

プロゲステロン投与量の違いが非繁殖期のヒツジの 発情発現および繁殖成績に及ぼす影響

吉永龍起¹・尾関有一¹・伊藤康司²・喜屋武玲子²
倉島留二郎³・庄村 茂³・小平律子¹・木村 建¹

¹ 信州大学大学院工学系研究科, ² 繊維学部応用生物科学科, ³ 繊維学部附属農場

1 序 論

ヒツジは他の多くの家畜と異なる季節繁殖動物である。北半球では通常秋から冬にかけて発情期を迎えて交配し、約150日後の春に出産する。非繁殖期においてもヒツジの卵巣内では卵胞の発育退化が常時行われており、この時期に発情ならびに排卵を人為的に誘起し、1年2産を可能とする季節外繁殖の試みが古くから行われてきた(1, 2, 3)。季節外繁殖の方法は、人為的に日照時間を調節して短日刺激によって発情・排卵を誘起する方法と、ホルモンを投与して発情・排卵を誘起する方法の2種に大別できる。前者は光を調節するための施設が必要であり、また処理期間が長期に渡るため実用的ではないが、後者は特別な施設を必要とせず、処理も短期間で済むので一般的に用いられている。

ホルモン投与により季節外に発情を誘起し、分娩させるには、黄体ホルモン(物質)による前処理に引き続き、妊馬血清性腺刺激ホルモン(eCG)を投与する方法が一般的に用いられている。プロゲステロン(P₄)は哺乳類の黄体で合成され、雌の繁殖周期で性腺刺激ホルモンの分泌、子宮での卵着床への準備、妊娠の維持などに重要な役割を担っている。しかし、ホルモン投与による季節外繁殖の際の前処理に用いられるP₄は、発情誘起には直接は関与しないものの妊娠の成立には必須であり、性腺刺激ホルモン投与から発情発現までの時間の短縮化、妊娠維持などに関与するとされているが、その働きはまだ明らかにされていない(4)。牛では人工受精に先立って投与するP₄の量が、その後の受胎率に影響を与えるとされている(5)が、ヒツジの非繁殖期に用いるプロゲステロン量に関する知見は少ない。そこで、P₄の投与量を変えることが非繁殖期のヒツジの発情発現と分娩成績に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

試験には、信州大学繊維学部附属大室農場に飼育中のサフォーク種7頭および同系雑種7頭の合計14頭の成雌ヒツジとサフォーク種の成雄ヒツジ2頭を用いた。

ホルモン処理は、6月17日から6月27日の間に行った。医療用シリコン(MDX4-4210 Medical Grade Erastomer, Dow Corning Co.)にプロゲステロン(和光純薬工業株式会社)粉末約190mgおよび約370mgをそれぞれ混入し、外径55.0mm、内径39.0mm、断面8.0mm平方、重さ約10gのPRID(progesterone-releasing intravaginal device)を作成した。また、同形のP₄を含まないもの(0mg)も作成した。

作成したPRIDを10日間供試ヒツジの膣内に挿入し、PRID除去の直後にeCG(セトロピン、帝國臓器株式会社)750国際単位を1回だけ筋肉注射した。交配は、雄ヒツジの腹部に付けたクレヨンの雌ヒツジの臀部への付着を1日1回観察することで確認した。

平均発情開始時間は、クレヨンの観察された時刻と、その前の観察時刻の平均の時刻をeCG投与後の発情開始時間として求めた。

血漿中のP₄濃度を測定するために、ホルモン処理開始の2日前より30日後まで毎朝定時に頸部の大静脈よりヘパリンナトリウムを含むベノジェクト真空採血管(VT-100H, テルモ株式会社)を用いて採血した。採血後直ちに氷冷し遠心分離により血漿を分離し、血漿は測定まで-20°Cで凍結保存した。

血漿中のP₄濃度は、RIA法で測定した。常法により石油エーテルで抽出し、抗プロゲステロン抗体(UCB-Bioproducts S.A.)、標準プロゲステロン(和光純薬工業株式会社)、³Hプロゲステロン(TRK 641, Amersham)、二次抗体(UCB-Bio-

products S.A.) を用い、液体シンチレーションカウンター (LSC-1000, Aloka) で測定した。アッセイ間変動は11%であった。

実験結果は Mann-Whitney の U test を用いて検定した。

結 果

低濃度 (190mg区) および高濃度 (370mg区) の P_4 を投与した群では、血漿中 P_4 濃度は、PRID 挿入1日後にそれぞれ $2.5 \pm 0.5 \text{ ng/ml}$ と $4.2 \pm 0.8 \text{ ng/ml}$ を示し、その後徐々に減少し、PRID 除去直後の両区の濃度はどちらも P_4 を投与しなかった群 (0mg区) と同様のレベルまで下がった (図-1)。

供試ヒツジ総てが発情し交配し、eCG 投与の4日後もしくは7日後に血漿中 P_4 濃度が上昇し、供試個体総てに排卵および黄体形成が起こったことが推測されが、 P_4 を含有しない PRID を用いた群と低濃度の P_4 を投与した群では分娩した個体はなかった。高濃度の P_4 を投与した群では5頭中2頭が分娩し、分娩率は40.0%で、産子頭数は3頭であった (表-1)。

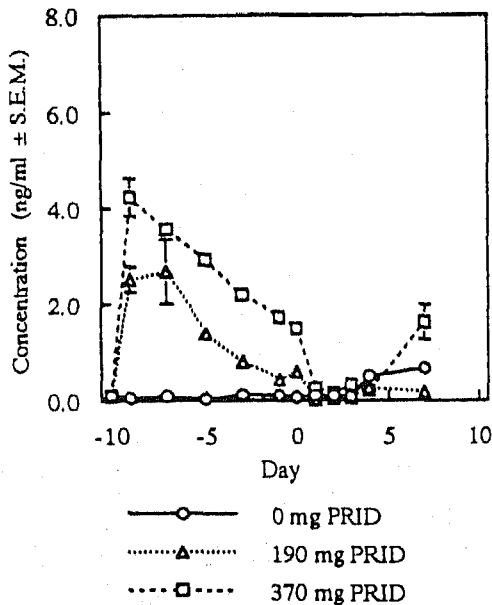


図1. 各群のヒツジの血漿中プロゲステロン濃度の変動

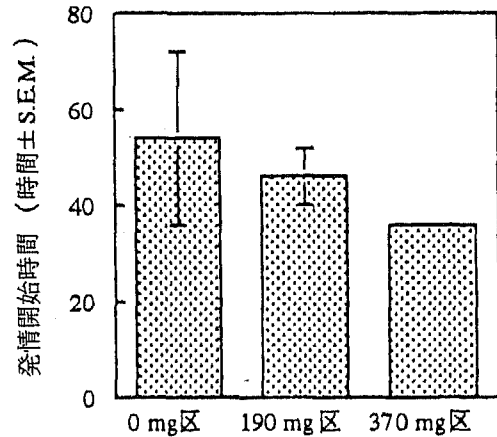


図2. 生殖腺刺激ホルモン投与後からの平均発情開始時間

た (表-1)。

高濃度の P_4 を投与した群では PRID 除去の平均36時間後に発情を開始し、低濃度の P_4 を投与した群では PRID 除去の46時間後に発情を開始した。発情開始が最も遅かったのは P_4 前処理をしていない群で、PRID 除去の54時間後であった (図-2)。平均発情開始時間は、 P_4 の投与量の増加と共に短くなる傾向があったが、有意な差は認められなかった。また、交配が確認された時刻は、 P_4 投与量が多いほど集中した。

なお、試験に用いた PRID からの P_4 浸出量は、190mgおよび370mg含有 PRID で、それぞれ、単位体重1日当たり $0.18 \pm 0.01 \text{ mg}$ 、 $0.30 \pm 0.05 \text{ mg}$ であった。

考 察

今回の実験では高濃度の P_4 を投与した群の血中 P_4 濃度は、低濃度の P_4 を投与した群のそれよりも高く保たれ、異なる血中 P_4 濃度を維持する目的は達成された。しかし、PRID 挿入中も血中 P_4 濃度は徐々に低下し、実験期間中血中 P_4 濃度を一定の値に保つことは出来なかった (図1)。 P_4 は脳下垂体での FSH の合成と分泌を減少させ(6)、更に LH の mRNA の安定度を低下させる事によって(7)、LH パルスの頻度を減少させ(8)、繁殖周期を制御し

表-1. PRID のプロゲステロン含有量と発情発現および繁殖成績

Prog 含有量	PRID 挿入頭数	交配 頭数	分娩 頭数	産子数	平均発情 開始時間	初回交配確認時間				
						0	24	48	72	96
0 mg	4	4	0	0	54	0	1	1	0	2
190 mg	5	5	0	0	46	0	0	3	2	0
370 mg	5	5	2	3	36	0	0	5	0	0

ていると考えられている。今回の試験において、高濃度の P_4 を投与した群、低濃度の P_4 を投与した群および P_4 を投与しなかった群の平均発情開始時間はそれぞれ36時間、46時間および54時間であり、 P_4 投与量が多いほど発情発現が早くなる傾向があった。このことは、 P_4 の前処理は発情開始時間を短くするとするRobinson(9)の結果と一致する。Fabre-NysとMartin(4)は、排卵前の P_4 の主要な役割は、発情の発現と排卵を密接に同期化させることだと述べている。彼らは卵巢を除去した雌ヒツジに10mgの P_4 を筋肉注射したが、24時間後の血中 P_4 濃度には個体間に多くのばらつきがあり、高いものでは5 ng/mlであったと報告している。ヒツジの黄体期の P_4 濃度は、品種や時期により異なるが2.5~5 ng/mlである。また、Fabre-NysとMartinは経膈法で P_4 を投与した実験では、 P_4 濃度は投与デバイス除去後1時間でも急速に減少したとしている。今回の試験で、PRID除去の24時間後には投与前と同程度にまで P_4 濃度は減少していた。血漿中 P_4 濃度の減少に個体間差がなければ、誘起発情の開始時間に影響を及ぼすと考えられるが、これを確認するにはさらに細かい発情発現の観察と経時的な血中 P_4 濃度の変動を調べる必要がある。

P_4 投与量は発情発現率には全く影響を与えず、 P_4 処理を行っていない群でも性腺刺激ホルモンの投与により、交配が確認された。また、分娩率は P_4 投与量が多いほど高くなる傾向があり、 P_4 の投与は妊娠の成立に深く関わっていることが再確認された。すべての供試個体でeCG投与4~7日後に血漿中 P_4 濃度の上昇が見られ、排卵および黄体形成が推測されるものの分娩率は低かった。これは発情誘起時に交配し、受精したとしても、その後の妊娠の成立に問題があると考えられる。ウシにおいては発情を同期化する際に P_4 前投与量が少ないと、正常時には退化してしまいう予定の卵胞が長い期間存在することによって、エストラジオールの濃度が上昇し、卵子の成長、子宮内の配偶子の移動や初期胚の発生に影響を与える結果分娩率が低下すると考えられている(5)。

P_4 は、排卵前はエストラジオールの働きを阻害することで発情の開始を調節しており、濃度が下がってその阻害効果をなくすと逆の作用を現しエストラジオールに対する反応性および雄許容度を増加させることが知られている(4)。これらのことから、発情発現の調節とその後の妊娠の成立の両方に最適な P_4 濃度が存在すると考えられ、最適な P_4 量を投

与することにより季節外繁殖の分娩率の低さを克服できる可能性がある。今回の実験においてはPRID挿入中も血漿中 P_4 濃度は徐々に低下し、一定の値以上の濃度を維持することができなかった。 P_4 の機能を解析するには、実験期間中一定の濃度を維持することができる投与方法を用いることが必要であると考えられ、今後は投与方法を改良し実験を試みたい。

要 約

非繁殖期のヒツジに異なる濃度のプロゲステロン(P_4)を含むPRIDを用いて10日間 P_4 を投与した後、生殖腺刺激ホルモン(eCG)を投与して発情を誘起し、 P_4 量が発情発現と分娩率に与える影響を調べた。eCG投与後96時間以内に、供試した個体全てが発情し交配した。eCG投与から発情発現までの時間は、 P_4 投与量が多くなるほど短縮され、発情発現が同調する傾向が見られた。また、高濃度(370mg)の P_4 を含有するPRIDを使用した群では分娩が確認されたが、低濃度(190mg)の P_4 を含有するPRIDを使用した群と、 P_4 を含まないPRIDを用いた群では、交尾後の血漿中 P_4 濃度の測定により排卵が確認されたが分娩は認められず、前処理に用いる P_4 が受精以降の胚発生の進行に影響を及ぼすことが示唆されると共に、前処理に用いる P_4 量の適正值を知ることにより、季節外繁殖の効率を上げることが可能であると推測された。

引用文献

1. DUTT, R. H. (1953). *J. Anim. Sci.* 12, 515. Induction of estrous and ovulation in anestrus ewes by use of progesterone and pregnant mare serum
2. ROBINSON, T. J. (1953). *J. Endocrine* 10, 117. The production of consistent oestrus and ovulation in the anestrus ewe with progesterone and pregnant mare serum
3. GORDON, I. (1958). *J. Agr. Sci.* 50, 152. The use of progesterone and serum gonadotrophin (P.M.S.) in the control of fertility in sheep 2. Studies in the extra-saesonal production in lambs
4. FABRE-NYS, C, and MARTIN, GB. (1991). *J. Endocrinol.* 130, 367-379. Roles of progesterone and oestradiol in determining the temporal sequence and quantitative expression of sexual receptivity and the preovulatory LH surge in the ewe.
5. WHERMAN, ME, ROBERSON, MS, CUPP, AS, KOJIMA,

- FN, STUMPF, TT, WERTH, LA, WOLFE, MW, KITOK, RJ & KINDER, JE (1993). *Biol. Reprod.* **49**, 214-220. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrous decreases endogenous 17β -Estradiol and Increase conception in cows.
6. PHILLIPS, CL, LIN LW, WU JC, GUZMAN K, MILSTED A, & MILLER WL. (1988) *Mol. Endocrinol.* **2**, 641-649. 17β -Estradiol and progesterone inhibit transcription of the genes encoding the subunits of ovine follicle-stimulating hormone.
7. WU, JC & MILLER WL. (1991) *Biol. Reprod.* **45**, 215-220. Progesterone shortens polyA tails of the mRNAs for alpha and beta subunits of ovine lutenizing hormone.
8. GOODMAN, RL & KARSCH, FJ. (1980) *Endocrinol.* **107**. 1286-1290. Pulsatile secretion of lutenizing hormone differential suppretion by ovarian steroids.
9. ROBINSON, T. J. (1954). *Endocrinol.* **55**, 403-408. Necessity for progesterone with estrogen for the induction of recurrent estrous in the ovariectmized ewe.
-