

受胎率向上を目指したホルモン剤によるウシ子宮機能制御

松井基純

帯広畜産大学 臨床獣医学研究部門 獣医臨床繁殖学研究室
(〒080-8555 帯広市稲田町西2線11)

[はじめに]

牛群における生産性の維持、向上にとって、良好な繁殖成績は不可欠なものである。しかしながら、乳牛における人工授精による受胎率の低下が問題となっており、その改善に向けて、これまで、様々な取り組みや研究が行われている。発情発見や適期授精、凍結精液の取り扱いや授精方法の再確認など人工授精技術に関わる要因、栄養状態や環境など飼養管理に関わる要因、卵巣あるいは子宮の疾患などの繁殖障害の診断と治療などについて、臨床現場での調査研究および改善が試みられている。その中でも、ホルモン剤を利用した卵巣機能の人為的制御によって、授精機会を増やし、適期授精を行うことで繁殖成績の改善を目指す研究が盛んに行われ、一定の効果をもたらしている [9, 12]。しかし、これらの対策がとられているにも関わらず、人工授精における受胎率は低下し続けているのが現状である。

これまで、受胎率や繁殖成績改善のために、卵巣機能の人為的制御法が多く開発されてきた。しかし、妊娠の成立には、卵巣だけでなく子宮の機能も正常であることが不可欠である。近年、胚の成長および妊娠認識における子宮の生理機能が明らかにされつつあり、それとともに、従来から実施されてきたホルモン処置が子宮機能に及ぼす影響、子宮機能改善を目指した新たな処置法の開発が行われ始めている。

本稿では、妊娠成立における子宮の生理機能について概説するとともに、それらの機能を人為的に制御することで受胎を促進させる可能性について述べる。

[妊娠成立へ向けての子宮の役割]

①着床前の胚の成長

ウシでは、発情後に排卵された卵子は、卵管膨大部/狭部移行部で精子と出会い受精が起こる。その後、細胞分裂(卵割)を繰り返しながら、卵管を子宮へ向けて下降する。受精卵は、排卵後4から5日目頃に子宮内へ到達し、その時点では、桑実胚あるいは胚盤胞と呼ばれる発育ステージに達している。胚盤胞は、将来、胎盤などに分化する栄養膜細胞と胎子に分化する内細胞塊とに分化しており、排卵後8から9日目頃には、受精卵を取り囲んでいた透明帯から脱出する。脱出した胚盤胞は、細胞分裂を繰り返しながら、子宮内で伸長し、排卵後20日目頃には、子宮内膜に接着し、その後、着床する[21]。

②黄体ホルモンが子宮機能および胚の発育に及ぼす影響

胚の発育の場である子宮の機能に対し、黄体ホルモン(プロゲステロン; P4)が重要な役割を持つことは、古くから知られている。一般に、P4は、子宮平滑筋の運動抑制、子宮腺の発達および子宮乳と呼ばれる胚への栄養成分の分泌促進、子宮内での胚に対する免疫細胞反応の制御などに関与し、妊娠の成立および維持に働いている[18]。

血中におけるP4濃度は、排卵後3日目頃には、機能的黄体が存在する指標となる1ng/mlを超え、その後、時間の経過とともに上昇する。およそ排卵後10から12日目頃に、黄体期中のピーク濃度に達し、黄体退行が起こるまで維持される。ピーク濃度は、一般に4ng/ml以上で

あるが、個体差が非常に大きい。近年の乳牛では、遺伝的改良による高泌乳化の結果、飼料摂取量の増加に伴う肝臓での代謝機能亢進により、卵巣から分泌される性ステロイドホルモンも肝臓で代謝不活化されるため、黄体期にも関わらず血中 P4 濃度の低い個体の存在することが知られている [16]。

人工授精後の血中 P4 濃度と受胎率との関係を調べた研究では、受胎牛は不受胎牛に比べ、授精後 5 日目頃から、P4 濃度が高く推移していることが報告されている [20]。また、過剰排卵処置により複数の黄体を有し血中 P4 濃度が高い受胎牛へ移植された胚が大きく成長することも知られている [11] に、排卵後に血中 P4 濃度の高い個体と低い個体では、子宮内膜における遺伝子発現が異なり、血中 P4 濃度の低い個体に比べ高い個体では、一部の遺伝子発現のタイミングが早まっていることも報告されている [4, 5] から、排卵後に速やかに血中 P4 濃度が上昇することが、胚発育を支える子宮機能の発現に不可欠であることが示唆される。つまり、高泌乳牛における血中 P4 濃度の低下は、子宮機能に作用し、胚の発育を妨げている可能性が高いと考えられる。

③妊娠認識と黄体維持における子宮の機能

ウシでは、妊娠が成立しない場合、発情後 16 から 18 日頃より黄体の退行が始まる。黄体の退行は、子宮内膜から分泌される PGF2 α によって誘導される。子宮からの PGF2 α 分泌は、黄体から分泌されるオキシトシンが子宮内膜に発現したオキシトシン受容体に作用することで促される。一方、黄体からのオキシトシン分泌は、PGF2 α 刺激により増加する。つまり、黄体退行時には、子宮と黄体間で、相互に黄体退行関連因子を増強しながら黄体退行過程は進んでいる [22] 場では、外部から PGF2 α を投与することで、これらの黄体退行機構を誘導することができるため、発情誘起を目的として PGF2 α 製剤の注射投与による黄体退行誘起はよく行われている。

妊娠の成立、維持には、黄体が退行することなく存続することが不可欠である。着床前の胚は、ある種のサイトカインを産生、分泌しており、これは母体に対して胚の存在を知らせるシ

グナルと考えられている。ウシでは、胚の栄養幕細胞から産生、分泌されるインターフェロントウ (IFN- τ) と呼ばれるタンパク質が妊娠認識因子として知られている [21]。IFN- τ は子宮内膜上皮上のエストロゲン受容体やオキシトシン受容体の発現を制御することで、子宮からの PGF2 α の分泌を抑制し、その結果、黄体退行は起こらず、黄体の形態や機能が維持される [22] (図 1)。

興味深いことに、排卵後 5 日頃までの形成期にある黄体は、PGF2 α 投与による黄体退行を引き起こすことができない。この現象が起こる理由は完全には解明されていないが、子宮からの PGF2 α の分泌に必要なオキシトシン受容体の発現やその反応性には、子宮がおおよそ 10-14 日間以上 P4 に暴露される必要があることなどが示唆されている [19]。また、妊娠していない場合に黄体退行の開始 (発情後 16 から 18 日頃) に先立って、卵巣内に共存する卵胞から分泌されるエストロゲンが、子宮におけるオキシトシン受容体発現を促すことで、子宮からの PGF2 α 分泌の準備がなされていると考えられている [2]。このように、黄体退行メカニズムにおける子宮機能の発現には、卵巣からの性ステロイドホルモン、つまり黄体および卵胞が相互に作用していることが明らかになっている。

【ホルモン処置による受胎率向上の試み】

①性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) やヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) の利用
排卵後に形成される黄体から分泌される P4 は、子宮に作用して胚の発育に適した環境を作り出している。したがって、授精後に機能の十

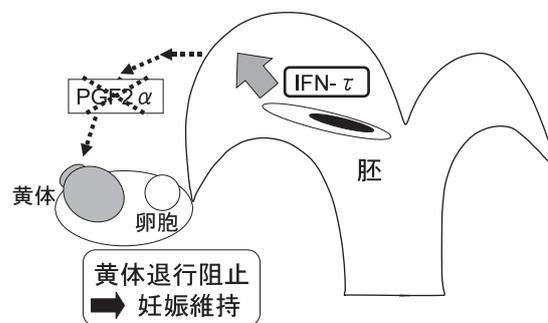


図 1 胚認識と黄体の維持

初期胚からのシグナル (インターフェロントウ) を受けて、母体は胚の存在を認識し、子宮からの黄体退行因子 (PGF2 α) の分泌が抑制される

分な黄体が形成され、血中 P4 濃度が速やかに上昇することが胚の発育をサポートすると考えられる。

このような授精後の速やかな血中 P4 濃度の上昇を引き起こすことを目的に、排卵後に成長を開始する小卵胞群（第 1 卵胞波）から発育した主席卵胞に対し排卵誘起処置を行い、新たな黄体を形成させる方法が臨床現場で行われている。排卵は、黄体形成ホルモン（LH）が一過性に大量放出される LH サージに、大型卵胞が曝されておこる。そのため、排卵誘起処置には、LH サージを誘導する GnRH 製剤あるいは LH 作用を有する hCG 製剤が利用されている。

多くの研究で、発情後 5 から 7 日目までに hCG 製剤（1000 から 3000 単位）あるいは GnRH 製剤（100 μ g）が投与されており、非常に効率良く排卵が誘起されることが報告され、さらに、その後、血中 P4 濃度が上昇することも明らかにされている [17]。人工授精後 5 から 7 日目頃に hCG 製剤あるいは GnRH 製剤による排卵誘起処置を行った場合、受胎率の改善がみられる報告があることから、新規に形成される黄体から分泌される P4 が、子宮の機能に作用し胚の発育を促していると考えられる。

授精後 5 から 7 日目頃の排卵誘起処置については、新規黄体の形成を誘起し、血中 P4 濃度を上昇させていることによる受胎率改善だけでなく、卵胞発育動態を変化させることによって受胎性を改善している可能性もある。前述のように、黄体退行の主要な因子である子宮からの PGF2 α 分泌に必要な子宮におけるオキシトシン受容体発現は、卵胞から分泌されるエストロゲンによって促されている。ウシは発情周期中に 2 あるいは 3 回の小卵胞群の発育（卵胞波）が存在し、第 2 卵胞は発情後およそ 10 日前後に発育を開始する。発情周期の 9 日目から 15 日目まで卵胞を吸引除去した場合、黄体退行が遅延することや、発情周期の 13 および 15 日目にエストロゲンを投与することで、黄体退行を誘起できることが示され、第 2 卵胞波における主席卵胞からのエストロゲンが黄体退行に必要な因子であると考えられている [2]。ウシでは、発情周期中に排卵誘起処置を行った場合、排卵後約 1 日半後に新しい卵胞波が発育を開始することが知られている。つまり、受胎率向上

を目指した授精後 5 から 7 日目頃の排卵誘起処置では、発情周期の 6 から 8 日目頃に第 2 卵胞波が発現していると考えられる。この卵胞波発育開始の時期のずれが、主席卵胞からのエストロゲン分泌のタイミングを変化させ、その結果、胚の認識時期に黄体退行の起こりにくい状態を作り出している可能性がある。受胎率向上を目指して授精後 11 日目に排卵誘起処置を行い、受胎率を改善させた報告もあり、これも、第 2 卵胞波の主席卵胞を早期に排卵させることで、卵胞からのエストロゲンに起因する黄体退行を阻止していると考えられる [25]。

② 腔内留置型 P4 製剤の利用

卵巣機能異常による繁殖障害の治療や人工授精プログラムにおける人為的卵巣機能調整を目的に、腔内留置型 P4 製剤が利用されている。この製剤は、シリコン基材などに P4 を含有させたデバイスを腔内に留置することで、徐放された P4 が腔粘膜より吸収され、血中 P4 濃度を上昇させる薬剤であり、国内各社より販売されている（イージーブリード、シダー 1900、オバプロン V、プリッドテイゾーなど）。これらの製剤を腔内に挿入、留置することで、機能的黄体が卵巣に存在する場合の血中 P4 濃度（1ng/ml）以上の血中濃度を、1 - 2 週間以上維持することができる。

近年、受胎率向上を目的に、この腔内留置型 P4 製剤を人工授精後に処置する試みが行われている。授精後の腔内留置型 P4 製剤処置が胚の発育に及ぼす影響を調べた研究では、人工授精後 5 日目から 9 日目まで腔内留置型 P4 製剤を処置した場合、胚の成長が促され、胚からの IFN- τ 分泌も増加することが示されている [13]。一方、人工授精後 12 日目から 16 日目までの処置では、そのような胚発育促進効果は見られなかった。このことは、授精後早期の腔内留置型 P4 製剤処置が、黄体形成期における血中 P4 濃度の速やかな上昇を補助し、その結果、胚発育を促進することで受胎率を向上させる可能性を示すものである。

人工授精後早期の腔内留置型 P4 製剤処置が受胎率に及ぼす影響について、いくつかの研究がこれまで行われており、その影響については、受胎率を向上させるという報告 [14] と明確な

影響をもたらさないという報告 [23, 24] の両方がみられる。妊娠成立には多くの要因が関与しているため、受胎率を評価する場合には、処置をうける牛の状態や環境により、腔内留置型 P4 製剤処置の効果が明確化しないことも予想される。ボディコンディションスコア (BCS、外貌から牛の栄養状態を評価するスコア) の低い個体 [6] や初産あるいは 2 産目の泌乳牛 [10] に対して人工授精後早期の腔内留置型 P4 製剤を処置した場合に受胎率が改善されることなどが報告されている。筆者らも、泌乳牛に対し、人工授精後 5 日目から 19 日目まで、腔内留置型 P4 製剤処置を 2 週間行った際の受胎率を調べた。その結果、分娩から 150 日未満の時期に授精した個体に対して処置を行っても受胎率への影響は認められなかったものの、分娩後 150 日以上経過した個体への人工授精後の腔内留置型 P4 製剤は、有意に受胎率を増加させた (図 2)。このことから、人工授精後早期の腔内留置型 P4 製剤処置による受胎促進効果は、様々な要因の影響を受けることが推察される。今後、その要因を明らかにすることで、腔内留置型 P4 製剤処置の効果が発現しやすい個体や状況において処置を行うことが可能になると考えられる。

[薬剤投与による受胎率向上の試み]

これまで、人工授精での受胎率改善を目指した子宮機能の人為的制御については、上述のように卵巣機能を制御あるいは補填するようなホルモン処置法が開発されてきた。

近年、黄体退行時における子宮での PGF2 α

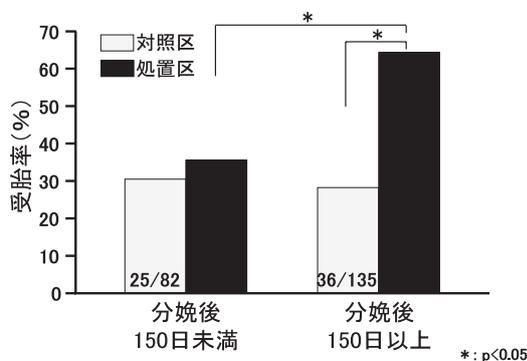


図 2 腔内留置型プロゲステロン製剤による受胎率改善

処置区は、人工授精後 5 日目から 19 日前まで CIDR を挿入棒グラフ内の数値は受胎牛 / 授精牛

分泌を薬理的に制御することで受胎率向上を目指す試みが行われている。現在、臨床現場における炎症治療薬として、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs: Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs) が利用されている。NSAIDs は、炎症関連物質であるプロスタグランジン類の合成に必要なシクロオキシゲナーゼ (Cox) 活性を阻害する薬剤である。このような NSAIDs を発情周期の 16 から 18 日目まで投与した場合、発情周期が延長することも示され [1]、NSAIDs による黄体退行阻害と受胎性向上が期待されている。胚認識および黄体退行開始時期である人工授精後 14 から 18 日目頃に、NSAIDs であるフルニキシメグルミンやメロキシカムを投与することで、受胎率を改善する試みが行われているが、その効果は一定ではない [3, 7, 8]。NSAIDs 投与により、血中の PGF2 α 代謝物の濃度が低下していることから、NSAIDs が子宮における PGF2 α 産生を抑制していると考えられる [15]。受胎率が改善されない理由としては、薬剤の連日投与によるストレスや、黄体の機能維持に必要なとされるプロスタグランジン E2 (PGE2) の産生も NSAIDs によって抑制されている可能性が挙げられている。

今後、妊娠認識時期の胚の活力、黄体の機能および子宮からの PGF2 α の分泌の関係を詳細に調べ、それらの関係に影響を与える要因を明らかにすることで、受胎促進効果をもたらす NSAIDs の適切な投与量や投与時期を決めることができるかもしれない。さらに、子宮からの PGF2 α 分泌のみを選択的に制御できるような薬剤が開発できれば、ウシの受胎率向上に大きく貢献するものと考えられる。

[おわりに]

これまで、卵巣機能の制御あるいは補填と目的としたホルモン処置により、子宮機能を改善、制御することで、ウシの受胎率向上を目指す試みが多く行われ、様々な有効な処置法が開発されてきた (図 3)。しかしながら、その効果は、必ずしも一定でないことから、処置法が受胎促進効果をもたらすのに適する条件が存在すると考えられる。ホルモン剤などの薬剤処置は費用のかかる行為であるため、経済活動である畜産においては、より確実に処置効果が現れる方法

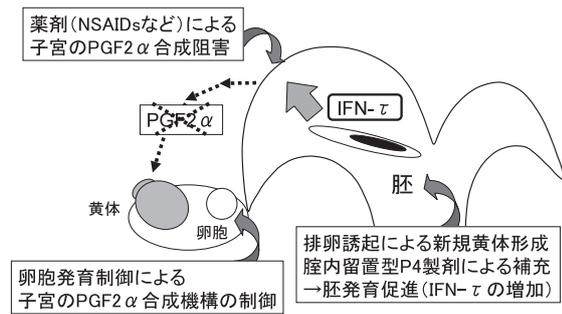


図3 受胎率向上への処置

が開発されなければならない。そのためには、受胎成立に向けて生体内で起こる生理現象とそれに影響を及ぼす要因を明らかにし、それらの情報を基に、状況に応じた処置法の選択方法を提示していくことが重要であると考えられる。

最後に、本稿で述べた様々な処置法は、受精卵がより良く発育し、受胎が成立するための子宮機能を制御する方法である。その前提には、健康な受精卵が子宮内に存在することが不可欠である。臨床現場での不受胎の原因には、卵巣機能異常による発情や排卵の異常、発情発見や適期授精が適切に行われていないことなどによる受精時の問題も大きく関与している。したがって、上述の様々な処置法を利用する際には、ウシの健康状態、発情発見技術および人工授精技術などに問題があれば、それらの改善と合わせて処置が実施されるべきである。

【引用文献】

1. Amiridis, G. S., Tsiligianni, T., Dovolou, E., Rekkas, C., Vouzaras, D., Menegatos, I. 2009. Combined administration of gonadotropin-releasing hormone, progesterone, and meloxicam is an effective treatment for the repeat-breeder cow. *Theriogenology*. 72: 542-548.
2. Araujo, R. R., Ginther, O. J., Ferreira, J. C., Palhão, M. M., Beg, M. A., Wiltbank, M. C. 2009. Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. *Biol. Reprod.* 81: 426-437
3. Erdem, H., Guzeloglu, A. 2010. Effect of meloxicam treatment during early pregnancy in Holstein heifers. *Reprod. Domest. Anim.* 45: 625-628.
4. Forde, N., Beltman, M. E., Duffy, G. B., Duffy, P., Mehta, J. P., O'Gaora, P., Roche, J. F., Lonergan, P., Crowe, M. A. 2011. Changes in the

endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biol. Reprod.* 84: 266-278.

5. Forde, N., Carter, F., Fair, T., Crowe, M. A., Evans, A. C., Spencer, T. E., Bazer, F. W., McBride, R., Boland, M. P., O'Gaora, P., Lonergan, P., Roche, J. F. 2009. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biol. Reprod.* 81: 784-794
6. Friedman, E., Roth, Z., Voet, H., Lavon, Y., Wolfenson, D. 2012. Progesterone supplementation postinsemination improves fertility of cooled dairy cows during the summer. *J. Dairy Sci.* 95: 3092-3099.
7. Geary, T. W., Ansotegui, R. P., MacNeil, M. D., Roberts, A. J., Waterman, R. C. 2010. Effects of flunixin meglumine on pregnancy establishment in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 88: 943-949.
8. Guzeloglu, A., Erdem, H., Saribay, M. K., Thatcher, W. W., Tekeli, T. 2007. Effect of the administration of flunixin meglumine on pregnancy rates in Holstein heifers. *Vet. Rec.* 160: 404-406.
9. Lamb, G. C., Dahlen, C. R., Larson, J. E., Marquezini, G., Stevenson, J. S. 2010. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 88(Suppl): E181-92.
10. Larson, S. F., Butler, W. R., Currie, W. B. 2007. Pregnancy rates in lactating dairy cattle following supplementation of progesterone after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 102: 172-179.
11. Lonergan, P., Woods, A., Fair, T., Carter, F., Rizos, D., Ward, F., Quinn, K., Evans, A. 2007. Effect of embryo source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 19: 861-868.
12. Macmillan, K. L. 2010. Recent advances in the synchronization of estrus and ovulation in dairy cows. *J. Reprod. Dev.* 56 Suppl: S42-47.
13. Mann, G. E., Fray, M. D., Lamming, G. E. 2006. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. *Vet. J.* 171: 500-503
14. Mann, G. E., Lamming, G. E. 1999. The Influence of Progesterone During Early Pregnan-

- cy in Cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 34: 269-274.
15. Merrill, M. L., Ansotegui, R. P., Burns, P. D., MacNeil, M. D., Geary, T. W. 2007. Effects of flunixin meglumine and transportation on establishment of pregnancy in beef cows. *J. Anim. Sci.* 85: 1547-1554.
 16. Sangsritavong, S., Combs, D. K., Sartori, R., Armentano, L. E., Wiltbank, M. C. 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85: 2831-2842.
 17. Schmitt, E. J., Diaz, T., Barros, C. M., de la Sota, R. L., Drost, M., Fredriksson, E. W., Staples, C. R., Thorner, R., Thatcher, W. W. 1996. Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. *J. Anim. Sci.* 74: 1074-1083.
 18. Senger, P. L. 2012. Reproductive Cyclicity – The Luteal Phase. In: *Pathways to Pregnancy and Parturition*, 3rd ed. (Senger PL. ed.), Current Conceptions, Inc., Oregon.
 19. Silvia, W. J., Lewis, G. S., McCracken, J. A., Thatcher, W. W., Wilson, L. Jr. 1991. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F2 alpha during luteolysis in ruminants. *Biol. Reprod.* 45: 655-663.
 20. Stronge, A. J., Sreenan, J. M., Diskin, M. G., Mee, J. F., Kenny, D. A., Morris, D. G. 2005. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology.* 64: 1212-1224.
 21. 高橋芳幸. 2012 交配・受精・着床. 獣医繁殖学 第4版 (中尾敏彦、津曲茂久、片桐成二編). 文永堂出版, 東京, pp.129-162.
 22. 津曲茂久. 2012. 妊娠と分娩. 獣医繁殖学 第4版 (中尾敏彦、津曲茂久、片桐成二編). 文永堂出版, 東京, pp.163-212.
 23. Van Cleeff, J., Drost, M., Thatcher, W. W. 1991. Effects of postinsemination progesterone supplementation on fertility and subsequent estrous responses of dairy heifers. *Theriogenology.* 36: 795-807.
 24. Villarroel, A., Martino, A., BonDurant, R. H., Déletang, F., Sisco, W. M. 2004. Effect of post-insemination supplementation with PRID on pregnancy in repeat-breeder Holstein cows. *Theriogenology.* 61: 1513-1520.
 25. Willard, S., Gandy, S., Bowers, S., Graves, K., Elias, A., Whisnant, C. 2003. The effects of GnRH administration postinsemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. *Theriogenology.* 59: 1799-1810.

Regulation of uterus function by hormonal treatment to improve fertility in cattle

Motozumi Matsui

Division of Preventive Medicine, Department of Applied Veterinary Medicine
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine
(Nishi-2-11, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan)