推移については検討しなかったが、追加免疫が卵巣機能に及ぼす影響を調べた結果、2 回目の追加免疫後、発情時の卵胞数とその後の黄体数は初回の追加免疫後と比較して、それぞれ 5.7, 12 倍まで増加した。さらに 3 回目の追加免疫により、同等の卵巣反応が再度誘起された。この結果は前述の追加免疫に関する報告^{7, 25-28)}の内容を裏付けるものであった。また卵巣反応に関しては個体間の変動が認められ、従来の報告^{7, 28, 29)}と同様であった。

前述の追加免疫に関する報告^{7, 25-28)}は、血中抗体価を低下させない比較的短い間隔で反復した場合であるが、PRICE^ら²⁾は、ヒツジ卵胞液からの部分的な精製物を抗原としてウシに 4 カ月間隔で 4 回免疫を行っており、追加免疫は血中抗体価が消失した後に行われている。この報告では、追加免疫後に再度上昇する血中抗体価は前回の免疫後と比較して高く、さらに免疫の反復により、血中抗体価の持続期間が長くなることが明らかにされている。また 3 年間の観察期間中、ヒツジにおいて繁殖季節に 1 カ月間隔で 3-6 回の免疫を行い、排卵数との関係を調べた結果、いずれの年度でも免疫後に排卵数は増加し、再免疫を行った 2 および 3 年目では、免疫期間中の排卵数は有意に増加することが報告されている²⁹⁾。さらに、われわれもこれまでに供試したインヒピン免疫牛のうち、免疫から 2 年経過した個体に再免疫を行った結果、再度、発情時に複数の卵胞発育とそれに続いて複数排卵が誘起されたことを確認している(未発表データ)。これらのことにより、インヒピン免疫牛では血中の抗体が消失した後も一定の期間、抗体産生能が残っており、追加免疫により再度血中抗体価の上昇と卵巣反応が誘起されると考えられる。従って、免疫歴のあるウシでは、この反応を利用して、双子の連産や分娩後に連続した過排卵誘起処置の再誘起等が期待できる。

インヒピン免疫牛における発情周期の長さは、対照牛と比較して約 1.9 倍まで延長した。この発情周期の延長は試験 1 で示されたように、複数の黄体形成を原因とし、免疫後の連続した発情周期で複数排卵が誘起された場合、免疫効果の有効期間内に発現する発情回数は単排卵の個体と比較して 53.8% まで減少すると試算される。このことから、インヒピン免疫は発情時の複数の卵胞発育および複数排卵を誘起するが、その後、複数の黄体形成を原因とする発情

周期の延長が発生する結果、免疫効果が持続する期間内に発現する発情回数は単排卵の個体と比較すると減少する。複数の黄体形成が観察された発情周期のうち最も長いものは89日を示したが、その個体(JB374)では観察を行った追加免疫後の約4カ月間、発情の発現はわずか2回であり、複数排卵が誘起された発情周期はそのうち1発情周期のみであった(図2)。BLEACHら⁷⁾はインヒビン免疫牛において排卵数12個以上の良好な反応の誘起は、20-21日の一定間隔で胚回収を反復して行うために有効であると仮定している。また、単一の胚回収に関して、インヒビン免疫による卵巣反応が過排卵誘起処置として利用可能であることが著者ら⁹⁾によって実証されている。しかし、今回の結果では、複数の黄体形成は発情周期の延長の原因となるため、一定の間隔で複数排卵を誘起する上で問題となることが明らかとなった。そこで、免疫牛にプロスタグランジンF2 α を投与し発情周期の短縮を試みた結果、インヒビン免疫による発情時の複数の卵胞発育、複数排卵などの卵巣反応に影響を及ぼすことなく、発情周期を単排卵の個体と同等まで有意に短縮させることが可能であった。今回の結果から、プロスタグランジンF2 α の併用により、免疫効果の持続期間中に発現する発情回数は2.3倍まで増加すると試算された。また、JB488(図3 JB488, 図5)のように良好な卵巣反応が反復して誘起される個体では、18.3日間隔で連続した過排卵誘起処置が誘起できる可能性を示した。なお、プロスタグランジンF2 α の投与は発情後11-18日目に行ったが、用いたプロスタグランジンF2 α の有効投与時期が排卵後5-16日目であることを考えれば、さらに発情周期を短縮させることが可能と考えられた。

謝辞：本研究を遂行するにあたり、ワクチンを御提供下さったBiotech Australia Pty. Ltd.のC.G. TSONIS博士に深く感謝の意を表す。また、供試牛の適切な管理をしていただいた農林水産省中国農業試験場(現 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構近畿中国四国農業研究センター)畜産部業務科職員の方々に感謝する。

引用文献

- 1) KANEKO, H., KISHI, H., WATANABE, G., TAYA, K., SASAMOTO, S. and HASEGAWA, Y., 1995. Changes in plasma concentrations of immunoreactive inhibin, estradiol- and FSH associated with follicular waves during the estrous cycle of the cow. *J. Reprod. Dev.* **41**, 311-320.
- 2) PRICE, C.A., MORRIS, B.A., O'SHEA, T. and WEBB, R. 1987. Active immunization of cattle against partly purified follicular fluid from sheep. *J. Reprod. Fertil.* **81**, 161-168.
- 3) GLENCROSS, R.G., BLEACH, E.C., MCLEOD, B.J., BEARD, A.J. and KNIGHT, P.G. 1992. Effect of active immunization of heifers against inhibin on plasma FSH concentrations, ovarian follicular development and ovulation rate. *J. Endocrinol.* **134**, 11-18.
- 4) MORRIS, D.G., MCDERMOTT, M.G., DISKIN, M.G., MORRISON, C.A., SWIFT, P.J. and SREENAN, J.M. 1993. Effect of immunization against synthetic peptide sequences of bovine inhibin alpha-subunit on ovulation rate and twinning rate in heifers. *J. Reprod. Fertil.* **97**, 255-261.
- 5) GLENCROSS, R.G., BLEACH, E.C., WOOD, S.C. and KNIGHT, P. G. 1994. Active immunization of heifers against inhibin : effects on plasma concentrations of gonadotrophins, steroids and ovulation follicular dynamics during prostaglandin-synchronized cycles. *J. Reprod. Fertil.* **100**, 599-605.
- 6) MORRIS, D.G., MCDERMOTT, M.G., GREALY, M., DISKIN, M.G., MORRISON, C.A., SWIFT, P.J. and SREENAN, J.M. 1995. Effect of immunization against synthetic peptide sequences of the alpha N-subunit of bovine inhibin on ovulation rate, gonadotrophin concentrations and fertility in heifers. *J. Reprod. Fertil.* **103**, 285-291.
- 7) BLEACH, E.C.L., MUTTUKRISHNA, S., CUNNINGHAM, F.J., KNIGHT, P.G. and GLENCROSS, R.G. 1996. Effect of inhibin immunization using different synthetic peptide fragments of the bovine *ac*-subunit on plasma anti-inhibin titres, plasma FSH concentrations and the incidence of multiple ovulation in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* **41**, 1-12.
- 8) MORRIS, D.G., BROWNE, D., DISKIN, M.G. and SREENAN, J.M. 1997. Effect of peptide to carrier ratio on the immune and ovarian response to inhibin immunization in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **48**, 1-8.
- 9) 竹之内直樹・大島一修・島田和宏・高橋政義・百目鬼郁男・門司恭典, 2003. ヒツジインヒビン α サブユニットの能動免疫が黒毛和種牛の卵巣機能に及ぼす影響とその過排卵誘起処置および双子生産への適応性. 東京農業大学農学集報, **48**, 71-79. (印刷中)
- 10) DORN, C.G., BAKER, J.F., LUNT, D.K. and KRAEMER, D.C. 1991. Repeated, short interval superovulation in virgin heifers. *Theriogenology*. **35**, 302.
- 11) HASTLE, J.F. 1992. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **75**, 2857-2879.
- 12) RONAYNE, E., ENRIGHT, W.J. and ROCHE, J.F. 1993. Effects of continuous administration of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or a potent GnRH analogue on blood luteinizing hormone and testosterone concentrations in prepubertal bulls. *Domest. Anim. Endocrinol.* **10**, 179-89.
- 13) TAKAHASHI, T., HIRAKO, M., PATEL, O.V., SHIMIZU, M., HASEGAWA, Y., DOMEKI, I. and HASHIZUME, K. 2002. Plasma steroid profiles following follicle-stimulating hormone or equine chorionic gonadotropin injection in cows chronically treated with gonadotropin-releasing hormone agonist. *J. Vet. Med. Sci.* **64**, 731-734.
- 14) DRION, P.V., De ROOVER, R., HOUTAIN, J.Y., MCNAMARA, E. M., REMY, B., SULON, J. and BECKERS, J.F. 2001. Increase of plasma eCG binding rate after administration of repeated high dose of eCG to cows. *Reprod. Nutr. Dev.* **41**, 207-215.
- 15) 中原達夫・山内 亮・片岡敏明, 1961. 牛における抗胎盤性性腺刺激ホルモン (Anti-HCG) に関する研究 I 実験牛における Anti-HCG の産生について, 家畜繁殖誌, **7**, 27-31.
- 16) 中原達夫・山内 亮・片岡敏明, 1961. 牛における抗胎盤性性腺刺激ホルモン (Anti-HCG) に関する研究 II 野外牛における Anti-HCG の産生について, 家畜繁殖誌, **7**, 31-37.
- 17) JAINUDEEN, M.R., HAFEZ, E.S.E., GOLLNICK, P.D. and MOUSTAFA, L.A. 1966. Antigonadotrophins in the serum of cows following repeated therapeutic pregnant mare serum injections. *Amer. J. Vet. Res.* **27**, 669-675.
- 18) KATAGIRI, S., TAKAHASHI, Y., HISHINUMA, M., KANAGAWA, H., DOCHI, O. and TAKAKURA, H. 1991. PMSG profiles in superovulated and anti-PMSG antiserum treated mice and heifers with enzymeimmunoassay. *Jpn. J. Vet. Res.*

- 39, 11-21.
- 19) NAKAJIMA, A., HIRAIZUMI, S., ONODERA, K., SUZUKI, H., KUDO, Y. and DOMEKI, I. 1992. The use of bovine anti-PMSG serum in beef cattle after PMSG- superovulation. *J. Vet. Med. Sci.* **54**, 95-98.
 - 20) KONISHI, M., AOYAGI, Y., TAKEDOMI, T., ITAKURA, H., ITOH, T., YAZAWA, S., KISHI, H., TAYA, K., WATANABE, G. and KANAGAWA, H. 1996. Effect of active immunization of cattle against inhibin on ovarian follicular development and ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration. *Theriogenology*. **46**, 33-43.
 - 21) BROWN, R.W., HUNGERFORD, J.W., GREENWOOD, P.E., BLOOR, R.J., EVANS, D.F., TSONIS, C.G. and FORAGE, R.G. 1990. Immunization against recombinant bovine inhibin alpha subunit causes increased ovulation rates in gilts. *J. Reprod. Fertil.* **90**, 199-205.
 - 22) 竹之内直樹・居在家義昭・大島一修・島田和宏・高橋政義. 1993. 牛血中プロジェステロンの酵素免疫測定法, 中国農試研報, **12**, 125-132.
 - 23) 竹之内直樹・大島一修・島田和宏・高橋政義, 1996. マイクロプレートを用いた牛血漿中エストラジオール-17β の酵素免疫測定法, 日本繁殖生物学雑誌, **43**, 9-14.
 - 24) HARVEY, W.R., 1977. User's guide for LSMLMW. Ohio State Univ., Columbus, 1-59.
 - 25) MIZUMACHI, M., VOGLMAYR, J.K., WASHINGTON, D.W., CHEN, C.L. and BARDIN, C.W. 1990. Superovulation of ewes immunized against the human recombinant inhibin alpha-subunit associated with increased pre- and post-ovulatory follicle-stimulating hormone levels. *Endocrinology*. **126**, 1058-1063.
 - 26) O'SHEA, T., BINDON, B.M. FORAGE, R.G., FINDLAY, J.K. and TSONIS, C.G. 1993. Active immunization of Merino ewe lambs with recombinant bovine alpha inhibin advances puberty and increases ovulation rate. *Reprod. Fertil. Dev.* **5**, 173-180.
 - 27) WRATHALL, J.H.M., MCLEOD, B/J/. GLENCROSS, R.G., BEARD, A.J. and KNIGHT, P.G. 1990. Inhibin immunoneutralization by antibodies raised against synthetic peptide sequences of inhibin α subunit : effects on gonadotrophin concentrations and ovulation rate in sheep. *J. Endocrinol.* **124**, 167-176.
 - 28) FINDLAY, J.K., DOUGHTON, B., ROBERTSON, D.M. and FORAGE, R.G. 1989. Effects of immunization against recombinant bovine inhibin α subunit on circulating concentrations of gonadotrophins in ewes. *J. Endocrinol.* **120**, 59-65.
 - 29) CUMMINS, L.J., O'SHEA, T., AL-OBAIDI, S.A.R., BINDON, B.M. and Findlay, J.K. 1986. Increase in ovulation rate after immunization of Merino ewes with a fraction of bovine follicular fluid containing inhibin activity. *J. Reprod. Fertil.* **77**, 365-372.

Effects of booster injections and prostaglandin F₂α administration on ovarian activity in Japanese Black cows immunized against the recombinant ovine inhibin α subunit

By

Naoki TAKENOUCI*, Kazunaga OSHIMA**, Kazuhiro SHIMADA***,
Masayoshi TAKAHASHI***, Ikuo DOMEKI**** and Yasunori MONJI****

(Received August 19, 2003/Accepted October 30, 2003)

Summary : We previously reported that active immunization against the recombinant ovine inhibin α subunit can enhance follicular development and increase the ovulation rate during successive estrous cycles in Japanese Black cows. However some problems have remained in efficiently inducing the ovarian reaction. The aims of this study were to examine the effects of repeated booster injections and prostaglandin F₂α administration on ovarian activity and estrous cycle length in immunized Japanese Black cows in order to make the ovarian response more efficient. In four cows immunized against the recombinant ovine inhibin α subunit, two or three booster injections were given at various intervals over a period of 7 months. In addition, during the last 2 months following the final booster injection, immunized cows were treated three times with prostaglandin F₂α. Five control cows received adjuvant only. Ovaries were examined by rectal palpation and by ultrasonography, and days of estrus were recorded. The second booster injection enhanced follicular development (17.2 ± 3.6 vs. 3.0 ± 2.8 P<0.01) and multiple ovulations (9.6 ± 2.9 vs. 0.8 ± 2.2 ; P<0.05) in comparison with the first booster injection. In addition, the third booster injection induced the same ovarian responses as the second booster injection. The length of the estrous cycle in immunized cows was significantly longer than that of the control cows (43.0 ± 5.2 days vs. 23.1 ± 4.7 ; P<0.01), due to multiple formation of CL. The prostaglandin F₂α administration in immunized cows reduced estrous cycle length significantly (P<0.01) without any effect on ovarian response. In conclusion, repeated booster injections enhance the repeated ovarian responses in inhibin-immunized Japanese Black cows. In addition, utilization of prostaglandin F₂α enabled the shortening of the length of the estrous cycle without any effect on ovarian response in inhibin-immunized cows.

Key Words : inhibin immunization, booster injection, prostaglandin F₂α, ovarian activity, cow

* National Agricultural Research Center for Tohoku Region, National Agriculture and Bio-oriented Research Organization

** National Agricultural Research Center for Western Region, National Agriculture and Bio-oriented Research Organization

*** National Institute of Livestock and Grassland Science, National Agriculture and Bio-oriented Research Organization

**** Department of Zootechnical Science, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture