

周排卵期の卵胞発育動態が
黒毛和種雌牛の
受胎性に及ぼす影響に関する研究

2022年3月

岩手大学大学院

獣医学研究科

吉山 紬

目次

緒言	1
図表	7
第1章 共通する材料および方法	9
第2章 黒毛和種繁殖牛における受胎性に影響を与える要因の検討	14
2-1. 序論	14
2-2. 材料および方法	16
2-3. 結果	18
1)受胎率	18
2)受胎群と不受胎群の比較	18
3)第一卵胞波主席卵胞と黄体の位置関係(同側群と反対側群)の比較	19
2-4. 考察	19
2-5. 小括	24
図表	25
第3章 黒毛和種繁殖牛における第一卵胞波主席卵胞の選抜過程が受胎性に及ぼす影響	33
3-1. 序論	33
3-2. 試験1：第一卵胞波中のスイッチによる最大卵胞の位置変化による影響	35
1)材料および方法	35
2)結果	36
3-3. 試験2：第一卵胞波中のスイッチの発生による影響	37
1)材料および方法	37

2)結果	39
3-4. 考察	41
3-5. 小括	46
図表	47
第4章 総括	58
謝辞	65
参考文献	66

略語表

A ₄	: Androstenedione(アンドロステンジオン)
AI	: Artificial insemination(人工授精)
BCS	: Body condition score(ボディーコンディションスコア)
BFA	: Blood flow area(血流面積)
C	: Changing
CG	: Contralateral group
CL	: Corpus luteum(黄体)
E ₂	: Estradiol-17 β (エストラジオール)
EIA	: Enzyme immunoassay
FSH	: Follicle-stimulating hormone(卵胞刺激ホルモン)
GnRH	: Gonadotropin-releasing hormone(性腺刺激ホルモン放出ホルモン)
IG	: Ipsilateral group
IGF	: Insulin-like growth factor(インスリン用成長因子)
LF	: Largest follicle(最大卵胞)
LH	: Luteinizing hormone(黄体形成ホルモン)
NC	: Nom-changing
NSW	: Non-switching
P ₄	: Progesterone (プロジェステロン)
PF	: Pre-ovulatory follicle(排卵前卵胞)
PGF _{2α}	: Prostaglandin F _{2α} (プロスタグランジン F _{2α})
SF	: Subordinary follicle(次席卵胞)
SW	: Switching
TAI	: Timed-artificial insemination(定時人工授精)

W1DF : The first follicular wave dominant follicle(第一卵泡波主席卵泡)

緒言

ウシは古くから世界中で食用や農耕に用いられ、2019年の国際連合食糧農業機関(FAO)の統計では、世界で15億7400万頭が飼養されている。日本では、弥生時代から稲作が始まり、それとともに田畑を耕す際の貴重な労働力としてウシが重用された。明治時代以降、食肉文化の普及、定着に伴い、飼養頭数が増加し、2020年の農林水産省の統計によれば乳用牛135万2千頭(1万4400戸、93.9頭/戸)、肉用牛255万5千頭(4万3900戸、58.2頭/戸)が日本で飼養されている。独立行政法人 家畜改良センターによれば国内の黒毛和種の飼養頭数は173万8千頭(2021年8月時点)であり、肉用牛のうちの約70%を占めている。

農林水産省の畜産統計に基づいた農畜産業振興機構の資料によると、生産者の高齢化などにより離農が進んでいることから、肉用牛の飼養戸数は減少傾向にある。一方で肉用牛の飼養頭数は2016年までの7年連続で減少傾向であったが、以降は繁殖基盤の強化により、増加に転じて推移している[独立行政法人 農畜産業振興機構, 2021]。このことは一戸当たりの飼養頭数の増加を意味しており、肉用牛の飼養形態の変化が伺える。また黒毛和種子牛の取引頭数は2013年に35万頭ほどであったが、2016年からの5年間の取引頭数は平均約31万頭/年と減少している。2016年以降、肉用牛の飼養頭数が増加傾向であるにも関わらず、子牛の取引頭数が減少していることから、国内の黒毛和種子牛の生産性は低下しているといえる。さらに、家畜改良事業団の調査によると、1989年から2017年にかけて肉用牛の人工授精実施における受胎率は減少している[一般社団法人 家畜改良事業団, 2021]。

黒毛和種繁殖農家では、雌牛を妊娠、分娩させ、その子牛を子牛市場で販売する。肉用牛肥育農家では購入した肥育素牛を2年間飼育後出荷し、枝肉を販売することで収益を得ている。つまり、安定した肉の生産のためには、雌牛が妊娠、分娩することが必要であり、雌牛が効率よく妊娠、分娩を繰り返し、1年1産を実現することが経営上重要となる。ましてや全国的に農場の大規模化や子牛生産頭数の減少が起きている中で、効率的に子牛を生産させるために繁殖成績向上を目的とした技術開発が望まれている。

日本においては、1950年に家畜改良増殖法が制定され、人工授精(AI)普及の基礎が確立し、現在では牛の繁殖はほとんどすべてがAIによってなされている[筒井敏彦, 2009]。しかしながら、近年、日本のみならず世界各地でAI受胎率が年々低下し、経済的な損失に繋がっている[Lucy, 2001, Irikura et al., 2018]。受胎率低下の要因として発情徴候の微弱化、発情発現時間の短縮とそれに伴う発情発見率の低下[Dobson et al., 2008]、早期胚死滅の増加[Diskin and Morris, 2008]などが挙げられており、改善に向けた研究が精力的に行われている[Moore and Hasler, 2017]。

この状況に対して、発情が明瞭でない場合でもAIを実施することができる方法として、卵胞発育、黄体退行そして排卵を制御する定時人工授精(TAI)が導入され、繁殖成績の向上に貢献している[Colazo and Mapletoft, 2014]。受胎率の改善を目的としたさまざまな授精プログラム[Geary et al., 2001, Lamb et al., 2001, Colazo et al., 2003, Wiltbank et al., 2011]が開発される一方で、その前処置が煩雑である手法も見受けられる。そのため実際の運用に関しては大規模農場では有用であるが、国内の黒毛和種繁殖農場の約7割を占める小規模農場[独立行政法人 農畜産業振興機構, 2015]を複数個所にわたって実施するには課題が多い。また、授精プログラムは発情を示さない牛に対して、AI実施の前処置として行うものである。一方で、発情を示した牛についてAI実施後の卵巣動態から受胎性を評価する方法はあまり注目されていない。

また、黒毛和種は日本固有種を由来としており、日本の環境や気候に合わせて発達してきた。日本において1860年代から肉食文化が盛んになると、日本人の好みに合った高品質な肉質を求めて改良がすすめられ[Motoyama et al., 2016]、国内で独自の改良が行われて成立した品種である。さらには、ホルスタイン種が約10か月にもわたって泌乳を続けるのに対し、肉用牛は子牛の哺乳のために泌乳するのみであり、その期間は一般的に4か月ほどと短い[中央畜産会 日本飼養標準・肉用牛 2008年版]。このように、黒毛和種はその遺伝的背景や飼養管理方式が乳用種とは異なるために、他品種とは異なる繁殖特性を持つ可能性がある。しかしながら、肉用牛、特に黒毛和種の繁殖分野において、卵巣動態やホルモン動態などの繁殖生理を観察した研究は少ないため、臨床現場においては、ホルスタイン種を代表とする欧米原産の品種を用いた研究から得られ

た知見を応用する場合が多い。

黒毛和種の繁殖生理を理解することは、黒毛和種に適した繁殖技術の更なる発展のために重要である。そのためには、黒毛和種を用いた繁殖生理や妊娠成立に関わる要因について基礎的な調査や研究が必要となる。以上より、黒毛和種繁殖牛における繁殖生理を明らかにすることは国内の黒毛和種子牛生産の向上のために有益であると考えられる。

動物が繁殖可能な状態になることを性成熟といい、黒毛和種雌牛においては月齢で6から12カ月齢、体重で200から250 kgに達する頃におこる。一般的に黒毛和種の発情周期の長さは18から24日であり、平均21日とされている。発情周期は14から18日間の黄体期と4から6日間の卵胞期で構成される。黄体期は卵胞期の後に続く期間で黄体(CL)が形成される。一方で卵胞期は黄体退行後から排卵までの期間をいう。卵胞期では卵胞の成熟と排卵が起こり、卵子が卵管へ放出される[Forde et al., 2011]。

発情周期は視床下部から分泌される性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)、下垂体前葉から放出される卵胞刺激ホルモン(FSH)と黄体形成ホルモン(LH)、卵巣構造物(黄体や卵胞)から分泌されるプロゲステロン(P_4)、エストラジオール(E_2)そしてインヒビン、子宮内膜から分泌されるプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$)等により制御されている[Forde et al., 2011]。卵胞期では黄体退行により P_4 濃度が低く維持されている。排卵前卵胞(PF)による E_2 分泌の上昇によって、GnRHのサージ状分泌が引き起こされる。これに反応してFSHおよびLHサージが誘発される[Sunderland et al., 1994]。排卵した卵胞の顆粒層細胞および内卵胞膜細胞が黄体化することで黄体形成および P_4 分泌が開始され、黄体期中の高い P_4 濃度を維持する。発情周期の16日までに、胚から妊娠認識シグナルであるインターフェロン τ ($IFN\ \tau$)が分泌されなければ、子宮から $PGF_{2\alpha}$ が分泌され、CLは退行を開始し、これに伴い P_4 濃度も低下する[Forde et al., 2011]。このように卵胞の成熟、排卵、CLの形成、そして退行を繰り返すことで発情周期が営まれる。この発情周期中に、2または3回のゴナドトロピン依存性の卵胞発育が観察され[Savio et al., 1988]、これを卵胞波という。それぞれの卵胞波中には卵胞の出現、選抜そして主席性の獲得という一連の過程

があり、その後卵胞は閉鎖または排卵する [Forde et al., 2011]。

ウシにおいて発情周期中に発現する最初の卵胞波を第一卵胞波という。LH サージおよびその後の排卵に伴う血中 E_2 濃度の急減に伴ってそれまで抑制されていた FSH 分泌が回復し、排卵終了後の卵巣内で直径 3~4 mm 程の小卵胞 8 から 41 個が発育を開始する [Ginther et al., 1989, Ginther et al., 2000, Haughian et al., 2013]。小卵胞群の発育は卵胞からのインヒビリン分泌を促進し、その負のフィードバックによって FSH 分泌は抑制される [Gibbons et al., 1997, Ginther, 2016]。同時に E_2 濃度も上昇し、これも FSH 分泌を抑制する作用があり血中 FSH 濃度の低下に寄与する [Ginther et al., 2000]。また黄体退行後に GnRH を介してパルス状の LH 分泌が刺激され、血中 E_2 濃度が上昇する [Ginther et al., 2001, Haughian et al., 2013]。主席性を獲得しうる卵胞は次第に顆粒層細胞で LH 受容体の発現数を増やす [Ginther et al., 1989, Xu et al., 1995] ことで LH 依存性に発育する [Beg et al., 2001, Ginther et al., 2001]。一方で、その他の小卵胞は LH 依存性の発育に移行できず、また主席卵胞の分泌する E_2 により低濃度に維持された FSH によって、発育が停滞または中止する [Ginther, 2016]。これによりにその一群の卵胞の中で最大の卵胞が 1 つだけ選抜され、それ以外の小卵胞は閉鎖する [Ginther, 2016]。P₄ と LH 濃度や FSH サージに違いがあるにも関わらず、第一卵胞波と第二卵胞波において卵胞選抜の過程は類似している [Ginther et al., 2015, Ginther et al., 2016]。この選抜された卵胞を主席卵胞といい、第一卵胞波の主席卵胞を第一卵胞波主席卵胞(W1DF)という。W1DF は発情周期の 8~11 日頃まで発育するが、CL から P₄ が産生分泌されている時期に当たるため、排卵に至らず閉鎖する [Ginther, 2021]。このように W1DF は受精に直接関与するわけではない。

しかし、AI 後において第一卵胞波の期間は受胎にとって重要な時期である。排卵後に卵管内で卵子が受精すると、排卵後 4 日までに胚が子宮内に進入し、6 から 7 日までに胚盤胞を形成する [Forde and Lonergan, 2017]。これらの一連の出来事が第一卵胞波の期間に起こる (図 1)。また CL が存在する卵巣と同側の子宮角では反対側の子宮角に比べて P₄ 濃度が高いこと [Cerbito et al., 1994] や、PF の存在する卵巣と同側の子宮角では反対側に比べて E_2 濃度が高いこと

[Wijayagunawardane et al., 1998]が知られている。さらにウシでは、CLが形成されている側と同側の子宮角で着床、妊娠しやすいことが知られており[Sreenan and Mulvehill, 1975]、卵巣と子宮の機能は密接に関連していることが推測される。一方で、W1DFが同一卵巣内のCLや子宮角に与える影響について調査した研究は多くないものの、W1DFは第二卵胞波主席卵胞よりも、その大きさや血流面積および卵胞液中の血中 E_2 濃度が高く推移することが確認されている[Miura, 2019]。これらの知見から、第一卵胞波の時期に受胎性に関連する局所要因として、W1DFとCLの位置関係に着目した研究が行われ、ホルスタイン種で排卵後のW1DFとCLが同側の卵巣に存在するとき、受胎率が低下することが報告された[Miura et al., 2015]。この成績は第一卵胞波の時期の卵巣-子宮の局所的環境が受胎性に影響を与えていることを示唆しているが、W1DFとCLの位置関係が受胎性に及ぼす機序については明らかではなく、W1DFとCLとの位置関係がホルスタイン種と同様に、黒毛和種繁殖牛においても受胎性に影響しているかは明らかではない。

また多くの場合、第一卵胞波中の主席卵胞はその発育中、常に最大の直径を維持したまま主席性を獲得する[Ginther, 2018]。この時、2番目に大きい直径を示す卵胞の大きさが7.0 mmを超えているものをコンベンショナル型という。主席卵胞が常に最大の直径を維持したまま主席性を獲得したもののうち、2番前に大きい直径を示す卵胞が7.0 mmを超えない場合も存在する。この場合をアンダーサイズ型と呼ぶ。最も発生割合が低いのが、スイッチ型と呼ばれる発育過程である。スイッチ型では、卵胞波中で主席性を獲得するはずの最大直径を示す卵胞が、2番目に大きい直径を示す卵胞に、その大きさが越される。その結果、主席性を獲得できず、代わりに2番目に大きかった卵胞が主席性を獲得する[Ginther et al., 2016, Ginther, 2018, Ginther et al., 2018]。第一卵胞波中における発現割合は、コンベンショナル型が59%、アンダーサイズ型が15%、スイッチ型が18%、2つの主席卵胞を認めるものが8%との報告があり、コンベンショナル型が最も一般的な卵胞の発育過程であるといわれている[Ginther, 2018]。

W1DFとCLの位置関係による受胎性への影響が示唆されているのと同様に、第一卵胞波中の主席卵胞の発育過程はW1DFの性質や卵巣-子宮の局所的環境に変化をもたらし、その後の受胎

に影響を及ぼしている可能性がある。まずひとつに、スイッチの発生という一般的な発育とは異なる卵胞発育過程を引き起こす内分泌機構が受胎性に影響する可能性が考えられる。この場合にはスイッチが発生したか否かにより、受胎成績に影響がみられるものと考えられる。あるいはスイッチが発生することにより、第一卵胞波の期間に最大直径を示していた卵胞、2番目に大きい卵胞およびCLの位置関係に変化が起これることで、卵巢-子宮間の局所的なホルモン濃度に変化を起これる可能性も考えられる。この場合にはスイッチの発生の有無だけでなく、卵胞やCLの位置変化が発生したか否かにより、受胎成績に影響がみられるものと考えられる(図2)。しかしながら、第一卵胞波中に発生したスイッチに関連する要因が受胎性に与える影響は十分に検討されていない。

そこで本研究では黒毛和種繁殖牛において周排卵期における卵胞発育動態が受胎性に与える影響を調べるために、第一卵胞波中の卵巢動態の観察を行った。第1章では本研究において共通する実験方法を述べた。第2章では黒毛和種繁殖牛において受胎性に影響する要因を調査した。また、CLとW1DFの位置関係がもたらす内分泌的な変化と受胎性への影響について黒毛和種を用いて確認した。さらに第3章ではスイッチの発生に伴う内分泌的な変化と受胎性への影響を検討した。

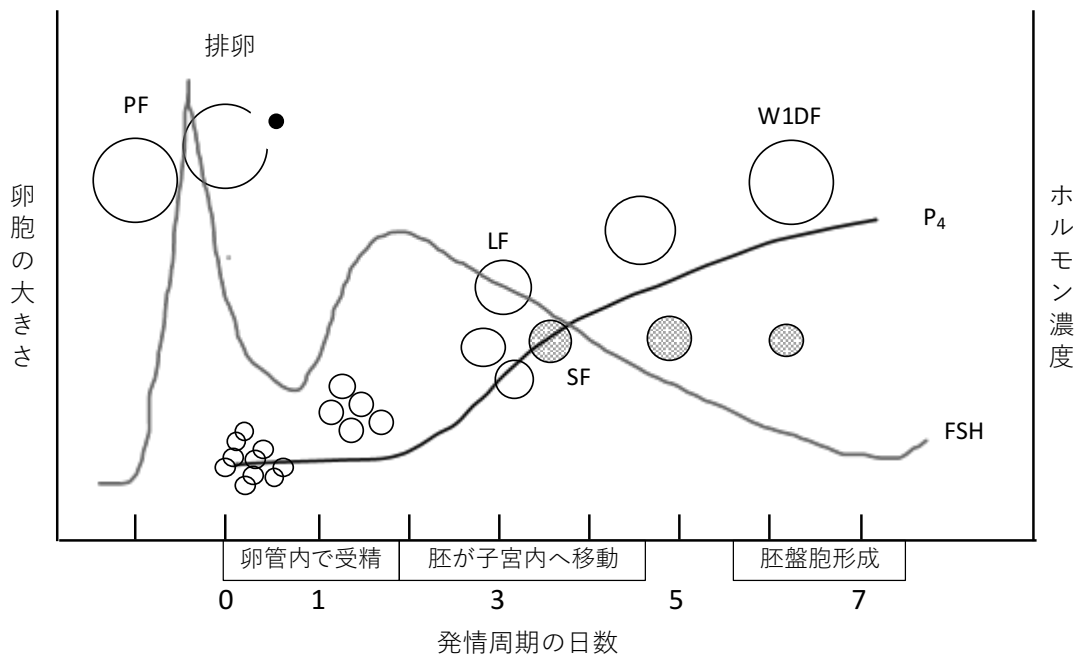


図1. 第一卵胞波中の卵胞発育とホルモン濃度の模式図

排卵前卵胞(PF)の排卵後、抑制されていたFSH分泌が回復し複数個の小卵胞が発育を開始する。複数の卵胞のうち最大卵胞(LF)は発育を続け第一卵胞波主席卵胞(W1DF)に発育する。2番目に大きい卵胞(SF)を含むその他の卵胞は発育が停滞し閉鎖する。この第一卵胞波の間に受精、胚の子宮内への移動および胚盤胞形成が起こる。

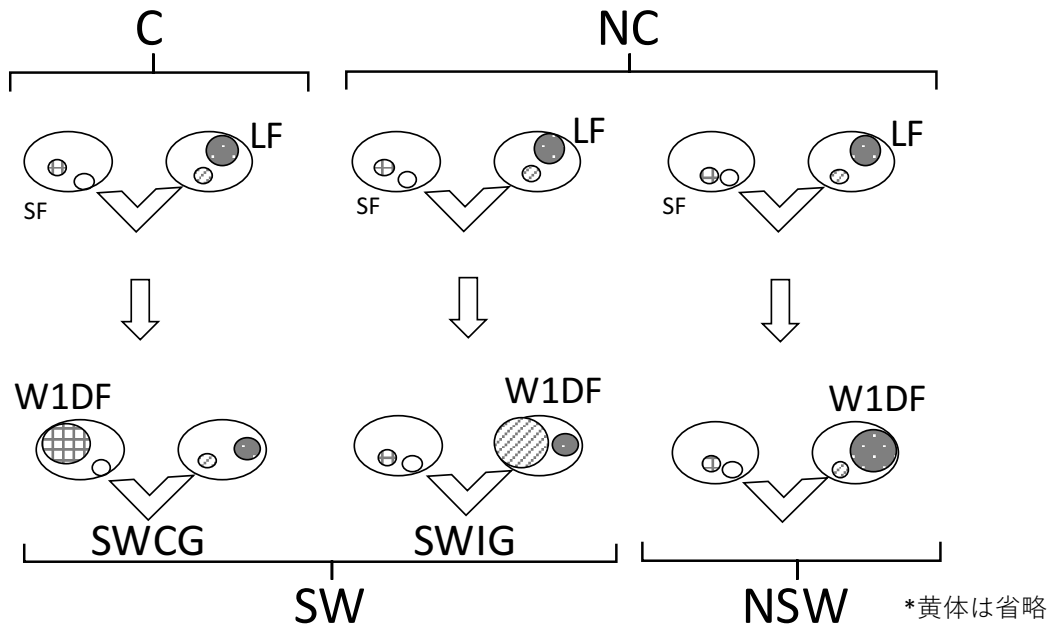


図2. スイッチの発生と卵胞の位置に着目した第一卵胞波中の主席卵胞の発育動態
 第一卵胞波の期間中に最大卵胞(LF)が第一卵胞波主席卵胞(W1DF)になる場合、スイッチの発生はなく(NSW)、LF(あるいはW1DF)の位置変化も発生しない(NC)。一方で、2番目に大きな卵胞(SF)がW1DFとなり、すなわちスイッチが発生した場合(SW)には2通りが存在する。一つ目はスイッチが同一卵巣内で発生した (SWIG)で、このとき位置変化は起こらない(NC)。二つ目はスイッチが反対卵巣に発生した場合で、このとき位置変化も発生する(C)。このようにスイッチの発生に伴い、様々な局所的な条件が変化する。

第1章 共通する材料および方法

実験方法

供試牛には発情観察によりスタンディングまたは発情粘液が確認された牛を使用した。すべての牛に凍結精液を用いてAIを行った。AI後24時間以内に超音波画像診断装置を用いて排卵を確認した(Day 1)。24時間以内に排卵が確認されなかった個体は再度AIを実施した。最終AI実施日をDay 0として、Day 0, 1, 3, 5, 7に超音波画像診断装置を用いて卵巣の観察を行った。

妊娠診断

AI後30日(Day 30)に、7.5MHz リニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置(Tringa linear, Esaote Medical, Maastricht, Netherlands)を用いて胎子の存在および心拍を指標として妊娠診断を行った。

卵巣の超音波検査

CLと卵胞の形態は、7.5MHz リニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置(Tringa linear)を用いてB-モードにより観察した。プローブを手指とともに直腸内に挿入し、左右両側卵巣の断層像を観察した。Day 0の時点で最大直径を示して存在し、かつDay 1に消失した卵胞をPFとした。発育中の卵胞は左右の卵巣について最大直径を示す卵胞をそれぞれ1つずつ観察した。2つの卵胞のうちでより大きい卵胞を最大卵胞(LF)、より小さい卵胞を次席卵胞(SF)とした。PF, LF, SFおよびCLの直径が最大になるように静止画を記録し、対象の卵巣内構造物の長径および短径を測定した。各卵巣内構造物の平均直径は長径と短径の平均とした。

黄体血流量の測定

黄体血流量は7.5MHzのリニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置(MyLabOne,

Esaoite SqA, Genoa, Italy)を用いて color-flow Doppler mapping mode により観察を行った。黄体血流の検査方法はプローブを手指とともに直腸内に挿入し、CL に直腸壁を介してプローブを密着させて断面像を観察した。黄体血流は黄体直径が最大になるような静止画を記録し、黄体血流面積 (BFA) を算出した。BFA は、記録した画像をパソコン内に取り込み、Image J(version 1.8.0_172 ; the U.S. National Institutes of Health (<http://imagej.nih.gov/ij/>), USA)を用いて算出した。

採血

Day 0 および Day3, 5, 7 において採血を行った。21G 採血針とヘパリン加真空採血管(ベノジェクト II 真空採血管, TERUMO, 東京, 日本)を用い、頸静脈より 10 ml の採血を行った。採血後直ちに氷冷し、3000 g, 15 分間遠心分離で得られた血漿は、ホルモン測定まで -30°C で凍結保存した。

血漿 P_4 濃度の測定

凍結保存された血漿を測定直前に室温にて融解し、酵素免疫測定法(EIA)により血漿中 P_4 濃度を測定した。予め、96 穴プレートに抗ウサギ IgG 抗体(Cappel, Cochranville, PA, USA)を吸着させることで、第二抗体固定相化プレートを作製した。具体的には、第二抗体とした抗ウサギ IgG 抗体を第二抗体希釈液(50mM 炭酸緩衝液(pH9.6))で、 $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、希釈した第二抗体液をプレートの各ウェルに $100 \mu\text{L}$ ずつ分注した。第二抗体をプレートに吸着させ固相化させるため、プレートをシールして、 4°C で 2 日間静置した。その後、各ウェルを $200 \mu\text{L}$ のブロッキング液(20 mM Tris-HCl(pH 7.2), 0.5%(w/v)牛血清アルブミン(BSA), 2%(w/v)デキストリン, 0.01%(w/v)チメロサル)を加えてウェル内の液を排液した。その後、ブロッキング液を $250 \mu\text{L}$ 再度ウェルに分注してプレートをシールして、使用するまで 4°C に保存することにより、第二抗体固相化プレートのブロッキングを行った。

血漿 P₄ 測定は、作成した第二抗体固相化プレートを使用し、血漿中 P₄ とホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識プロジェステロン(Cosmo Bio, FKA-301, 東京, 日本)を、抗 P₄ 抗体(ウサギ由来, Cosmo Bio)に競合的に結合させ、HRP の基質であるオルソフェニレジアミン(OPD, Wako, 大阪, 日本)が HRP の反応により 492 nm に吸収極大を持つ性質を利用して検出し、血漿 P₄ の定量を行った[Kanazawa et al., 2016]。具体的には、各ウェルを 250 μ の洗浄液(10 mM Tris-HCL(pH7.5), 0.15 M NaCl, 0.05%(v/v)Tween 20)で洗浄した。洗浄後の各ウェルに、予め、活性炭処理した牛血清で希釈した標準液(36, 12, 4.0, 1.33, 0.33 ng/mL)および血漿を各ウェルに 25 μ L ずつ分注した。尚、標準液の作製にはシグマ社から購入した P₄(SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA)を用いた。引き続き、さらに、アッセイバッファー(20 mM Tris, 0.15 M NaCl, 0.5% ウシ血清アルブミン, 0.01%チメロサル)で 80 万倍希釈した P₄ 抗体(ウサギ由来, FKB-302E, Cosmo Bio)100 μ L とアッセイバッファーで 16 万倍希釈した HRP 標識 P₄ 100 μ L を各ウェルに分注し、プレートをシールして、常温で 3 時間振盪インキュベートした。インキュベートした後、プレートを 5 回洗浄した。洗浄後、100 μ L の基質液(0.2 M クエン酸緩衝液(pH 4.5), 0.03%(v/v)H₂O₂, 0.05%(w/v)OPD)を各ウェルに分注し、暗所にて 30 分間インキュベートした。HRP による OPD の発色反応を停止させるために、3M の硫酸を 50 μ L ずつ各ウェルに加えた。1 分間の振盪インキュベートの後、マイクロプレートリーダー(BioRad, Hercules, USA)を用いて各ウェルの 492 nm の吸光度を測定した。

血漿 E₂ 濃度の測定

アッセイは、サンプルの抽出および脱脂に続いて、マイクロプレートを用いた EIA によって実施した。E₂ 抽出は、既存の報告[Patel et al., 1999]にわずかな変更を加えて以下のように行った。血漿サンプル(各 2.5 ml)を 5 ml のジエチルエーテル(和光純薬, 大阪, 日本)と 3 分間ボルテックス混合することにより抽出した。二相を分離し、水層をドライアイス冷エタノール槽に浸すことにより急速凍結した。有機層をシリコン処理したガラス試験管にデカントし、窒素ガス下、37°C

で蒸発させた。抽出は 2 回行った。乾燥したサンプルを脱脂のために 500 μ l のアセトニトリルに溶解した。脱脂は、以前の報告[永田俊一 et al., 1996]にわずかな変更を加えて以下のように行った。2 ml の n-ヘキサンをサンプルに加え、3 分間混合し、さらに 1 ml の n-ヘキサンを加え、n-ヘキサン層を吸引により除去した。脱脂操作は 3 回行った。残りのアセトニトリルを窒素ガス下 80°C で蒸発させた。乾燥したサンプルを、酵素免疫測定法のために 125 μ l のアッセイ緩衝液に溶解した。EIA は以下のように実施した。50 μ L のサンプルを抗 E₂ 抗体(Cosmo Bio, 東京, 日本)およびペルオキシダーゼ標識 E₂(Cosmo Bio)とともに、抗ウサギ IgG(Cappel, コ克蘭ビル, ペンシルベニア州, 米国)でプレコートされた 96 ウェルマイクロプレートでインキュベートした。15°C で 5 時間。さらに、プレートを洗浄し、クエン酸緩衝液に溶解したペルオキシダーゼの基質であるオルソフェニレンジアミンをウェルに分注し、プレートをさらに暗所で 45 分間インキュベートした。最後に、3 M 硫酸を加えて発色を停止させた。自動マイクロプレートリーダー(BioRad, Hercules, CA, USA)を使用して、各ウェルの吸光度(波長 492 nm)を測定した。アッセイ感度、アッセイ内およびアッセイ間の変動係数は、それぞれ 0.34 pg/ml, 6.00% および 11.86% だった。

血漿 FSH 濃度の測定

FSH 濃度の測定は既存の報告[El-Sheikh Ali et al., 2017]にわずかな変更を加えて、時間分解蛍光イムノアッセイにより行った(DELFI A, ParkinElmer)。凍結保存された血漿を測定直前に室温にて融解し、抗体固相化プレートの各ウェルに標準液(USDA, bFSH-I-2 ; 0.1, 0.316, 1.0, 3.16, 10 ng/mL)および血漿を 100 μ L ずつ分注した。引き続き 4 万倍希釈した抗体溶液(Anti-oFSH ; AFP528813)200 μ L を各ウェルに分注し、プレートをシールして 5 分間振盪した後、室温で一晩インキュベートした。インキュベートした後、プレートを 5 回洗浄した。洗浄後、Eu トレーサー希釈液(bFSH ; AFP9294C) 300 μ L を各ウェルに分注し、プレートをシールして 5 分間振盪したのち、室温で一晩インキュベートした。インキュベートした後、プレートを 6 回洗浄した。洗浄後、増強試薬(DELFI A Enhancement Solution ; ParkinElmer)200 μ L を各ウ

エルに分注し，プレートをシールして5分間振盪後，測定を行った。

第2章 黒毛和種繁殖牛における受胎性に影響を与える要因の検討

2-1. 序論

ウシの繁殖技術に関する研究は、とくに乳用種を用いて盛んに行われてきた[Moore and Hasler, 2017]。一方で黒毛和種繁殖牛に特化した報告は少なく、乳用種で得られた知見を応用しているのが一般的である。しかしながら、乳用種と黒毛和種とでは、繁殖特性が異なる可能性がある。その根拠として、一つ目は遺伝的背景が挙げられる。多くの乳用種が欧米原産の品種であるのに対し、黒毛和種は日本固有種を由来とする品種である[Motoyama et al., 2016]。二つ目は飼養管理方式が異なる点である。ホルスタイン種はその特徴的な泌乳により負のエネルギーバランスを経験するが、黒毛和種はホルスタイン種の10分の1の泌乳量であり両種の代謝状態は異なる[Shingu et al., 2002]。この違いは代謝ホルモンを介して繁殖に関連するホルモンに影響を及ぼす。たとえばインスリンやIGF-1は顆粒層細胞による E_2 産生[Gutierrez et al., 1997, Glistler et al., 2001, Armstrong et al., 2003, Butler et al., 2004]や卵胞細胞の増生[Spicer et al., 1993, Spicer and Stewart, 1996]を刺激する。黒毛和種と泌乳中のホルスタイン種の発情周期中の血中インスリン濃度を調べた研究では、両種の間には差が認められた[Kawashima et al., 2007]。このことから黒毛和種とホルスタイン種の間にもみられる代謝状態の差が繁殖機能にも違いをもたらす可能性が考えられる。そのため、黒毛和種繁殖牛の繁殖技術体系の確立には黒毛和種を用いた研究が必要である。

PFの大きさはAI時に確認することが可能であり、超音波画像診断装置が普及した現在では、臨床現場で測定することも可能である。しかしながら黒毛和種繁殖牛におけるPFの大きさに関する研究は多くない。ホルスタイン種においては、PFの大きさと受胎性について報告がなされているが、その関連性については統一の結果には至っていない。Colazoら[2015]は、ホルスタイン種を用いてTAIを行った研究において、PFの大きさと受胎成績には関連が無いと報告している。一方で、同じくホルスタイン種を用いたTAIを行った実験では直径1.6 cm程度が最も受胎が期待でき、授精時のPFの大きさには適した大きさがあるとした報告も見られる[Bello et al., 2006]。

またアンガス種との交雑種を用いた研究では、自然発情の場合は PF の大きさと受胎性に関連は認められないが、排卵誘起をした場合には 1.1 cm以下の時に受胎性が低下するとの報告もある [Perry et al., 2005]。黒毛和種についても PF の大きさは AI 実施時に確認することができる指標であり、PF の直径と受胎性の関連を明らかにすることは繁殖管理技術の確立に役立つことが期待される。

E_2 は発情周期を通して卵胞発育および子宮内膜の機能制御に関与しているが [Spencer et al., 2004, Ginther, 2016]、受胎性への関与についても研究されている。TAI において GnRH 投与により排卵誘起を行った場合に、発情徴候を示さない牛では受胎率が低下することが確認されている [Bridges et al., 2012, Whittier et al., 2013, Hill et al., 2014]。この原因としては E_2 濃度が不十分なため、子宮環境を精子の輸送や受精卵の生存に適するように整えられないことが要因であると考えられている [Perry and Perry, 2008, Perry and Perry, 2008]。 P_4 はすべての哺乳類において胚や胎子の生存および発育に欠かせないホルモンである。ウシにおいても黄体から十分量の P_4 が産生されることは、妊娠を成立・維持するために必要不可欠である [Spencer and Bazer, 2002, Pate, 2020]。 P_4 は子宮からのプロスタグランジン産生や子宮の機能を制御することで妊娠成立に寄与している [Pate, 2020]。

またホルスタイン種において AI 後の第一卵胞波中の W1DF と CL の位置関係が受胎性に影響を与えるとの報告がなされた [Miura et al., 2015]。ウシでは発情周期中に 2 つか 3 つの卵胞波が出現する。 [Ginther et al., 1989, Jaiswal et al., 2009]。第一卵胞波は発情後すぐに発現する、最初の卵胞波である。第一卵胞波中には CL の発育とともに複数の小卵胞が発育を開始し、一般的には一つの主席卵胞が選抜される。この W1DF は排卵することはないが [Ginther, 2021]、第二卵胞波主席卵胞に比べて卵胞直径、血中 E_2 濃度、卵胞壁の血流量、卵胞液中の E_2 およびアンドロステンジオン (A_4) 濃度が高いことが確認されており、第二卵胞波主席卵胞に比較して活性が高い [Miura, 2019]。また、CL が存在する卵巣と同側の子宮角の内膜中の P_4 濃度が高いこと [Cerbito et al., 1994]、PF が存在する卵巣と同側の卵管中の E_2 濃度が高いこと [Wijayagunawardane et al.,

1998]などから、局所での卵巣と子宮の密接な関連性が存在することが伺える。そのため、W1DFが分泌する E_2 が第一卵胞波中に子宮や卵管を介して受胎性に関与するのではないかと考えられた[Miura et al., 2015]。しかしながら、その機序の詳細は明らかになっておらず、受胎率向上のための生理学的知見として、その解明が求められている。さらには、黒毛和種繁殖雌牛において第一卵胞波中の卵巣構造物の位置関係が受胎性に与える影響についても明らかとなっていない。

また W1DF に関連する事項として卵胞の発育過程が挙げられる。一般的には第一卵胞波中に発育を開始した小卵胞のうち、LF が SF にその大きさを越されることなく W1DF となる。しかしながら 10~30%ほどの割合で LF が発育途中で SF にその大きさを越されて主席性を獲得せず、代わりに SF が W1DF となる場合がある。これをスイッチという。スイッチが発生する機序については詳細な研究が行われているが、受胎性への影響については明らかでない。またスイッチの発生には LF が同側卵巣内で発生する場合と反対側卵巣へ発生する場合の 2 通りが考えられる。本章では、より変化の大きい、スイッチの発生に伴い LF が第一卵胞波中に反対側卵巣に位置変化を起こす場合に着目した(図 2 ; C と NC)

そこで第 2 章では発情時および第一卵胞波中の卵巣構造物およびホルモン動態のうち受胎性に関連する要因の検討を行った。具体的には PF, W1DF および CL の発育、血漿中 P_4 , E_2 および FSH 濃度について受胎牛と不受胎牛間で比較した。また W1DF と CL の位置関係およびスイッチに伴う LF の位置変化が受胎性に与える影響を検証した。これに付随して、W1DF および CL の位置関係が W1DF および CL の発育動態やホルモン動態に与える影響を観察した。

2-2. 材料および方法

供試動物

臨床的に健康な黒毛和種繁殖経産牛 134 頭(5.9±3.2 歳, 3.2±2.6 産, 平均±標準偏差)と未経産牛 23 頭(1.0±0.2 歳)を供試した。経産牛の平均分娩後日数は 76.3±39.0 日であった。供試牛

は福島県内 7 農場にて乾草および濃厚飼料が給与され、自由飲水できる状況で飼養されていた。ボディコンディションスコア(BCS)は発情日に測定し、 3.83 ± 0.38 (平均±標準偏差)であった。

実験方法

第 1 章で述べた観察スケジュールで卵巣の観察および採血を行った。採血は Day 0 時点で 99 頭、Day 3, 5, 7 で 157 頭について行った。卵巣構造物の特徴について 2 種類の分類を行った。1 つ目は Day 7 における WIDF と CL の位置関係についてであり、両者が同側に存在するものを同側群 (IG), 両者が反対側に存在するものを反対側群(CG)とした。2 つ目はスイッチの発生に関連したもので、全頭のうち 125 頭を 2 群に分類した。つまりスイッチが発生し LF が反対側の卵巣へ位置変化が起きたものを位置変化群(C), LF の反対側への位置変化が見られなかったものを位置変化なし群(NC)とした(図 2)。

血中ホルモン濃度の測定

凍結保存された血漿を測定直前に室温にて融解し、第 1 章で述べた方法により血漿 P_4 , E_2 および FSH 濃度を測定した。

統計処理

平均値±標準偏差で示した。平均値の比較は Student の t 検定でおこなった。Day 0 の血中 P_4 濃度については正規性が認められず、ノンパラメトリック法の Mann-Whitney の U 検定を行ったため中央値を示した。繰り返し測定した項目についてはその推移を検定するために、反復測定の分散分析を行った。受胎性に関する要因の検定は P 値を用いたステップワイズ法によりロジスティック回帰分析を行った(目的変数：受胎成績，説明変数：BCS，産子数，LF の位置変化の有無(C 群と NC 群)，WIDF と CL の位置関係(IG 群と CG 群)，Day 0 における血中 E_2 および P_4 濃度，PF の平均直径)。4 群間の受胎率の比較には Fisher の正確確率検定を用いた。

統計処理には EZR[Kanda, 2013]を用いた。危険率 5%未満($p < 0.05$)で有意差ありとし、10%未満を傾向あり($0.05 \leq p < 0.1$)とした。

2-3. 結果

1) 受胎率

全体の受胎率は 71.3 % (112/157)であった。IG 群と CG 群の発生割合はそれぞれ 52.2% (82/157)と 47.8% (75/157)であった。IG 群の受胎率は 67.1% (55/82), CG 群の受胎率は 76.0% (57/75)であった(図 3 左)。C 群と NC 群において発生割合はそれぞれ 20.0% (25/125)と 80.0% (100/125)であった。NC 群の受胎率は 74.0% (74/100), C 群の受胎率は 60.0% (15/25)と NC 群で高い値を示した(図 3 右)。目的変数を受胎成績, 説明変数を LF の位置変化の有無 (Changing; C 群と NC 群), W1DF と CL の位置関係(Location; IG 群と CG 群), BCS, 産子数, PF, Day 0 における血中 E_2 および P_4 濃度として P 値を用いたステップワイズ法によりロジスティック回帰分析を行った結果, 受胎性に関連する要因として LF の位置変化の有無(C 群と NC 群)のみに有意差を認めた。また NC 群に比較して C 群では受胎成績が有意に低下するという結果が得られた(表 1)。W1DF と CL の位置関係について有意差は認められなかった。

2) 受胎群と不受胎群の比較

Day 0 の排卵前卵胞とホルモン動態

Day 0 における PF の平均直径は受胎群で 1.27 ± 0.17 cm, 不受胎群で 1.38 ± 0.21 cm で, 不受胎群のほうが有意に大きい値を示した($p < 0.05$)。PF の平均直径を 1.0 cm 以下から 0.15 cm 間隔で区分した時(<1.0, 1.0-1.15, 1.15-1.3, 1.3-1.45, 1.45<), 1.0 cm 以下を基準にして 1.45 cm 以上の群ではオッズ比が 76.0% 低下した(回帰モデル: $p < 0.05$; 図 4, 表 2)。

血中 E_2 濃度は受胎群で 8.02 ± 1.63 pg/ml, 不受胎群で 6.58 ± 1.65 pg/ml であり, 受胎群で高い傾向がみられた($p < 0.1$)。血中 P_4 濃度の中央値は受胎群で 0.54 ng/ml, 不受胎群で 0.77 ng/ml

で、不受胎群で高い傾向がみられた($p<0.1$)

第一卵胞波中の卵巣構造物とホルモン動態

Day 1 から Day 7 までの W1DF および CL の平均直径と BFA の推移, Day 3 から Day 7 までの血中 E_2 , P_4 および FSH 濃度の推移は, 受胎群と不受胎群の間に有意差は認められなかった(図 5, 6)。

3) 第一卵胞波主席卵胞と黄体の位置関係(同側群と反対側群)の比較

Day 0 における卵巣構造物とホルモン動態

AI 時の PF の平均直径は IG 群では 1.31 ± 0.19 cm, CG 群で 1.29 ± 0.19 cm だった。Day 0 における平均血中 E_2 濃度は IG 群で 7.33 ± 1.74 pg/ml, CG 群で 7.88 ± 1.54 pg/ml であった。Day 0 における血中 P_4 濃度の中央値は IG 群で 0.67 ng/ml, CG 群で 0.70 ng/ml であった。いずれにおいても有意差は認められなかった。

第一卵胞波中の卵巣構造物とホルモン動態

Day 1 から Day 7 までの W1DF および CL の平均直径と BFA の推移, および Day 3 から Day 7 までの血中 E_2 , P_4 および FSH 濃度は IG 群と CG 群の間に有意差は認められなかった(図 7, 8)。

2-4. 考察

C 群に比較して NC 群で高い受胎率を示し, ロジスティック回帰分析の結果からもスイッチの発生により LF が反対側卵巣へ位置を変えることによって受胎率が低下する可能性が示された。本章ではスイッチによって LF が反対側の卵巣に位置を変えた場合のみを観察した。しかしながら, 同側卵巣内でスイッチが起こることも十分に考えられ, NC 群の中にも同側卵巣内でスイッ

チを起こしているものが含まれていることになる。つまり、今回の結果からは受胎性への影響はスイッチが発生することによる影響なのか、あるいはスイッチにより LF の位置が変化することによる影響なのかまでは言及できなかった。

黒毛和種繁殖牛において IG 群(67.1%)と CG 群(76.0%)の受胎率に有意差を認めず、W1DF と CL の位置関係は受胎性に影響を与えないという結果となった。Miura ら[2015]によると W1DF と CL の位置関係の受胎性への影響は、季節、体重、AI 実施時の DIM、乳量、BCS、産子数の影響は受けないと報告している。また泌乳牛および未経産牛のどちらでも IG 群と CG 群の間に受胎率の差がみられたことから、泌乳による影響でもないと考えられている。黒毛和種繁殖牛においては IG 群と CG 群の間に受胎率の差は認められなかったことから、これらが受胎性に与える機序はホルスタイン種に特徴的な生理的機構である可能性が考えられた。前述の研究では、泌乳による差は認められていないが、泌乳がステロイド代謝に関与していることが知られている。高泌乳牛では、採食量の増加から肝血流量の増加することで、その結果としてステロイド代謝が増強することが知られている [Luttgenau and Bollwein, 2014]。ホルスタイン種において、IG 群で受胎率の低下が顕著だった事については、局所環境の条件悪化に対する子宮-卵管の耐性の相違が原因であり、高乳量を維持するための、ホルスタイン種特有の過剰な採食量がそれを引き起こしている可能性がある。黒毛和種において採食量と肝血流量の関係について調査した研究は少ない。しかしながら、黒毛和種の泌乳量はホルスタイン種の約 10 分の 1 といわれており、この違いから両者の間には代謝状態にも違いがみられている [Shingu et al., 2002]。そしてそれは、インスリンや IGF-1 を介して、繁殖を制御するホルモンにも影響を及ぼす。つまり、品種の差は繁殖成績の違いを生み出すのに十分な要因となりうるものと想像される [Spicer et al., 1993, Spicer and Stewart, 1996, Gutierrez et al., 1997, Glistler et al., 2001, Armstrong et al., 2003, Butler et al., 2004]。

CL の平均直径、血漿中の P₄ 濃度および BFA に IG 群と CG 群の間に有意な差は認められなかった。P₄ は妊娠維持に重要な役割を果たし [Inskeep, 2004]、BFA は CL の機能を反映する。CL の血流量は発情周期中の血中 P₄ 濃度を反映する指標であり、黄体断面積よりも血中 P₄ 濃度と強

い相関を示す[Luttgenau and Bollwein, 2014]。それは、ステロイドの前駆物質が黄体組織へ運ばれ[Janson et al., 1981], P_4 が全身循環へ放出されるためには、十分な黄体血流量を必要とするためだと考えられる[Acosta et al., 2002]。また、W1DF は第一卵胞波の時期に E_2 を分泌するが[Miura, 2019], W1DF の平均直径および血漿 E_2 濃度に群間の差を認めなかった。これらの結果から、黒毛和種においては W1DF と CL の位置関係は CL と W1DF の形態的な変化をもたらさず、全身循環のホルモン濃度に影響を及ぼすような機能的変化もおこさなかった事が窺われた。

過去の報告では、CL が存在する卵巣と同じ側にある子宮角は対側と比較して高い P_4 濃度を示し[Cerbito et al., 1994], PF が存在する卵巣と同じ側の卵管はそうでない側に比較して高い E_2 濃度を示す[Wijayagunawardane et al., 1998]。このことから子宮角はその同側の卵巣の影響を受けるものだと考えられる。また W1DF が発育する過程で E_2 を産生するため[Miura, 2019], W1DF が存在する卵巣と同じ側の卵管や子宮が、産生された E_2 の影響によりその機能に変化が生じ、IG 群の受胎性の低下が起きるのではないかと考察されている[Miura et al., 2015]。本研究では IG 群と CG 群の間で受胎率に有意な差がみられなかったものの、CG 群の方が高い受胎率を示した。このことから W1DF と CL の位置関係が受胎性と全くの無関係であるとは言い切れず、W1DF と CL の位置関係が受胎性に与える影響はホルスタイン種特有の結果である可能性だけでなく、W1DF の発育過程と相互に関連して影響を及ぼす可能性も考えられる。

小卵胞の発現から主席卵胞の選抜開始までを卵胞発育期という。また主席卵胞の選抜は LF が 8.2 mm 以上に達した時を基準とするのが一般的で、実際には 8.5 mm が基準として用いられる[Ginther, 2016]。LF から分泌される E_2 は FSH 分泌を抑制し[Ginther et al., 2000], SF の要求する FSH 濃度を下回る。これにより、SF は発育が停滞する[Ginther, 2016]。同時期の E_2 は GnRH の分泌を促進し、LH 濃度の一時的な上昇を起こす[Ginther et al., 2001, Haughian et al., 2013]。これに対し、LF の顆粒層細胞は LH 受容体の発現量を増加させる[Ginther et al., 1989, Xu et al., 1995]ことで、発育の継続を可能とし主席性を獲得する[Beg et al., 2001, Ginther et al., 2001]。このように卵胞の発育過程や主席卵胞の選抜は多くのホルモンによって複雑に制御されている。第

一卵胞波中に LF の発育が停滞し、代わりに SF が発育を継続するスイッチが発生することは、この一連の流れに何らかの不具合が生じ、LF が主席性の獲得に至らなかったことを意味する。スイッチの発生が受胎性に影響するということには、スイッチを引き起こす内分泌的機構が要因である可能性と、スイッチの発生そのものが要因である可能性の 2 通りが考えられ、スイッチに伴う卵巣動態およびホルモン動態の変化について更なる調査が必要である。

黒毛和種繁殖牛において 1.45 cm 以上の PF の受胎率はそれ以下の平均直径をもつ PF の受胎率よりも有意に低下した。PF の大きさと受胎率との関係についてはいくつかの相反する報告がなされている。ホルスタイン種を用いて GnRH を用いた TAI を行った場合では、PF の大きさと受胎率との間に関連性は確認されなかった [Colazo et al., 2015]。一方で、11 mm 以下の PF に対して GnRH による排卵誘起処置を行った場合、受胎率は低下し、さらには妊娠喪失が増加したとの結果が得られている [Perry et al., 2005]。この受胎率低下は AI 時における血中 E₂ 濃度の低値が関連していると考えられている。卵胞液中の E₂ 濃度が高い卵胞では、黄体化した顆粒層細胞の P₄ 分泌能力が高い [McNatty et al., 1979]。このことから、AI 時の低 E₂ 濃度は顆粒層細胞からの P₄ 分泌が刺激されず、結果として血中 P₄ 濃度が不十分となり受胎成績の低下を招いたと考えられている [Perry et al., 2005]。Ovsynch プロトコルにおける最後の GnRH 投与時に高 E₂ 濃度を示す場合は受胎率が向上することが報告されている [Bello et al., 2006]。実際に本研究でも Day 0 における血中 E₂ 濃度は受胎群で高い傾向にあることが確認された。TAI を行った研究では AI 時の E₂ の増加によって AI 実施から 5 日目までの間の子宮角でエストロゲン受容体 (ER α) の発現が増加し、さらにはインヒビン β A と子宮乳タンパク質の前駆物質が増加することが確認されている。これは AI 時の高 E₂ 濃度は間接的にも妊娠成立に重要な役割を果たしていることを示唆している [Perry et al., 2020]。また、乳用牛における PF の平均直径と受胎性との関連性については、横軸に PF の平均直径、縦軸に受胎の期待値を表したとき、直径 1.6 cm 程度をピークとした山なりに分布するため、適切な大きさがあると結論付けられている [Bello et al., 2006]。本研究では、Day 0 における PF の平均直径が小さいものに関しては受胎性への影響は認められなかつ

た。これは今回、AI を実施した個体はすべて発情徴候を示し、さらには排卵を認めたものであり、平均直径が小さい場合でも PF は生理的に成熟していたものと推察される。また、乳用牛では PF の平均直径が 1.6 cm 程度で最も受胎が期待できるとの報告があるのに対し、黒毛和種を用いた本研究では、受胎群の PF の平均直径は約 1.3 cm、不受胎群の PF の平均直径は約 1.4 cm であり、1.45 cm を超える場合では有意に受胎率が低下することが確認された。このことから、黒毛和種では成熟した卵胞の大きさは乳用種のものに比べて小さい可能性が示された。

体外成熟、体外受精そして体外培養を行った実験では、卵胞の大きさは卵子の大きさと受精後の発育能力に関連していることを示している。この中で大きな卵胞からは大きな卵子が採取される傾向があり、大きな卵子は胚盤胞へと発育する能力が高いとされている [Arlotto et al., 1996]。加えて、同じく牛の卵子や胚の体外成熟、体外受精および体外培養を行った研究では、卵子が大きいほど分裂率と胚盤胞への発育率が高くなることを明らかにした [Otoi et al., 1997]。しかしながら、130 μm 以上の卵子で胚盤胞まで発育したものはなかった。このことから、本研究で大きすぎる PF を示した群で受胎率が有意に低下した要因は、その PF に含まれる卵子の胚への発育能力を反映したものと考えられる。

Day 0 におけるホルモン環境については、受胎群で血中 E_2 濃度が高い傾向にあることが確認された。卵胞液中の E_2 濃度が高い卵胞では、黄体化した顆粒層細胞の P_4 分泌能力が高いことが知られている [McNatty et al., 1979]。 P_4 は妊娠の維持に重要なホルモンであり、Day 0 における血中 E_2 濃度が高い個体では、排卵後の黄体における P_4 分泌能力が高まり、妊娠が維持されることで受胎成績が向上したものと考えられる。また、TAI を行った研究では AI 時の E_2 の増加によって AI 実施から 5 日目までの間の子宮角でエストロゲン受容体 ($\text{ER}\alpha$) の発現が増加し、さらにはインヒビン βA と子宮乳タンパク質の前駆物質が増加することが確認されている。これは AI 時の高 E_2 濃度は間接的にも妊娠成立に重要な役割を果たしていることを示唆している [Perry et al., 2020]。不受胎群では Day 0 における血中 P_4 濃度が高い傾向にあることが確認された。発情時の P_4 濃度が比較的高値を示した要因としては、黄体退行が十分でないことが考えられる。

排卵の引き金となる LH サージは、発情開始から 10 から 14 時間後に起こり [Forde et al., 2011], これには血中 P₄ 濃度が基底値まで低下し, LH パルスが持続することが必要である [Roche, 1996]。本研究では観察を行った全頭で AI 実施後 24 時間以内に排卵が確認されているが, 不受胎群で血中 P₄ 濃度が高い値を示した要因は, 発情発現に先行する黄体退行が十分でなかったか, 授精適期よりも早い時期に AI 実施をしていた個体が含まれている可能性が考えられた。しかしながら, 不受胎群の血中 P₄ 濃度は機能的黄体の存在の指標となる 1 ng/ml [Bicalho et al., 2008] を下回っていることから, 臨床的な重要性は低いと考えられる。

2-5. 小括

排卵後 7 日目における W1DF と CL の位置関係の違いが受胎性に与える影響は, 黒毛和種繁殖雌牛においては認められなかった。また, 第一卵胞波中の卵巣構造物の発育やホルモン動態にも影響を認めず, W1DF と CL の位置関係は黒毛和種繁殖牛において受胎に影響する重要な要因であるとは見做されなかった。

一方で, W1DF の発育過程が受胎性に影響を与える可能性が示唆された。しかしながら, その詳細は不明であるため, 第一卵胞波中の卵胞発育過程の違いが受胎性に及ぼす影響について詳細を調査する必要がある。

AI 時における PF の平均直径が, 受胎性に影響していることが確認された。外部の発情徴候が認められる場合には, 卵胞の成熟が十分であるために, 排卵することが可能な大きさであれば小さいことは受胎性に悪影響はない。一方で, 1.45 cm を超える場合には受胎率が低下することが確認された。これに関連して, Day 0 における血中 E₂ 濃度は受胎群で高い濃度を示し, AI 時の PF の E₂ 分泌能力を反映しているものと考えられた。これらの結果から AI 時の PF の形態的および機能的状態が受胎性に関連している事が示唆された。

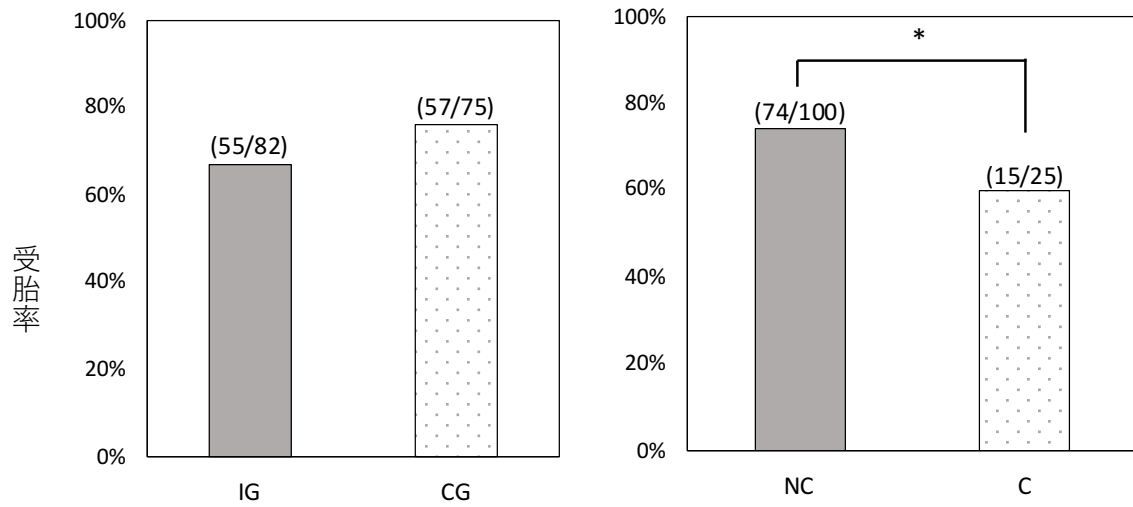


図3. IG群とCG群およびC群とNC群の受胎率

W1DFがCLと同一卵巣内に存在する群(IG)とW1DFがCLと反対側卵巣に存在する群(CG)との間に有意差は認められなかった(左)。第一卵胞波中に最大卵胞(LF)の位置変化が発生した群(C)よりも位置変化が発生しなかった群(NC)で高い受胎率を示し、ロジスティック回帰分析においてもC群で受胎率が有意に低下することが示唆された(右; *: $p < 0.05$)。

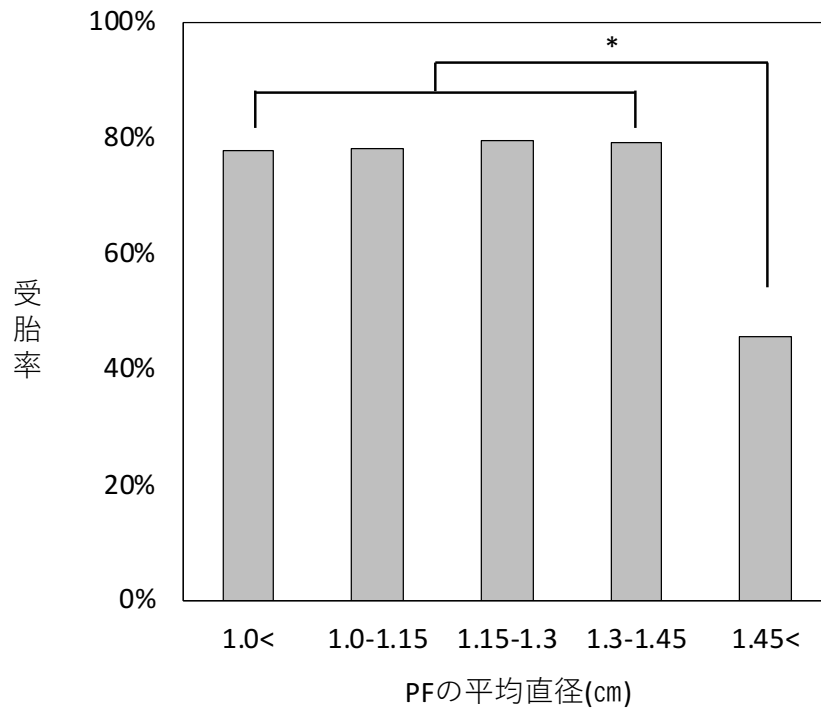


図4. PFの平均直径(0.15cm刻み)と受胎率
 平均直径が1.45cm以上の排卵前卵胞(PF)を示した群では、その他の群と比較してが有意に低下した(*: $p < 0.05$)。

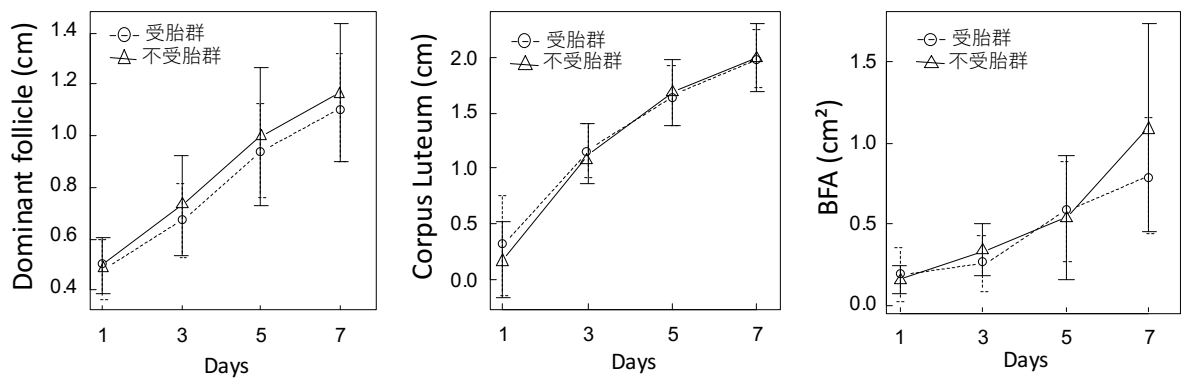


図5. 受胎群および不受胎群における卵巢構造物の動態
 いずれの項目においても受胎群と不受胎群の間で有意差は認められなかった。

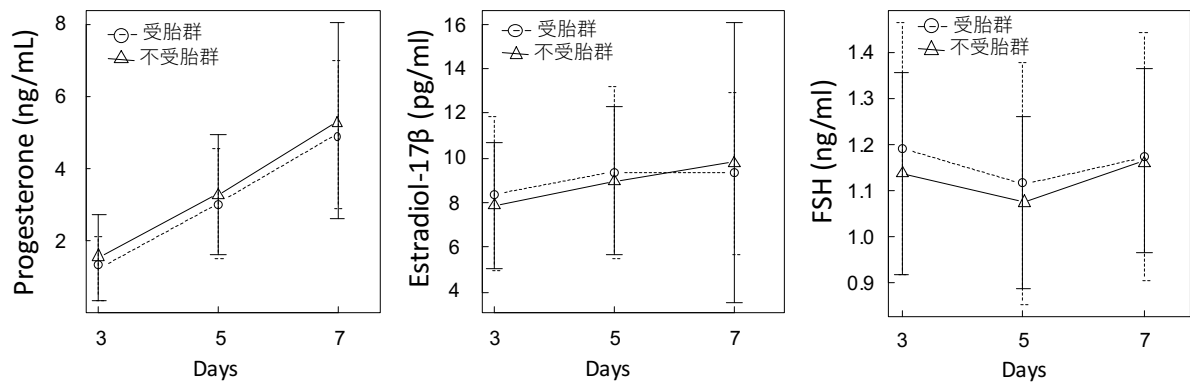


図6. 受胎群および不受胎群におけるホルモン動態
 いずれの項目においても受胎群と不受胎群の間で有意差は認められなかった。

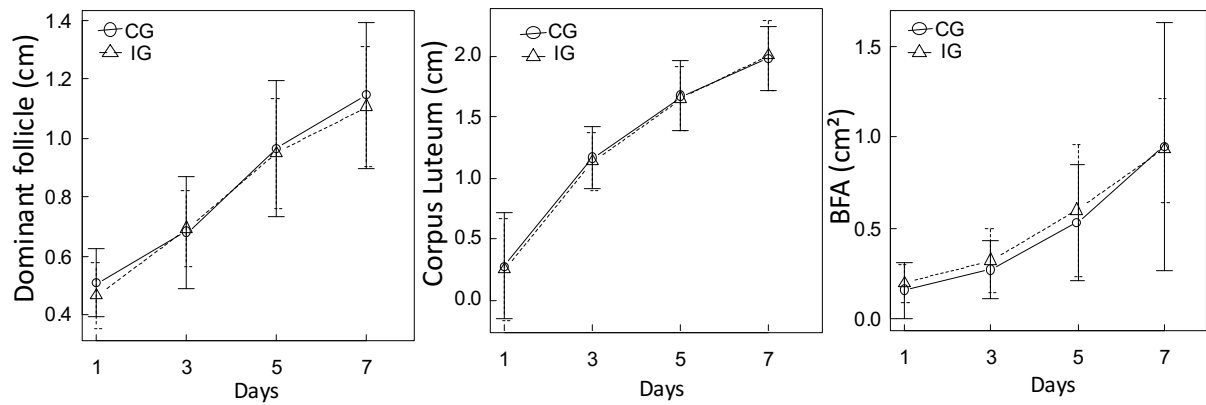


図7. CG群およびIG群における卵巢構造物の動態
 いずれの項目においてもW1DFがCLと同一卵巢内に存在する群(IG)とW1DFがCLと反対側卵巢に存在する群(CG)群の間で有意差は認められなかった。

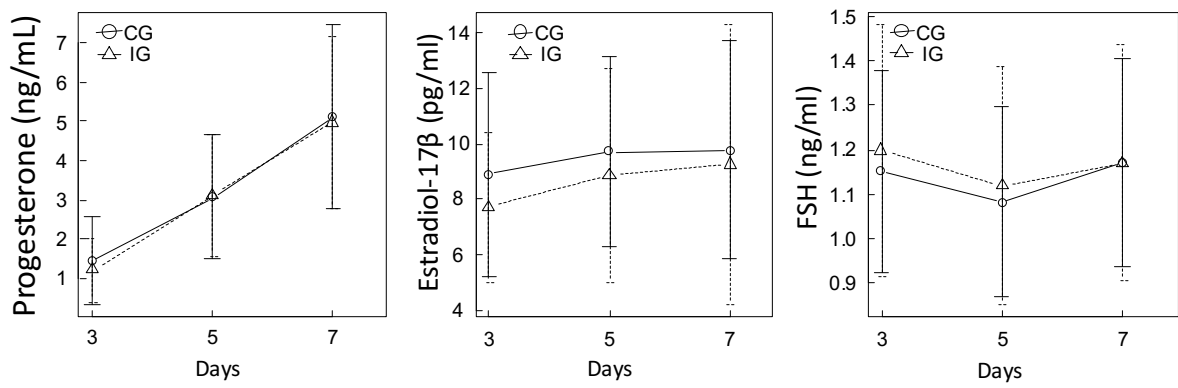


図8. CG群およびIG群におけるホルモン動態
 いずれの項目においてもW1DFがCLと同一卵巢内に存在する群(IG)とW1DFがCLと反対側卵巢に存在する群(CG)の間で有意差は認められなかった。

表1. ロジスティック回帰分析(P値を用いたステップワイズ法)により受胎率に関連する要因の解析結果

	odds	95%CI	P-value
Changing	0.22000	4.17e-02 - 1.17	0.0753
Location	0.38400	6.47e-02 - 2.28	0.2920
PF size	0.66700	4.39e-03 - 101.00	0.8740
E ₂ on Day 0	1.24000	1.01e+00 - 1.54	0.0433
P ₄ on Day 0	0.49800	1.82e-01 - 1.36	0.1750
BCS	9.57000	4.39e-01 - 209.00	0.1510
Parity	0.78300	5.57e-01 - 1.10	0.1610

PFをモデルから除外

	odds	95%CI	P-value
Changing	0.22500	0.0433 - 1.16	0.0753
Location	0.37100	0.0653 - 2.11	0.2640
E ₂ on Day 0	1.25000	1.0100 - 1.54	0.0417
P ₄ on Day 0	0.50200	0.1850 - 1.36	0.1750
BCS	10.40000	0.5850 - 187.00	0.1110
Parity	0.77700	0.5600 - 1.08	0.1320

Locationをモデルから除外

	odds	95%CI	P-value
Changing	0.24400	0.0488 - 1.22	0.0853
E ₂ on Day 0	1.21000	0.9910 - 1.49	0.0613
P ₄ on Day 0	0.58000	0.2240 - 1.50	0.2600
BCS	7.41000	0.4990 - 122.00	0.1610
Parity	0.82900	0.8290 - 1.11	0.2090

P₄ on Day 0をモデルから除外

	odds	95%CI	P-value
Changing	0.24900	0.0521 - 1.19	0.0817
E ₂ on Day 0	1.22000	0.9990 - 1.48	0.0508
BCS	11.20000	0.8040 - 155.00	0.0723
Parity	0.81800	0.6130 - 1.09	0.1720

Parityをモデルから除外

	odds	95%CI	P-value
Changing	0.24200	0.0536 - 1.11	0.0687
E ₂ on Day 0	1.16000	0.9710 - 1.40	0.1010
BCS	8.55000	0.673 - 109.00	0.0980

E₂ on Day 0をモデルから除外

	odds	95%CI	P-value
Changing	0.20300	0.0463 - 0.89	0.0345
BCS	2.77000	0.3360 - 22.90	0.3430

BCSをモデルから除外

最終モデル	odds	95%CI	P-value
Changing	0.24100	0.0595 - 0.979	0.0467 **

目的変数を受胎成績, 説明変数を最大卵胞(LF)の位置変化(Changing), W1DFとCLの位置関係(Location), AI時のPFの平均直径, Day 0における血中E₂およびP₄濃度, BCSとしたときのロジスティック回帰分析結果。最終モデルとしてChangingのみが受胎率に関連する要因として有意差を認めた。また位置変化が起きた群(C群)では起きなかった群(NC)群に比較して, オッズ比0.241と有意に低下した(**: p < 0.05)。

表2. AI時におけるPFの平均直径と受胎性

PFの平均直径 (cm)	オッズ比	95%CI	P-value
1.0<			
1.0-1.15	1.03	0.1600-6.59	0.976
1.15-1.3	1.11	0.1960-6.29	0.905
1.3-1.45	1.09	0.1950-6.06	0.925
1.45<	0.24	0.0429-1.32	0.101

目的変数を受胎成績，説明変数をPFの平均直径(0.15cm刻み)としたときのロジスティック回帰分析結果(回帰モデル: $p < 0.05$)。1.45cm以上のPFでは受胎率が有意に低下した。

第3章 黒毛和種繁殖牛における第一卵胞波主席卵胞の選抜過程が受胎性に及ぼす影響

3-1. 序論

第2章の成績から、黒毛和種繁殖牛について W1DF と CL の位置関係が受胎性に与える影響はホルスタイン種ほど強くないことが明らかとなった。しかしながら、W1DF と CL の位置関係はスイッチの発生と相互に影響を及ぼす可能性も考えられた。また、スイッチの発生により卵胞の位置変化が生じた場合、受胎率が低下することも示唆された。一方で、卵胞の位置変化を伴わないスイッチの発生は観察されておらず、受胎率の低下が卵胞の位置変化による影響か、スイッチの発生による影響であるかについて詳細を明らかにする必要がある。

第一卵胞波の期間は受胎にとっても重要な時期であり、排卵後に卵子が卵管内で受精し、排卵後4日には子宮内に進入して7日までに胚盤胞を形成する[Forde and Lonergan, 2017]。ウシでは CL が存在する卵巣側の子宮角で着床、妊娠しやすいことが知られている[Sreenan and Mulvehill, 1975]。また子宮角の E_2 および P_4 濃度は同側の卵巣に存在する PF や CL の存在の影響を受ける[Cerbito et al., 1994, Wijayagunawardane et al., 1998]。

W1DF は第二卵胞波主席卵胞と比較して卵胞直径が大きく、血中および卵胞液中の E_2 濃度、血管分布が豊富であることが知られている[Miura, 2019]。W1DF が成熟する頃には CL も開花期を迎え高 P_4 濃度環境下であることから、W1DF は排卵せず退行する卵胞である。しかしながら、前述のように第二卵胞波主席卵胞に勝る形態的・機能的特徴を有することから、卵巣-子宮の局所環境を介して受胎性に影響を与える可能性が考えられた。これらのことから、Miura ら[2016]により W1DF と CL が同側卵巣に存在する場合、受胎率が有意に低下することが確認された。しかしながら、第2章では黒毛和種においては W1DF と CL の位置関係が受胎性に与える影響はホルスタイン種ほど強くないという結果を得た。一方で、スイッチの発生に伴い LF の位置が反対側卵巣に変化した時、受胎率が有意に低下した。そこで本章は W1DF の発育過程に着目した。

第一卵胞波の卵胞が W1DF に選抜される過程は、以下のように進行することが知られている。

一般的に、発育中の卵胞は 8.5 mm に達する頃に主席性を獲得し始めることが知られている [Ginther et al., 2016]。最も大きな卵胞は自身が分泌する E_2 により FSH 分泌を低濃度に抑制するが、低濃度の FSH と上昇した LH を利用することで [Xu et al., 1995, Ginther et al., 2000, Beg et al., 2001, Ginther et al., 2001] 発育の継続を可能とし、主席性を獲得する。一方で、卵胞波中に発育していたその他の多くの卵胞は FSH 濃度の低下により、発育を継続できず退行する。このようにして通常ひとつの卵胞波中に 1 個の主席卵胞が選抜される。しかし、この選抜過程にもいくつか種類があることが報告されている。主席卵胞の選抜過程は、発育が継続して主席卵胞となる LF と、発育が停滞するその他の卵胞のうちで最大直径を示す SF の動態によって 3 種類に分類される [Ginther et al., 2016]。1 つ目は、SF が選抜前の少なくとも 2 日間で LF よりも小さく、さらに SF が 7.0 mm よりも大きく発育する場合であり、これをコンベンショナル型という。2 つ目は、SF が選抜時期までに 7.0 mm に達しないもので、これをアンダーサイズ型という。3 つ目は、SF が選抜前の 2 日間のどこかで LF よりも大きくなる場合をいい、これをスイッチ型という [Ginther et al., 2016]。スイッチ型は他の 2 つの型と異なり、最大直径を示していた LF は主席性を獲得せずに退行し、次第に SF に大きさを越されて、最終的には SF が主席性を獲得することが特徴的である。

よって、W1DF の選抜過程の違いは、主席卵胞の形態や機能、あるいは第一卵胞波中のホルモン動態の違いをもたらす可能性があると考えられる。しかしながら、スイッチの発生により LF の位置変化が生じることや、スイッチの発生そのものが与える受胎性への影響は明らかではない。さらには、これらの変化が第一卵胞波中の卵巣動態およびホルモン動態にもたらす影響は十分に検討されていない。そこで今回は W1DF の選抜過程に関する卵巣動態およびホルモン動態の変化を調べるために以下の実験を行った。

試験 1 では、第 2 章で観察された、卵胞の位置変化を伴うスイッチが発生した場合に受胎性が低下した機序を明らかにする目的で観察を行った。試験 2 では、試験 1 で観察した卵胞の位置変化を伴うスイッチだけでなく、卵胞の位置変化を伴わないスイッチの観察を行った。これにより、

スイッチの発生が受胎性に与える影響および第一卵胞波中の卵巣動態とホルモン動態の変化を明らかにすることを目的に観察を行った(図 2)。

3-2. 試験 1 : 第一卵胞波中のスイッチによる最大卵胞の位置変化による影響

1)材料および方法

供試動物

臨床的に健康な黒毛和種繁殖経産牛 57 頭(5.8±3.2 歳, 3.1±2.6 産)と未経産牛 10 頭(1.1±0.3 歳)を供試した。経産牛の平均分娩後日数は 75.3±45.8 日であった。供試牛は福島県内 7 農場にて乾草および濃厚飼料が給与され, 自由飲水できる状況で飼養されていた。BCS は発情日に測定し, 3.9±0.3(平均±標準偏差)であった。

実験方法

第 1 章で述べた観察スケジュールに基づき, 卵巣の観察, 妊娠診断および採血を行った。供試牛は第 1 章と同様に卵巣構造物の特徴について 2 種類の群分けした。1 つ目はスイッチの発生に関連したもので, スイッチが発生し LF が反対側の卵巣へ位置変化が起きたものを位置変化群(C), LF の反対側への位置変化が見られなかったものを位置変化なし群(NC)とした(図 2)。2 つ目は Day 7 における W1DF と CL の位置関係についてであり, 両者が同側に存在するものを同側群(IG), 両者が反対側に存在するものを反対側群(CG)とした。

また位置関係の変化(C 群または NC 群)と Day 7 における W1DF と CL の位置関係(IG 群または CG 群)とを組み合わせた 4 群(C_IG 群, C_CG 群, NC_IG 群および NC_CG 群)を設定した。たとえば C_IG 群は卵胞発育過程において W1DF の位置変化が起き, Day 7 において W1DF と CL が同側卵巣内に位置することを意味する。

血中ホルモン濃度の測定

凍結保存された血漿を測定直前に室温にて融解し、第 1 章で述べた方法により血漿 P₄、E₂ および FSH 濃度を測定した。

統計処理

結果はすべて平均値±標準偏差で示した。平均値は Student の t 検定を行った。Day 0 における P₄ 濃度は正規性を認めず、ノンパラメトリック法の Mann-Whitney の U 検定を行ったため中央値を示した。4 群間の平均値の比較では一元配置分散分析を行った。繰り返し測定し、その推移を比較する場合には反復測定の分散分析を行った。受胎率は目的変数を受胎成績、説明変数を LF の位置変化の有無(C 群と NC 群)、PF の平均直径、BCS、産子数として P 値を用いたステップワイズによりロジスティック回帰分析を行った。4 群間における受胎率の比較では Fischer の正確確率検定をおこなったのち、Bonferroni 法による多重比較を行った。

統計処理には EZR[Kanda, 2013]を用いた。危険率 5%未満($p < 0.05$)で有意差ありとし、危険率 10%未満($0.05 \leq p < 0.1$)で傾向ありとした。

2)結果

受胎率

C 群の受胎率は 47.1%(8/17)、NC 群の受胎率は 80.0%(40/50)であった(図 9 左)。目的変数を受胎成績、説明変数を LF の位置変化の有無(C 群と NC 群)、PF の平均直径、BCS、産子数として P 値を用いたステップワイズ法によりロジスティック回帰分析を行った結果、受胎性に関連する要因として LF の位置変化の有無のみで有意差を認め、C 群で有意に受胎率が低下した($p < 0.05$, オッズ比:0.259, 95%CI:0.0684-0.983)。C_IG, C_CG, NC_IG および NC_CG の受胎率はそれぞれ 33.3%(3/9), 62.5%(5/8), 81.5%(22/27)および 78.3%(18/23)であり、NC_IG よりも C_IG

群で受胎率が低い傾向がみられた($p < 0.1$, 図 9 右)。

Day0 における卵巣構造物とホルモン動態

AI 時の PF の平均直径は, C 群と NC 群ではそれぞれ 1.30 ± 0.19 cm および 1.31 ± 0.17 cm であり, 有意差は認められなかった。Day 0 における血中 P_4 濃度は C 群と NC 群の間で有意差は認められなかった(C vs. NC; 中央値 0.66 ng/ml vs. 0.80 ng/ml; 図 10 左)。しかしながら Day 0 における血中 E_2 濃度は NC 群に比較して C 群で低い傾向が認められた(C vs. NC, 6.16 ± 1.81 pg/ml vs. 8.13 ± 1.68 pg/ml, $p < 0.1$; 図 10 右)。

第一卵胞波中の卵巣構造物とホルモン動態

排卵後の W1DF および CL の平均直径, 血中 P_4 および FSH 濃度の推移は, 両群の間に有意差は認められなかった(図 11, 12 左, 右)。血中 E_2 濃度は C 群に比較して NC 群で有意に高く推移した($p < 0.05$; 図 12 中)。また 4 群間(C_IG, C_CG, NC_IG, NC_CG)における比較ではいずれの項目でも有意差は認められなかった。

3-3. 試験 2: 第一卵胞波中のスイッチの発生による影響

1) 材料および方法

供試動物

臨床的に健康な黒毛和種繁殖経産牛 48 頭(6.1 ± 2.1 歳, 4.1 ± 2.5 産)と未経産牛 10 頭 (1.0 ± 0.0 歳) の 58 頭を供試した。経産牛の平均分娩後日数は 76.6 ± 27.7 日であった。供試牛は福島県内 6 農場にて乾草および濃厚飼料が給与され, 自由飲水できる状況で飼養されていた。BCS は発情日に測定し, 3.8 ± 0.4 (平均 \pm 標準偏差)であった。

実験方法

第 1 章で述べた観察スケジュールに基づき、卵巢の観察、妊娠診断および採血を行った。卵胞の観察では第 1 章の項目に加え、左右卵巢それぞれにおいて LF と SF を一つずつ記録することで合計 4 つの卵胞の発育を観察した。これにより試験 1 とは異なり、卵胞の発育過程における LF(あるいは W1DF)の位置変化を伴わない、同側卵巢内におけるスイッチの発生も観察可能とした。

供試牛は卵巢構造物の特徴について 2 種類の群分けした。1 つ目はスイッチの発生の有無によるもので、スイッチが発生したもののスイッチあり群(SW)、スイッチが発生しなかったものをスイッチなし群(NSW)とした(図 2)。2 つ目は Day 7 における W1DF と CL の位置関係についてであり、両者が同側に存在するものを同側群 (IG)、両者が反対側に存在するものを反対側群(CG)とした。

またスイッチの発生の有無(SW 群または NSW 群)と Day 7 における W1DF と CL の位置関係(IG 群または CG 群)とを組み合わせた 4 群(SW_IG 群,SW_CG 群, NSW_IG 群および NSW_CG 群)を設定した。たとえば SW_IG 群は卵胞の発育過程においてスイッチが発生し、Day 7 において W1DF と CL が同側卵巢内に位置することを意味する。

さらにスイッチには同側卵巢内で発生するものと反対側卵巢へ発生するものが存在することから、スイッチが同側卵巢内で起きた場合を SWIG 群、スイッチが反対側卵巢へ起きた場合を SWCG、スイッチの発生がなかった場合を NSW 群とした 3 群の群分けも行った(図 2)。

血中ホルモン濃度の測定

凍結保存された血漿を測定直前に室温にて融解し、第 1 章で述べた方法により血漿 P_4 、 E_2 および FSH 濃度を測定した。

統計処理

結果はすべて平均値±標準偏差で示した。平均値は Student の t 検定を行った。4 群間の平均値の比較では一元配置分散分析を行った。繰り返し測定し、その推移を比較する場合には反復測定の分散分析を行った。受胎率は目的変数を受胎成績、説明変数をスイッチの発生の有無(SW 群と NSW 群)、PF の平均直径、BCS、産子数として P 値を用いたステップワイズによりロジスティック回帰分析を行った。3 群または 4 群間における受胎率の比較では Fischer の正確確率検定を行ったのち、Bonferroni 法による多重比較を行った。

統計処理には EZR[Kanda, 2013]を用いた。危険率 5%未満($p < 0.05$)で有意差ありとし、危険率 10%未満($0.05 \leq p < 0.1$)で傾向ありとした。

2)結果

受胎率

SW 群と NSW 群の発生割合はそれぞれ 29.3%(17/58)と 70.7%(41/58)であった。SW 群の受胎率は 88.3%(15/17)、NSW 群の受胎率は 63.4%(26/41)であった(図 13 左)。目的変数を受胎成績、説明変数をスイッチの発生の有無(SW 群と NSW 群)、PF の平均直径、BCS、産子数として P 値を用いたステップワイズ法によりロジスティック回帰分析を行った結果、受胎性に関連する要因としてどの項目においても有意差を認めなかった。SW_IG 群、SW_CG 群、NSW_IG 群および NSW_CG 群の受胎率はそれぞれ 60.0%(3/5)、100.0%(12/12)、69.2%(18/26)および 53.3%(8/15)であり、SW_CG 群と NSW_CG 群の間で有意差を認めた($p < 0.05$, 図 13 右)。スイッチが同側卵巣内あるいは反対側卵巣へ起きたかに基づいた 3 群、すなわち SWIG 群、SWCG 群および NSW 群の受胎率はそれぞれ、88.9%(8/9)、87.5%(7/8)および 63.4%(26/41)で、各群の間に有意差は認められなかった(図 14, $p > 0.05$)。

排卵前卵胞の平均直径

PF の平均直径は SW 群と NSW 群間 (1.38 ± 0.12 cm vs. 1.37 ± 0.18 cm)、SWIG 群、SWCG

群および NSW 群間 (1.38 ± 0.15 cm vs. 1.37 ± 0.09 cm vs. 1.38 ± 0.18 cm), SW_IG 群, SW_CG 群, NSW_IG 群および NSW_CG 群間 (1.40 ± 0.13 cm vs. 1.37 ± 0.12 cm vs. 1.35 ± 0.17 cm vs. 1.42 ± 0.19 cm)のいずれにおいても有意差は認められなかった。

スイッチの発生頻度

IG 群および CG 群におけるスイッチの発生割合はそれぞれ 16.1%(5/31)および 44.4%(12/27)であり, CG 群でスイッチの発生割合が有意に高い結果となった ($p < 0.05$)。スイッチ発生後の W1DF と CL の位置関係については, IG 群における SWIG 群, SWCG 群および NSW 群の割合はそれぞれ, 6.5%(2/31), 9.7%(3/31), 83.9%(26/31), CG 群における SWIG 群, SWCG 群および NSW 群の割合はそれぞれ 25.9%(7/17), 18.5%(5/27)および 55.6%(15/27)であり, Fisher の正確確率検定により有意差を認めた ($p < 0.05$)が, その後の Bonferroni 法による検定では 6 群のそれぞれにおける群間には有意差は認められなかった。

第一卵胞波中の卵巣構造物とホルモン動態

SW 群および NSW 群間において W1DF 直径および BFA で有意な群間差が認められ, いずれの項目も NSW 群で SW 群よりも高値で推移した(図 15 左, 右; $p < 0.05$)。CL の発育の推移には有意差は認められなかった(図 15 中)。SW および NSW 群間では血中 E_2 濃度に有意差を認め, NSW 群に比較して SW 群で高く推移した(図 16 中; $p < 0.05$)。血中 P_4 および FSH 濃度の推移に群間差は認めなかった(図 16 左, 右)。

SWIG 群, SWCG 群および NSW 群の 3 群間の比較では, BFA のみで有意差を認め, NSW 群でほかの 2 群よりも多く推移した(図 17 右)。W1DF および CL の発育について有意差は認められなかった(図 17)。また 3 群間における比較では血中 E_2 , P_4 および FSH 濃度に有意差は認められなかった。

4 群(SW_IG 群, SW_CG 群, NSW_IG 群, NSW_CG 群)の比較では, W1DF および BFA で有

意差が認められた($p < 0.05$, 図 18 左, 右)。W1DF の推移では NSW_CG が最も早くから発育した。BFA は NSW_IG および NSW_CG が高値で推移した。CL の発育について 4 群間で有意差は認められなかった(図 18 中)。4 群間での比較では血中 E_2 濃度に差の傾向を認め、4 群間で SW_CG が最も高く推移した($p < 0.1$; 図 19 中)。血中 P_4 および FSH 濃度に有意差は認められなかった(図 19 左, 右)。

3-4. 考察

受胎率は試験 1 では NC 群で有意に高く、試験 2 では SW 群で有意差はないものの高い値を示した。これらの結果が示していることは 1) 第一卵胞波中に LF の位置変化が起こらない場合に受胎性が高いことと、2) W1DF の過程にスイッチが発生することは受胎性を高める可能性があるということである。試験 1 と試験 2 の結果は相反するように見えるが、正反対の事象を示しているわけではない。なぜなら、試験 2 の SW 群には卵胞の位置変化を伴わないスイッチの発生が含まれるからである(図 2)。また、受胎性に影響を与える要因を検索するために行ったロジスティック回帰分析では、C 群と NC 群間で有意差を認めたものの、SW 群と NSW 群間では有意差を認めなかった。このことはスイッチの発生そのものよりも、スイッチによって起こる LF の位置変化が受胎性と関連していることを示唆している。

さらに詳細について観察すると、各試験で高い受胎率を示した NC 群と SW 群で共通したことは、第一卵胞波中の血中 E_2 濃度がそれぞれの対照群に比較して高く推移していた点である。このことは第一卵胞波中の E_2 レベルが適切に維持されることが、受胎性に有益に働く可能性を示唆している。卵管や子宮内膜の E_2 濃度は末梢の約 12 倍と極めて高く、その濃度は末梢血中濃度に関連することが報告されている [Mann et al., 2007, Hazano et al., 2021]。しかしながら、第一卵胞波中の卵管や子宮における E_2 の役割は明らかになっていない。卵巢摘出した雌羊において排卵前を模すために無処置あるいは低濃度または高濃度の E_2 処置をした研究で、発情後 4 日に

胚移植が行われた[Miller et al., 1977]。その報告では、E₂処置が行われなかった群において、発情後 22 日に妊娠の不成立、子宮の重さの減少、子宮内腔の蛋白量の減少が確認された。この結果は、周排卵期の E₂が子宮の機能や胚の発育に重要な役割を果たしていることを示唆している。Madsen ら[Madsen et al., 2015]の報告でも同様に、排卵前の E₂処置が胚の生存や妊娠成立に有効であることが示されている。また、E₂投与により 13, 14-dihydro-15-ketoprostaglandin F_{2α} (PGFM)が増加することが報告されている[Knickerbocker et al., 1986, Thatcher et al., 1986]。PGFM はウシにおいて PGF_{2α}の代謝産物であり、この上昇はプロスタノイド合成に対して E₂が関与していることを表している。さらには、E₂は子宮内膜において PGE₂と PGF_{2α}産生を増加させることが報告されている[Li et al., 2020]。雌羊において PGE₂は子宮血管床の拡大を引き起こす[Resnik and Brink, 1978, Still and Greiss, 1978]。またウシの黄体初期は黄体退行作用のある PGF_{2α}の働きは弱く、E₂が PG 合成を介して卵管や子宮の局所環境を制御することで、妊娠成立に良い影響を与えている可能性がある。また排卵後、卵子と精子の受精が起こる卵管では、栄養素だけでなく、IGF-1 や IGF-2 などの成長因子を分泌することで着床前の胚発生を支えている[Robinson et al., 2008]。これに関連して E₂は卵管内の IGF1 の mRNA 発現を増加させる[Pushpakumara et al., 2002]ことで、卵管内を IGF の豊富な環境にする。IGF は in vitro において直接胚の発育に関与して胚盤胞の形成を刺激することが知られている[Moreira et al., 2002]。卵子は排卵後 4 日まで卵管に留まるため、本章で観察を行った排卵後 7 日までの期間において E₂濃度が適度に維持されたことは、卵管内の環境を改善することで受胎性の向上に寄与したものと考えられる。本研究の結果から、W1DF の発育過程に関連した受胎性の改善は、第一卵胞波の時期に高く維持された E₂が卵管や子宮の微小環境や胚の生存に関わることで生じたと考えられる。また、LF の位置変化が生じた群(C 群)で、受胎率はより低値を示したことから、W1DF が局所的な影響を与えている可能性も考えられた。

次に、試験 1 および試験 2 で第一卵胞波中にスイッチが発生した要因を考えてみたい。試験 1 では NC 群で Day 0 における血中 E₂濃度が有意に高い値を示した。PF による E₂産生は発情徴

候の発現や排卵後における CL の P_4 産生に關与する [Adashi and Hsueh, 1982, Boer et al., 2010]。また E_2 は顆粒層細胞におけるアロマターゼを活性化させることが知られている [Zhuang et al., 1982]。アロマターゼはアンドロジェンを E_2 に変換させる酵素である [Okuda et al., 2001] ことから、Day 0 において PF の顆粒層細胞から分泌された高濃度の E_2 は排卵後の卵胞波で卵胞の発育を促進することが考えられる。また、第一卵胞波中の卵胞発育に伴う E_2 濃度の上昇は卵巣と視床下部との間のネガティブフィードバックを介して、FSH 分泌の減少を引き起こす [Gibbons et al., 1997, Ginther et al., 2000, Ginther, 2016]。これにより次席卵胞には不十分だが主席卵胞には十分な FSH 濃度に制御される [Ginther, 2016]。そして LF は顆粒層細胞の LH 受容体の発現数が増加することで [Ginther et al., 1989, Xu et al., 1995]、LH 依存性に発育を継続し主席性を獲得する [Beg et al., 2001, Ginther et al., 2001]。これらことから、試験 1 の NC 群では PF から分泌された高濃度の E_2 により、第一卵胞波における卵胞の発育が促進され、それにより同期間中の血中 E_2 濃度が高く推移したものと考えられた。結果として、FSH の分泌が抑制されたことで、LF が主席性を獲得しやすくなりスイッチが発生しにくく、LF の位置変化が起こらなかったことが推測される。一方で C 群では、Day 0 における E_2 濃度が低いことにより、第一卵胞波中の E_2 濃度が低く推移することで FSH 分泌抑制が不十分となり、その結果、次席卵胞の発育が抑制されず、スイッチが発生しやすくなったため、それに伴い LF の位置変化が起きたものと考えられた。

しかしながら、試験 2 では SW 群で Day 3 から Day 7 の血中 E_2 濃度が高く推移している。これは、第一卵胞波中の E_2 濃度が高く維持された場合、スイッチが発生しにくいと考えられた試験 1 の結果と矛盾している。このような結果をもたらした要因として、スイッチの発生には異なる機序が存在することが考えられる。Ginther ら [2018, 2021] によれば、卵胞波の発生を刺激する FSH サージにおいて、FSH 濃度がコンベンショナル型よりも早期に FSH 濃度の減少期を迎えることで、LF がその低濃度の FSH 環境に順応することができないまま、発育を中止してしまうためにスイッチが発生する。このことから本研究で確認された第一卵胞波中の高 E_2 濃度が

FSH 分泌を早期に抑制することでスイッチを誘発したものと考えられた。このようにスイッチが発生する背景には異なるホルモン動態が存在することが考えられた。しかしながら背景は異なるものの、スイッチの発生に関連して第一卵胞波中の血中 E₂ 濃度が適切に維持されることで試験 1 では NC 群が、試験 2 では SW 群で受胎率が高い値を示したものと考えられた。

過去の報告から FSH 濃度がスイッチの発生機序に関与していることは明らかであるが、本研究では Day 3 から Day 7 において FSH 濃度とスイッチの発生や W1DF の位置変化に関連性を認めなかった。その理由として本研究では、排卵を確認した日 (Day 1) を観察の基準日としたことが挙げられる。主席性獲得と密接に関連する FSH サージの推移を観察する基準として、W1DF が主席性を獲得するとされる 8.5 mm に最も近づいた日を Day 0 とすることが多い [Ginther, 2018, Ginther et al., 2019]。また、FSH 濃度の観察も連日行われており [Ginther, 2018], FSH サージ中の濃度変化を明らかにするには 1 日おきの観察では間隔が長すぎた可能性も考えられる。

受胎率に関しては、試験 1 および試験 2 でスイッチの発生および CL と W1DF の位置関係に着目した 4 群間でも差が認められている。スイッチの発生には CL と近接する発育中の卵胞の位置関係も影響することが報告されている。たとえば、発育中の卵胞が CL と同側にある時、その卵胞は近接する CL の影響を受ける。退行中の CL に近接して発育した卵胞は、血流減少など活性の低下が認められる [Ginther et al., 2016, Domingues and Ginther, 2018]。反対に、発育中の CL に近接して卵胞が発育した場合、卵胞は血流増加、断面積の増加が認められ、その活性は向上する [Ginther et al., 2014]。試験 1 では C_IG 群よりも NC_IG 群で受胎率が高い傾向を示した。NC_IG 群では、第一卵胞波中の発育黄体に近接して卵胞が発育を開始したことで W1DF による E₂ 産生が促進され、受胎性の向上に寄与したものと考えられる。また試験 2 で調査したスイッチの発生割合の結果もこれを支持するものであった。IG 群および CG 群におけるスイッチの発生割合はそれぞれ 16.1%(5/31) および 44.4%(12/27) であり、CG 群のほうがスイッチの発生割合が有意に高い結果となった ($p < 0.05$)。Day 7 における W1DF と CL の位置関係とスイッ

チの種類(スイッチなし:NSW, 同側卵巣内におけるスイッチ:SWIG, 反対側卵巣へのスイッチ:SWCG)からどのような状況でスイッチが発生しやすいのかを調査した。結果は IG 群における SWIG 群, SWCG 群および NSW 群の割合はそれぞれ, 6.5%(2/31), 9.7%(3/31), 83.9%(26/31), CG 群における SWIG 群, SWCG 群および NSW 群の割合はそれぞれ 25.9%(7/27), 18.5%(5/27)および 55.6%(15/27)であり, 6 群の間のそれぞれの関係は明確とはならなかったが, 要因全体としての比率は有意差を認めた。このことは, スイッチが起りやすい条件は第一卵胞波の LF が CL と反対側の卵巣で発育を開始することであり, スイッチ発生後の W1DF が CL と同側または反対側に位置する頻度には差がないことを示している。スイッチが起きた後の W1DF の発育が同側または反対側となるかについては偏りが無いことが観察されており [Siddiqui and Ginther, 2014], 本研究においても同様の結果を示した。反対に, 第一卵胞波の LF が CL と同側卵巣に発育した場合はスイッチが発生しにくく, LF がそのまま W1DF へと発育しやすいといえる。この結果からも試験 1 では, 発育中の CL の影響により近接する LF の発育が支持されることでスイッチが発生しにくく, また LF による E₂産生が増加したことで受胎性の向上に寄与したことが伺える。

一方で, 試験 2 では NSW_CG 群よりも SW_CG 群で有意に高い受胎率を示している。NSW_CG 群は LF が CL と反対側に発育を開始し, その後スイッチが発生することなく主席性を獲得したことを意味する。試験 2 では SW 群と NSW 群間, 3 群間 (SWIG 群, SWCG 群および NSW 群間), 4 群間 (SW_IG 群, SW_CG 群, NSW_IG 群および NSW_CG 群) のいずれにおいても, スイッチの発生がみられなかった群で BFA が高く推移した。Ginther ら [Ginther et al., 2014] は排卵後の第一卵胞波において, 発育中の CL と LF が同側卵巣に発育した時, 卵胞の直径, 主席卵胞壁の血流, CL の断面積, CL の血流が増加することを報告している。これは 2 つの第一卵胞波中の機能的な CL と W1DF が隣接するときにそれぞれが動脈を共有することによって有益な相互作用が得られることを示している。第一卵胞波中の LF が CL と同側卵巣に発育した場合は, LF が発育中の CL と共有する動脈を介して, 発育が促進されることでスイッチ

をすることなく主席性を獲得しやすくなると考えられる。またそれは W1DF および CL の血流量を増加させることで、それぞれの E_2 および P_4 産生を向上させ、受胎性向上に寄与することが考えられた。本研究では排卵後から Day 7 までの観察であり、CL の発育期にあたり、今回の観察で得られた BFA の推移からも示されたように CL の血流量が増加する時期である。Day 1 から Day 7 の間でスイッチが発生しなかった場合に血流量が多く推移したことから、試験 1 の NC_IG 群では隣接する CL の豊富な血流の影響を受けて、発育が促進され、スイッチを起こさなかったものと考えられた。換言すれば、第一卵胞波中に発育中の CL と反対側に LF が発育を開始した試験 2 の NSW_CG 群では CL の発育に伴う有益な影響を受けられず、受胎性が低下したものと考えられる。CL と血中 P_4 濃度にはいずれの比較群においても有意差は認められなかったものの、BFA に差がみられたことは CL の機能にも差があることを示唆する結果である。CL の形態的な変化よりも BFA は CL の機能を反映しており、血中 P_4 濃度を反映する指標である [Luttgenau and Bollwein, 2014]。しかしながら本研究では P_4 濃度に差がみられていないため、黄体機能の差は局所に局限している可能性や Day 7 以降の血中 P_4 濃度に差がみられる可能性が考えられるが本研究では明らかにすることはできなかった。

以上の結果から、第一卵胞波中の受胎性に与える要因には、W1DF の選抜過程とそれによるホルモン動態の変化および CL と W1DF の位置関係が関与していることが考えられた。

3-5. 小括

W1DF の発育過程に関連した受胎率の改善は、第一卵胞波の時期に高く維持された E_2 が関与している可能性が示唆された。また LF の位置変化の有無により受胎率に有意差を得たことから、W1DF が局所的な影響を及ぼしている可能性が考えられた。

第一卵胞波中のスイッチの発生には、CL の状態と LF との位置関係が関与しており、W1DF と CL の位置関係は W1DF の発育過程に関与して受胎性に影響していることが伺えた。

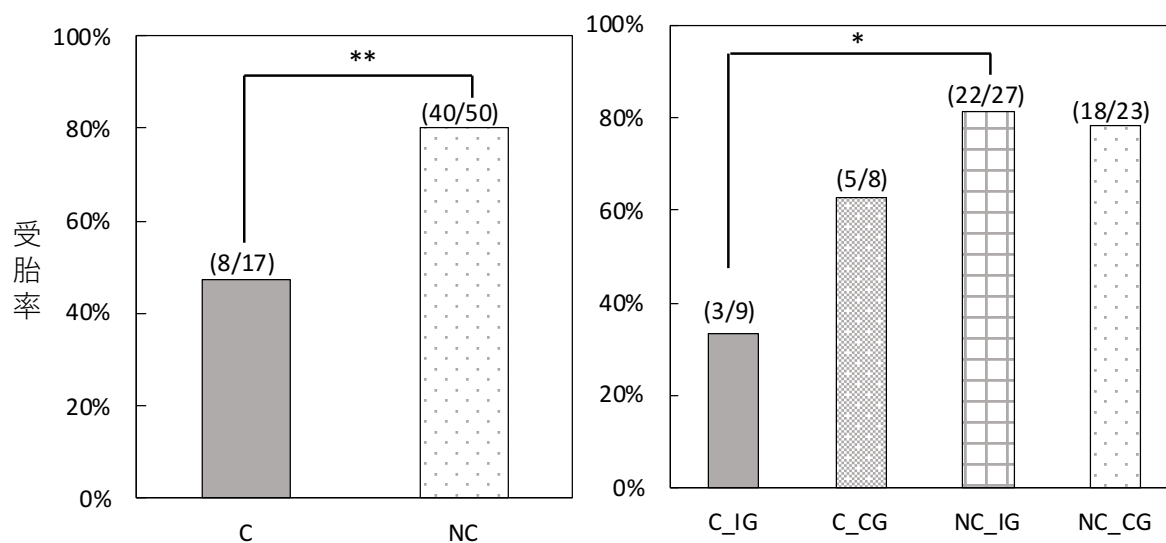


図9. C群とNC群および4群(C_IG群, C.CG群, NC_IG群およびNC.CG群)の受胎率
 第一卵胞波中に最大卵胞(LF)の位置変化が発生しなかった群(NC)に比較して位置変化が発生した群(C)で有意に低い値を示した(**:p<0.05)。4群間の比較では第一卵胞波中に位置変化が発生せず、かつDay 7において第一卵胞波主席卵胞(W1DF)と黄体(CL)が同一卵巣内に存在する群(NC_IG)に比較して位置変化が発生し、かつDay 7においてW1DFとCLが同一卵巣内に存在する群(C_IG)で受胎率が低い傾向が認められた(*:p<0.1)。C.CG：第一卵胞波中にLFの位置変化が発生し、かつDay 7においてW1DFとCLが反対側卵巣に存在する群、NC.CG：第一卵胞波中にLFの位置変化が発生せず、かつDay 7においてW1DFとCLが反対側卵巣に存在する群。

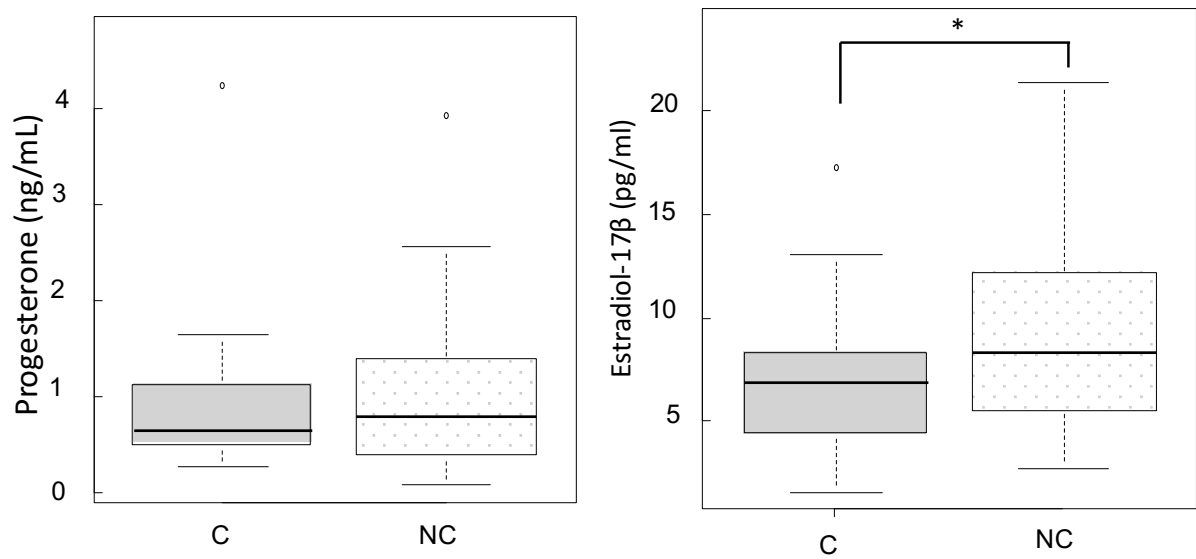


図10. C群とNC群のDay 0における血漿中P₄およびE₂濃度
 血漿中P₄濃度に群間差は認められなかった。血漿中E₂濃度は第一卵胞波中に最大卵胞(LF)の位置変化が発生した群(C)で低い傾向を認めた(*: p<0.1)。NC：第一卵胞波中にLFの位置変化が発生しなかった群。

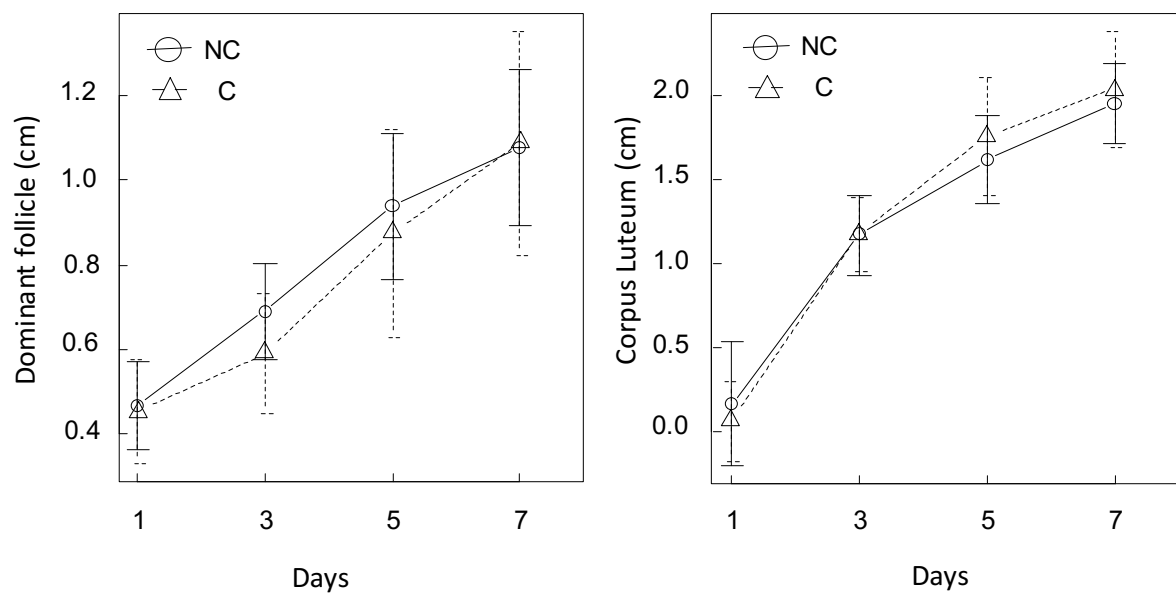


図11. NC群およびC群における卵巢構造物の動態

いずれの項目においても第一卵胞波中に最大卵胞(LF)の位置変化が発生した群(C)と第一卵胞波中にLFの位置変化が発生しなかった群(NC)群の間に有意差は認められなかった。

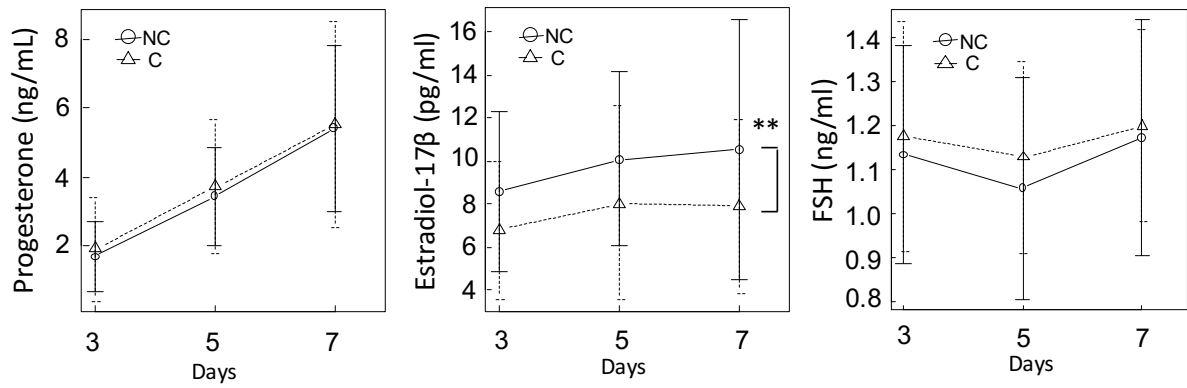


図12. NC群およびC群におけるホルモン動態

血漿中 E_2 濃度は第一卵胞波中に最大卵胞(LF)の位置変化が発生しなかった群(NC)で有意に高く推移した(**: $p < 0.05$)。血漿中 P_4 およびFSH濃度は両群間で有意差は認められなかった。C：第一卵胞波中にLFの位置変化が発生した群。

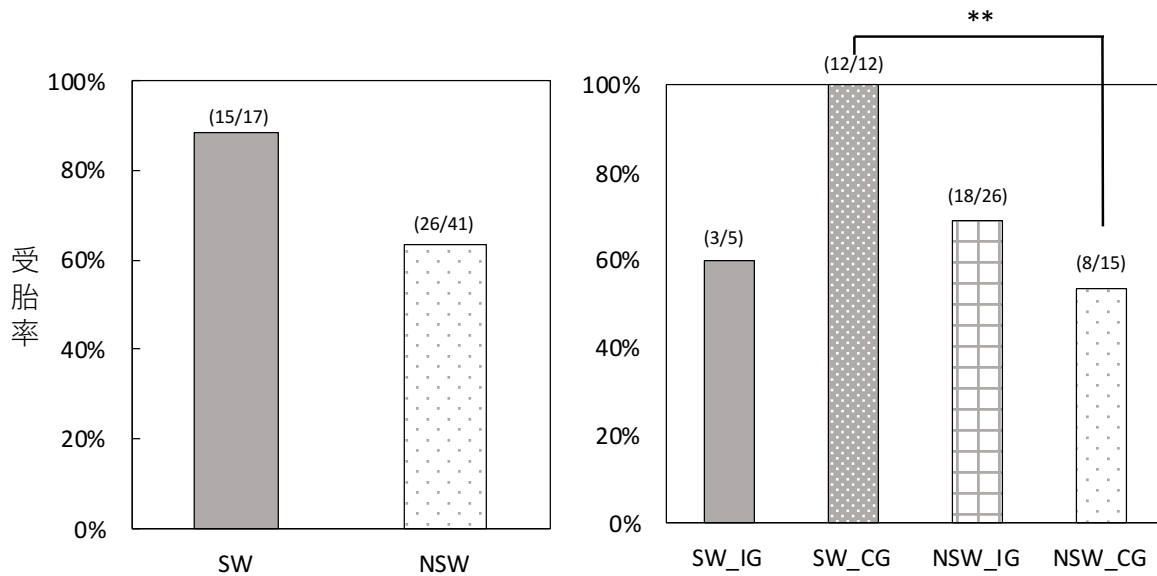


図13. SW群とNSW群および4群(SW_IG群, SW_CG群, NSW_IG群およびNSW_CG群)の受胎率
 第一卵胞波中にスイッチが発生した群(SW)とスイッチが発生しなかった群(NSW)の間に
 有意差は認められなかった。4群間の比較では、第一卵胞波中にスイッチが発生し、かつ
 Day 7において第一卵胞波主席卵胞(W1DF)と黄体(CL)が反対側卵巢に存在する群
 (SW_CG)に比較してスイッチが発生せず、かつDay 7においてW1DFとCLが反対側卵巢に
 存在する群(NSW_CG)で有意に低い受胎率を示した(**:p<0.05)。SW_IG：第一卵胞波中に
 スイッチが発生し、かつDay 7においてW1DFとCLが同一卵巢内に存在する群、NSW_IG：
 スイッチが発生せず、かつDay 7においてW1DFとCLが同一卵巢内に存在する群。

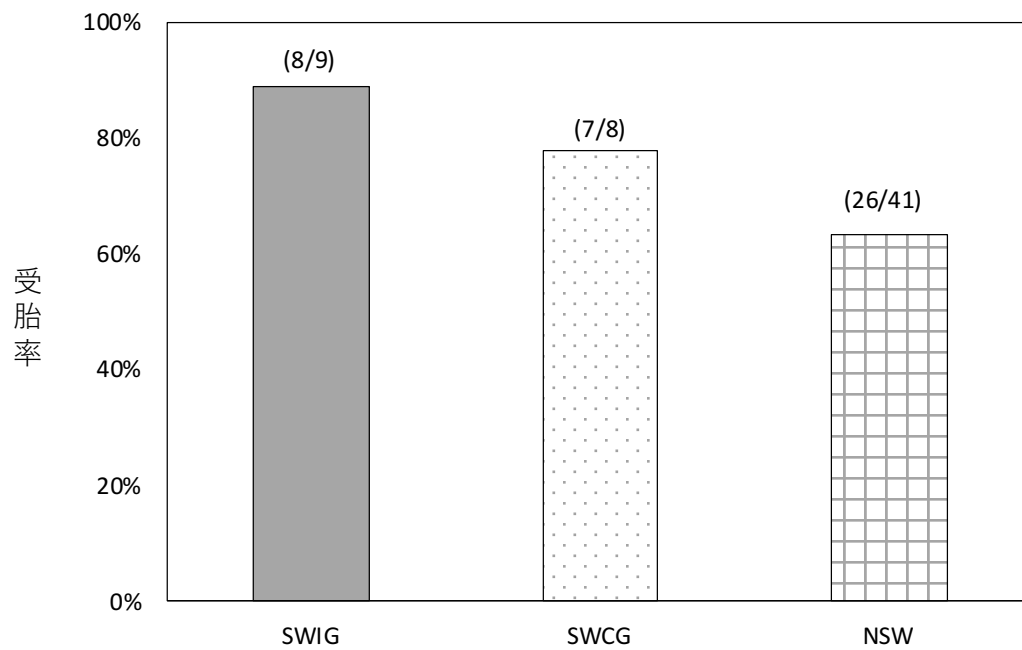


図14. SWIG群, SWCG群およびNSW群の受胎率
 第一卵胞波中にスイッチが同一卵巣内で発生した群(SWIG), スイッチが反対側卵巣に発生した群(SWCG)およびスイッチが発生しなかった群(NSW)の3群間に有意差は認められなかった。

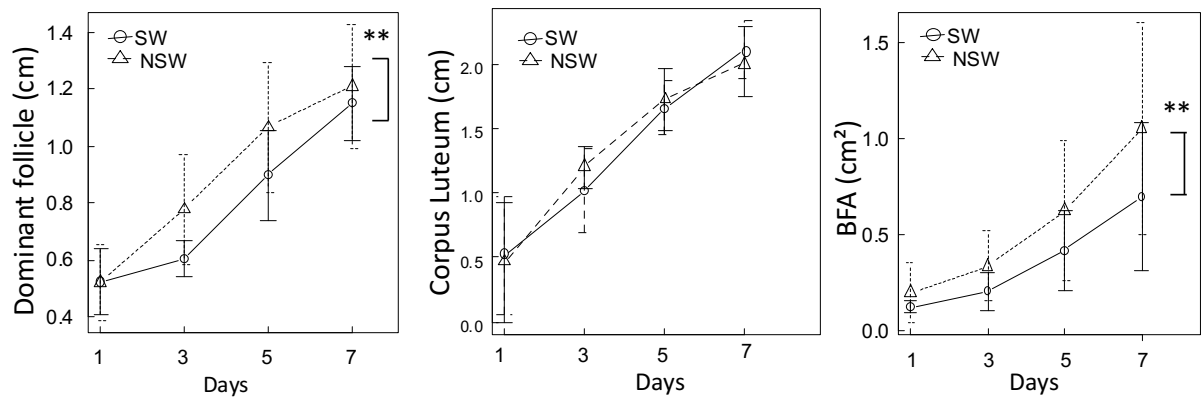


図15. SW群とNSW群における卵巢構造物の動態

W1DFの直径およびBFAは第一卵胞波中にスイッチが発生しなかった群(NSW)で有意に大きく推移した(**: $p < 0.05$)。SW: 第一卵胞波中にスイッチが発生した群。

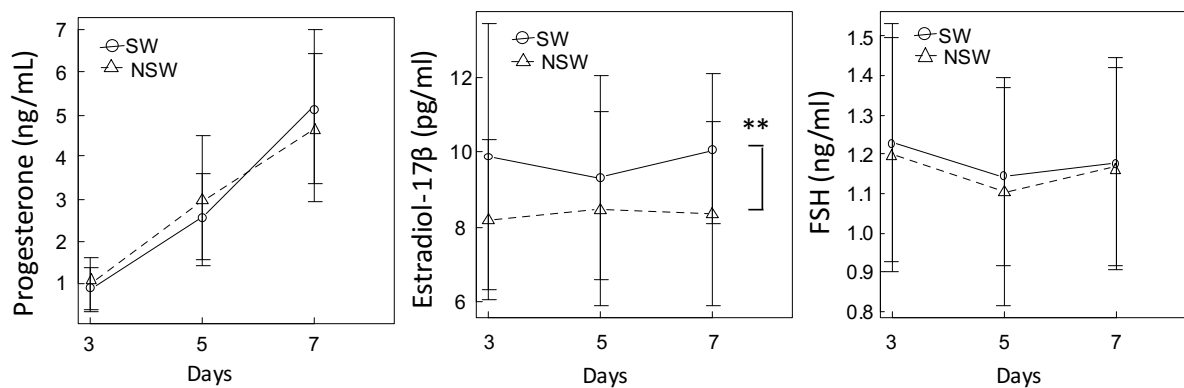


図16. SW群とNSW群におけるホルモン動態動態

血中 E_2 濃度の推移で有意差を認め、第一卵胞波中にスイッチが発生しなかった群(NSW)に比較してスイッチが発生した群(SW)で有意に高く推移した (**: $p < 0.05$)。血中 P_4 およびFSH濃度は両群間で有意差を認めなかった。

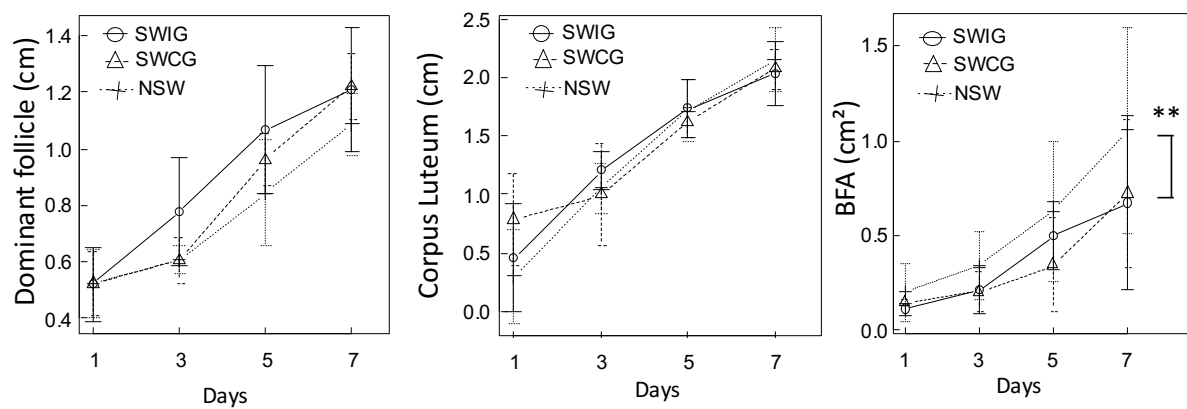


図17. SWIG群, SWCG群およびNSW群における卵巣構造物の動態
 BFAで有意差が認められ, 第一卵胞波中にスイッチが発生しなかった群(NSW)で最も大きく推移した(**:p<0.05)。SWIG:スイッチが同側卵巣内で発生した群, SWCG:スイッチが反対側卵巣に発生した群。

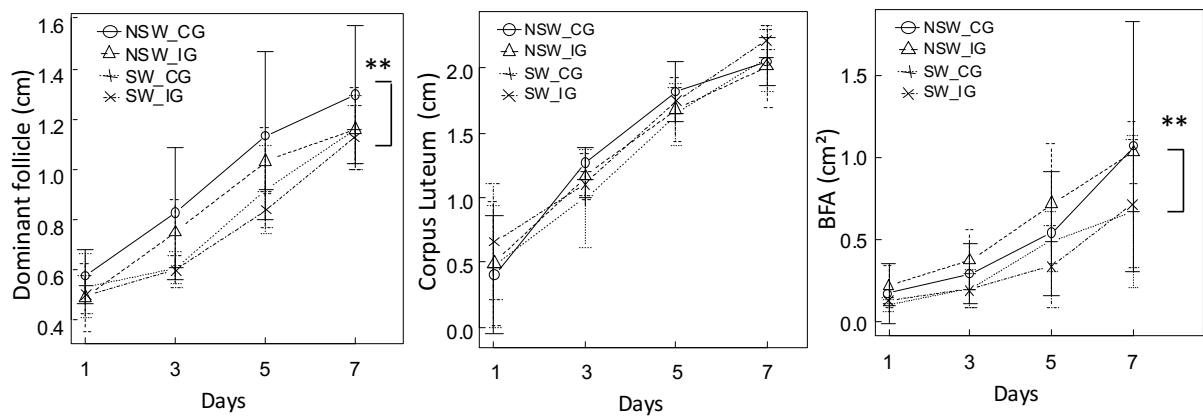


図18. NSW_CG群, NSW_IG群, SW_CG群およびSW_IG群における卵巢構造物の動態
W1DFの直径およびBFAで有意差が認められた(**: $p < 0.05$)。NSW_CG：第一卵胞波中にスイッチが発生せず，かつDay 7においてW1DFとCLが反対側卵巢に存在する群，
NSW_IG：スイッチが発生せず，かつW1DFとCLが同一卵巢内に存在する群，SW_CG：
スイッチが発生し，かつW1DFとCLが反対側卵巢に存在する群，SW_IG：スイッチが発生し，
かつW1DFとCLが同一卵巢内に存在する群。

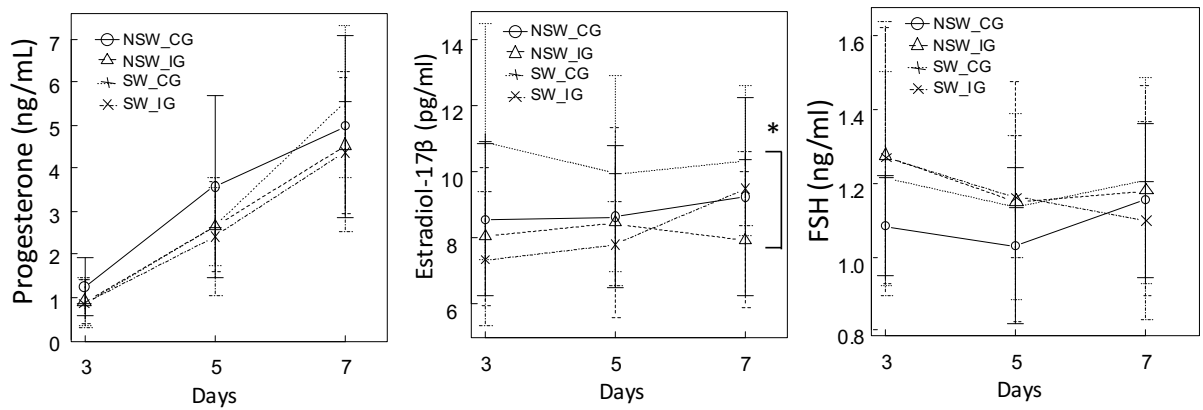


図19. NSW_CG群, NSW_IG群, SW_CG群およびSW_IG群におけるホルモン動態
 血中E₂濃度に差の傾向を認めた(*: p<0.1)。NSW_CG：第一卵胞波中にスイッチが発生せず、かつDay 7においてW1DFとCLが反対側卵巣に存在する群，NSW_IG：スイッチが発生せず、かつW1DFとCLが同一卵巣内に存在する群，SW_CG：スイッチが発生し、かつW1DFとCLが反対側卵巣に存在する群，SW_IG：スイッチが発生し、かつW1DFとCLが同一卵巣内に存在する群。

第4章 総括

黒毛和種は国内の肉用牛の約70%を占める品種であり、飼養戸数の減少に伴う、飼養形態の変化(農場の大規模化)、黒毛和種子牛の取引頭数減少などを背景に、その繁殖成績向上のための技術開発が望まれている。また、日本特有の品種であることから、ホルスタイン種を代表とする欧米原産の乳用牛に比較して、その繁殖生理の詳細を観察した調査は多くない。加えて、黒毛和種繁殖雌牛の周排卵期における卵巣動態が受胎性に与える影響についてはあまり明らかにされてこなかった。

繁殖成績の向上を目的とした技術の一つとして、発情を示さない牛に対して、AI実施の前処置として行う授精プログラムが発展した。一方で、発情を示した牛に対してAI実施時やその後の卵巣動態から受胎性を評価する方法はあまり注目されてこなかった。しかしながら近年、ホルスタイン種において、第一卵胞液中のW1DFとCLの位置関係が受胎性に影響する[Miura et al., 2015]という報告がなされ、第一卵胞液中の卵巣動態およびホルモン動態が受胎性に与える影響が注目されている。そこで、本研究では、AI実施時およびその後の第一卵胞波の時期の卵巣およびホルモン動態を観察し、黒毛和種繁殖雌牛における周排卵期の卵胞発育動態が受胎性に与える影響を調査するために研究を行った。

第1章では本研究において共通する観察手法について解説した。

第2章では、受胎牛と不受胎牛の周排卵期の卵胞発育動態を観察することで、受胎性に影響を与える要因を検索した。発情時の要因としてPFの平均直径が受胎性に影響することが明らかとなった。PFの平均直径は受胎群で 1.27 ± 0.17 cmであったのに対し、不受胎群では 1.38 ± 0.21 cmと有意に大きい値を示した。またDay0における血中 E_2 濃度は受胎群で高い傾向がみられた。排卵誘起をした場合にはPFの大きさが1.1 cm以下の場合に受胎率が低下することが報告されている[Perry et al., 2005]。卵胞液中の E_2 濃度が高い卵胞では、黄体化した顆粒層細胞における P_4 分泌能力が高い[McNatty et al., 1979]。このことからPFの平均直径が小さい場合には、卵胞の E_2

産生能に反映される卵胞の成熟度が不十分なために排卵後の P₄ 分泌が刺激されず、結果として排卵後の血中 P₄ 濃度が十分に保たれずに、受胎成績の低下を招いたと考えられている [Perry et al., 2005]。しかしながら本研究で AI を実施した個体は発情徴候を示しており、さらには排卵を認めたものである。また不受胎群に比較して受胎群で Day 0 時点の血中 E₂ 濃度が高いことから、平均直径が小さいものであっても生理的に成熟していたものと考えられる。一方で、PF の平均直径を 0.15 cm ごとに分類したロジスティック回帰分析では、PF の平均直径が 1.45 cm 以上である場合に有意に受胎率が低下した。体外成熟、体外受精および体外培養を行った研究では、卵胞の大きさは卵子の大きさに比例しており、受精後の発育能力に関連していることが報告されている [Arlotto et al., 1996]。加えて、卵子が大きいほど分裂率や胚盤胞への発育率が高くなることも観察されている。しかしながら、130 μm 以上の卵子では胚盤胞で発育したものはなかった [Otoi et al., 1997]。これらの報告から、大きすぎる PF では卵子の発育能力が低下していることにより、受胎率が低下したものと考えられた。以上より、発情時の E₂ 産生は PF の成熟を反映したものであり、AI 時の血中 E₂ 濃度と PF の平均直径は受胎性の指標となりうるということが明らかとなった。

受胎性に影響を及ぼす第一卵胞液中の要因として W1DF と CL の位置関係および卵胞の選抜過程についてロジスティック回帰分析を用いて検討した。結果は黒毛和種において W1DF と CL の位置関係が受胎性に与える影響はホルスタイン種の場合ほど強くないというものであった。本研究において既報 [Miura et al., 2015] と異なる結果が得られた要因として、品種の違いが挙げられる。ホルスタイン種は泌乳量が多いために採食量も増加する。それに伴い、肝血流量が増加することによってステロイド代謝が亢進することが知られている [Sangsrivong et al., 2002]。ホルスタイン種は泌乳に関連して負のエネルギーバランスを経験する。このことは両品種の間に代謝状態の違いをもたらす [Shingu et al., 2002]。代謝ホルモンであるインスリンや IGF-1 は顆粒層細胞における E₂ 産生 [Gutierrez et al., 1997, Glistler et al., 2001, Shingu et al., 2002, Butler et al., 2004] や卵胞産生の増生 [Spicer et al., 1993, Spicer and Stewart, 1996] を刺激する。非泌乳の黒毛和種と泌乳中のホルスタイン種の発情周期中の血中インスリン濃度を調べた研究では、黒毛和種ではイ

ンスリンの変動がみられたのに対し、ホルスタイン種では変動が認められなかった[Kawashima et al., 2007]。インスリンの濃度変化は E₂ 濃度の変化に伴ってみられる[Kawashima et al., 2007]のものであり、これらの報告からも代謝状態や品種の差が繁殖生理に関連していることが推察される。このことが W1DF と CL の位置関係が受胎性に与える影響の程度に差をもたらした可能性がある。さらに、W1DF と CL の位置関係が W1DF 中にもたらす変化を観察することを目的に、IG 群と CG 群で比較を行った。両群の間で受胎率に有意差は認められなかった。第一卵胞波中の W1DF、CL の大きさおよび BFA にも両群間で有意差は認められず、血中 E₂、P₄ および FSH 濃度にも有意差は認めなかった。黒毛和種繁殖牛において、第一卵胞波中の W1DF と CL の位置関係はそれぞれに形態的な変化をもたらさず、全身循環のホルモン濃度に現れる機能的変化も起こさなかったといえる。しかしながら、有意差はないものの W1DF が CL と反対側に位置する群のほうが高い受胎率を示しており、黒毛和種において第一卵胞波中の W1DF と CL の位置関係が受胎性と無関係であると断言することはできない。

また第一卵胞波に関するもう一つの要因として W1DF の発育過程について、スイッチの発生により LF の位置変化が起こることが受胎性に影響する可能性が示唆された。受胎率はスイッチの発生により LF の位置が変化した場合に低い値を示し、ロジスティック回帰分析の結果からもスイッチによる LF の位置変化によって受胎性が低下する可能性が示された。この結果から、スイッチの発生により LF の位置変化が発生することで受胎性に何らかの影響を及ぼしていることが考えられた。しかしながら第 2 章では位置変化を伴わないスイッチを観察の対象としていなかったため、スイッチの発生を誘発する内分泌的機構、スイッチの発生そのもの、あるいはスイッチの発生による LF の位置変化のうち、どの条件が要因であるのかを明らかにすることができなかった。

つまり排卵後の第一卵胞波中の卵胞発育動態は受胎性に影響を与えていることが示唆されたが、その詳細についてはさらに調査する必要がある。

そこで第 3 章では、第 2 章で明らかとなった第一卵胞波中における受胎性に与える新たな要因

として、主席卵胞の発育過程を観察した。第一卵胞波は排卵後に発現する最初の卵胞波である。排卵に伴う血中 E_2 濃度の急減に伴って、それまで抑制されていた FSH 分泌が回復し、排卵終了後の卵巣において小卵胞が発育を開始する [Ginther et al., 1989, Ginther et al., 2000, Haughian et al., 2013]。小卵胞群の発育が進むにつれて、卵胞からのインヒビリンや E_2 が再び FSH 分泌を抑制する [Gibbons et al., 1997, Ginther et al., 2000, Ginther, 2016]。また上昇した E_2 は GnRH を介してパルス状の LH 分泌を刺激する [Ginther et al., 2001, Haughian et al., 2013]。この時、最大直径を示す卵胞は顆粒層細胞での LH 受容体の発現上昇 [Ginther et al., 1989, Xu et al., 1995] によって、FSH 依存性の発育から LH 依存性の発育へ移行することで、発育継続を可能にして主席性を獲得する [Beg et al., 2001, Ginther et al., 2001]。一方で、その他の小卵胞は LH 依存性の発育に移行できず、また主席卵胞から分泌される E_2 によって FSH が低濃度に維持されることで、発育を継続することができずに閉鎖する [Ginther, 2016]。この過程により通常、一つの卵胞波中には一つの主席卵胞が選抜され、これを第一卵胞波主席卵胞(W1DF)という。この W1DF の過程には最大直径を示す卵胞(LF)と次に大きな直径を示す卵胞(SF)の発育動態から大きく 3 つの分類が存在する。1 つ目はコンベンショナル型と呼ばれる最も一般的な発育過程である。これは LF が発育開始から最大直径を示し、SF に大きさを越されることなく W1DF へと発育する。このとき SF は 7.0 mm を超えている。2 つ目はアンダーサイズ型と呼ばれ、コンベンショナル型とほとんど同じであるが、SF が 7.0 mm を超えないことで定義される。3 つ目がスイッチ型であり、これは LF が発育過程の中で SF に大きさを越され、主席性を獲得することなく閉鎖し、代わりに SF が W1DF となる [Ginther et al., 2016, Ginther, 2018, Ginther et al., 2018]。スイッチ型は他の 2 つの型と異なり、最大直径を示した LF は主席性を獲得せず、最終的に SF が主席性を獲得し、W1DF となることが特徴である。

スイッチ型の発生機序にはいくつかの報告がある。まず一つは FSH に関連した発生である。卵胞波における小卵胞の発育を刺激する FSH サージはコンベンショナル型に比べてスイッチ型で早期に立ち上がりそして早期に減少を開始する。また、この減少期の FSH 濃度もコンベンシ

ル型に比べてスイッチ型で低い。そのため LF が LH 依存型の発育に移行する前の段階である FSH 依存性の発育中に FSH 濃度が低下してしまい、LF が発育を継続できなくなってしまうためにスイッチが発生する [Ginther, 2018, Ginther, 2021]。または CL の発育に関連した発生も報告されている。これには CL が退行期であるか発育期であるかによって 2 通りが考えられている。CL の退行期では、退行黄体のそばに発育した LF がそのネガティブな影響を受けて発育が停滞し、主席性を獲得することなくスイッチが発生する。CL の発育期では、発育中の黄体のそばに発育した SF がそのポジティブな影響を受けて、発育が促進されることでスイッチが発生する [Ginther et al., 2015]。

このようにスイッチの発生には FSH や CL の発育状態が関与しており、スイッチの発生の有無が直接的に繁殖機能へ影響しているとは言い難い。しかしながら、本研究ではスイッチに伴う LF の位置変化が発生しなかった場合には有意に受胎率が高く、スイッチが発生した場合には受胎率が高い傾向を示した。この結果は、スイッチの発生に関連する第一卵胞波中の血中 E_2 濃度に起因したものであることが考えられた。第一卵胞波中の卵管や子宮における E_2 の役割は明らかにはなっていない。卵巣摘出した雌羊を用いて胚移植を行った研究では、 E_2 処置を行った場合に受胎成績の向上、子宮重量や子宮内腔のタンパク質量の増加が確認されており [Madsen et al., 2015]、 E_2 が子宮の機能や胚の発育に重要な役割を果たしていることを示唆している。また E_2 の投与によって、 $PGF_{2\alpha}$ の代謝産物である PGFM が増加することが報告されておる [Knickerbocker et al., 1986, Thatcher et al., 1986]、この上昇は E_2 がプロスタノイド合成に関与していることを表している。また E_2 は子宮内膜において PGE_2 と $PGF_{2\alpha}$ 産生を増加させることが報告されている [Li et al., 2020]。雌羊において PGE_2 は子宮血管床の拡大を引き起こす [Resnik and Brink, 1978, Still and Greiss, 1978]。またウシの黄体初期の CL は黄体退行作用のある $PGF_{2\alpha}$ の働きは弱く、 E_2 が PG 合成を介して卵管や子宮の微小環境を制御することで、妊娠成立に良い影響を与えている可能性がある。また排卵後、卵子が受精して子宮に進入するまでの約 4 日間は、受精卵は卵管内で過ごす [Forde and Lonergan, 2017]。この期間の E_2 は卵管内の IGF mRNA の発現を増加させる働きが

あり [Pushpakumara et al., 2002], これにより卵管内が IGF の豊富な環境となる。特に IGF1 は *in vitro* において胚盤胞を形成するのを直接的に刺激することが知られている [Moreira et al., 2002]。これらのことから, W1DF の発育過程に関連した受胎性の改善は, 第一卵胞波の時期に高く維持された E_2 が卵管や子宮の微小環境や胚の生存に関わることで生じたと考えられた。

本研究では, 第一卵胞波の LF が CL と反対側卵巢で発育を開始するとき, スイッチが発生しやすいことが示された。また, スイッチの発生がみられない場合には BFA が大きいことが確認された。このことは, スイッチの発生には卵胞発育開始時の CL との位置関係が関与していることを示している。前述したように, LF が発育中の CL に隣接するとき両者は動脈を介して有益な影響を相互に受ける。それは卵胞の直径, 卵胞壁血流量, 黄体断面積, 黄体血流量を増加させる [Ginther et al., 2014]。雌羊の PF において排卵直前の卵胞壁の血流量が増加するのに伴って, 血中 E_2 濃度も増加することが観察されている [El-Sherry et al., 2013]。このことは W1DF においても排卵卵胞壁の血流量増加に伴い E_2 産生能が刺激されることが考えられる。また黄体血流量の増加は黄体の P_4 産生能を反映することが知られている [Luttgenau and Bollwein, 2014]。つまり LF が CL と同側卵巢内に発育した場合では, 発育中の CL から動脈を介した豊富な血流の影響により, 卵胞発育が支持されてスイッチの発生を抑制し, また E_2 産生も刺激されることで卵管や子宮の局所環境を妊娠成立や胚発育に適したものに改善することで受胎性の向上に寄与する事が推察される。さらには発育中の CL も有益な影響を受け血流量の増加により P_4 産生能が向上し, これも受胎性に寄与していることが考えられた。反対に発育中の CL と反対側卵巢に LF が発育した場合, スイッチの発生がないにもかかわらず受胎性が低下することが観察された。これは LF が発育中の黄体と動脈を共有することがないため, 前述した LF の E_2 産生向上や CL の P_4 産生向上などの, 受胎性に有用と考えられる変化が生じないため, 受胎性に悪影響を及ぼしたものと推察された。

以上, 第 2 章から第 4 章までに行った研究から, 周排卵期における卵胞発育過程が黒毛和種繁殖雌牛の受胎性に及ぼす影響が明らかとなった。つまり, 発情時において, PF の平均直径と血中 E_2 濃度は PF の成熟状態を反映していることが示された。また第一卵胞波の時期においては,

W1DF の発育過程に関連した血中 E₂ 濃度の変化が受胎性に影響する可能性が示された。さらには、W1DF の発育過程は、発育中の LF と CL の位置関係の影響を受ける可能性も示された。

本研究は黒毛和種繁殖雌牛の周排卵期の卵胞発育を詳細に検討し、第一卵胞波中の卵胞発育動態が受胎性に影響するという新たな知見が得られた。本研究の成果は、繁殖技術の改善に貢献できるものと期待される。

謝辞

本稿を終えるに臨み、御指導を賜りました岩手大学農学部共同獣医学科繁殖機能制御学研究
高橋透教授に深謝いたします。また、本論文作成にあたり御校閲いただきました岩手大学 木崎
景一郎教授、岩手大学 岡田啓司教授、東京農工大学 田中知己教授、東京農工大学 永岡謙太
郎教授に深謝いたします。そして、本研究を始める契機を作って頂いた岩手大学 佐藤繁名誉教
授、福島県農業共済組合 山野辺浩先生、高橋忠雄先生に感謝の意を表します。

実験に際し貴重な牛を快く提供していただいた、福島県内の黒毛和種繁殖農家の皆様に深謝い
たします。

また、忙しいところ日々の業務に協力して頂いた福島県農業共済組合の皆様、いわせ石川家畜
診療センターの皆様に感謝いたします。

そして、研究に協力して下さった繁殖機能制御学研究室の大学院生、学部学生の皆様に感謝
いたします。

最後に、今日に至るまでの長きにわたって支えていただいた家族に心から感謝の意を表しま
す。

参考文献

- Acosta, T. J., N. Yoshizawa, M. Ohtani and A. Miyamoto (2002). "Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F(2 alpha) injection in the cow." *Biology of Reproduction* **66**(3): 651-658.
- Adashi, E. Y. and A. J. Hsueh (1982). "Estrogens augment the stimulation of ovarian aromatase activity by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells." *Journal of Biological Chemistry* **257**(11): 6077-6083.
- Arlotto, T., J. L. Schwartz, N. L. First and M. L. Leibfried-Rutledge (1996). "Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes." *Theriogenology* **45**(5): 943-956.
- Armstrong, D. G., J. G. Gong and R. Webb (2003). "Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms." *Reprod Suppl* **61**: 403-414.
- Beg, M. A., D. R. Bergfelt, K. Kot, M. C. Wiltbank and O. J. Ginther (2001). "Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle." *Biology of Reproduction* **64**(2): 432-441.
- Bello, N. M., J. P. Steibel and J. R. Pursley (2006). "Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of ovsynch in lactating dairy cows." *Journal of Dairy Science* **89**(9): 3413-3424.
- Bicalho, R. C., K. N. Galvao, C. L. Guard and J. E. Santos (2008). "Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows." *Theriogenology* **70**(2): 199-207.
- Boer, H. M., R. F. Veerkamp, B. Beerda and H. Woelders (2010). "Estrous behavior in dairy cows: identification of underlying mechanisms and gene functions." *Animal* **4**(3): 446-453.
- Bridges, G. A., J. K. Ahola, C. Brauner, L. H. Cruppe, J. C. Currin, M. L. Day, P. J. Gunn, J. R. Jaeger,

- S. L. Lake, G. C. Lamb, G. H. Marquezini, R. K. Peel, A. E. Radunz, J. S. Stevenson and W. D. Whittier (2012). "Determination of the appropriate delivery of prostaglandin F₂alpha in the five-day CO-Synch + controlled intravaginal drug release protocol in suckled beef cows." *Journal of Animal Science* **90**(13): 4814-4822.
- Butler, S. T., S. H. Pelton and W. R. Butler (2004). "Insulin increases 17 beta-estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows." *Reproduction* **127**(5): 537-545.
- Cerbito, W. A., A. Miyamoto, C. R. Balagapo, Jr., N. G. Natural, K. Miyazawa and K. Sato (1994). "Prostaglandin E₂ levels in uterine tissues and its relationship with uterine and luteal progesterone during the estrous cycle in dairy cows." *Theriogenology* **42**(6): 941-950.
- Colazo, M. G., A. Behrouzi, D. J. Ambrose and R. J. Mapletoft (2015). "Diameter of the ovulatory follicle at timed artificial insemination as a predictor of pregnancy status in lactating dairy cows subjected to GnRH-based protocols." *Theriogenology* **84**(3): 377-383.
- Colazo, M. G., J. P. Kastelic and R. J. Mapletoft (2003). "Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers." *Theriogenology* **60**(5): 855-865.
- Colazo, M. G. and R. J. Mapletoft (2014). "A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle." *Canadian Veterinary Journal* **55**(8): 772-780.
- Diskin, M. G. and D. G. Morris (2008). "Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants." *Reprod Domest Anim* **43 Suppl 2**: 260-267.
- Dobson, H., S. L. Walker, M. J. Morris, J. E. Routly and R. F. Smith (2008). "Why is it getting more difficult to successfully artificially inseminate dairy cows?" *Animal* **2**(8): 1104-1111.
- Domingues, R. R. and O. J. Ginther (2018). "Angiocoupling between the dominant follicle and corpus luteum during waves 1 and 2 in *Bos taurus* heifers." *Theriogenology* **114**: 109-115.

- El-Sheikh Ali, H., G. Kitahara, T. Takahashi, S. Mido, M. Sadawy, I. Kobayashi, K. Hemmi and T. Osawa (2017). "Plasma anti-Mullerian hormone profile in heifers from birth through puberty and relationship with puberty onset." *Biology of Reproduction* **97**(1): 153-161.
- El-Sherry, T. M., R. Derar and R. Bakry (2013). "Changes in blood flow in ovine follicles and serum concentration of estradiol 17 beta (E2) and nitric oxide (NO) around the time of ovulation in Ossimi ewes." *Animal Reproduction Science* **138**(3-4): 188-193.
- Forde, N., M. E. Beltman, P. Lonergan, M. Diskin, J. F. Roche and M. A. Crowe (2011). "Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle." *Animal Reproduction Science* **124**(3-4): 163-169.
- Forde, N. and P. Lonergan (2017). "Interferon-tau and fertility in ruminants." *Reproduction* **154**(5): F33-F43.
- Geary, T. W., J. C. Whittier, D. M. Hallford and M. D. MacNeil (2001). "Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and CO-Synch protocols." *Journal of Animal Science* **79**(1): 1-4.
- Gibbons, J. R., M. C. Wiltbank and O. J. Ginther (1997). "Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers." *Biology of Reproduction* **57**(5): 1066-1073.
- Ginther, O. J. (2016). "The theory of follicle selection in cattle." *Domestic Animal Endocrinology* **57**: 85-99.
- Ginther, O. J. (2018). "Spontaneous switching of future dominance to a smaller follicle: commonality among monovular species." *Biology of Reproduction* **99**(6): 1129-1136.
- Ginther, O. J. (2018). "Variations in follicle-diameter deviation and a growth spurt in the dominant follicle at deviation in *Bos taurus* heifers." *Animal Reproduction Science* **188**: 155-164.
- Ginther, O. J. (2021). "Switching of follicle destiny so that the second largest follicle becomes dominant in monovulatory species." *Theriogenology* **171**: 147-154.

- Ginther, O. J., J. M. Baldrighi, M. A. Siddiqui and E. R. Araujo (2016). "Complexities of follicle deviation during selection of a dominant follicle in *Bos taurus* heifers." *Theriogenology* **86**(8): 2012-2019.
- Ginther, O. J., M. A. Beg, D. R. Bergfelt, F. X. Donadeu and K. Kot (2001). "Follicle selection in monovular species." *Biology of Reproduction* **65**(3): 638-647.
- Ginther, O. J., D. R. Bergfelt, M. A. Beg and K. Kot (2001). "Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone." *Biology of Reproduction* **64**(1): 197-205.
- Ginther, O. J., D. R. Bergfelt, L. J. Kulick and K. Kot (2000). "Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol." *Biology of Reproduction* **63**(2): 383-389.
- Ginther, O. J., D. R. Bergfelt, L. J. Kulick and K. Kot (2000). "Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles." *Biology of Reproduction* **62**(4): 920-927.
- Ginther, O. J., S. V. Dangudubiyam and R. R. Domingues (2019). "Follicle blood flow and FSH concentration associated with variations in characteristics of follicle selection in heifers." *Theriogenology* **125**: 93-101.
- Ginther, O. J., R. R. Domingues, S. V. Dangudubiyam and E. R. Araujo (2018). "Gonadotropin concentrations associated with variations in diameter deviation during follicle selection in Holstein heifers." *Animal Reproduction Science* **192**: 271-279.
- Ginther, O. J., L. Knopf and J. P. Kastelic (1989). "Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves." *Journal of Reproduction and Fertility* **87**(1): 223-230.
- Ginther, O. J., H. B. Rakesh and M. M. Hoffman (2014). "Blood flow to follicles and CL during development of the periovulatory follicular wave in heifers." *Theriogenology* **82**(2): 304-311.
- Ginther, O. J., M. A. Siddiqui and J. M. Baldrighi (2016). "Functional angiocoupling between follicles

- and adjacent corpus luteum in heifers." *Theriogenology* **86**(2): 465-471.
- Ginther, O. J., M. A. Siddiqui, J. M. Baldrighi and M. M. Hoffman (2014). "Effect of intraovarian proximity between dominant follicle and corpus luteum on dimensions and blood flow of each structure in heifers." *Theriogenology* **82**(6): 875-883.
- Ginther, O. J., M. A. Siddiqui, J. M. Baldrighi and M. M. Hoffman (2015). "Intraovarian factors associated with switching of a future dominant follicle to a subordinate follicle during induced luteolysis in heifers." *Theriogenology* **83**(5): 786-796.
- Ginther, O. J., M. A. Siddiqui, J. M. Baldrighi, C. A. Wolf and J. M. Greene (2015). "Differences between follicular waves 1 and 2 in patterns of emergence of 2-mm follicles, associated FSH surges, and ovarian vascular perfusion in heifers." *Theriogenology* **84**(6): 853-861.
- Glister, C., D. S. Tannetta, N. P. Groome and P. G. Knight (2001). "Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells." *Biology of Reproduction* **65**(4): 1020-1028.
- Gutierrez, C. G., B. K. Campbell and R. Webb (1997). "Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics." *Biology of Reproduction* **56**(3): 608-616.
- Haughian, J. M., O. J. Ginther, F. J. Diaz and M. C. Wiltbank (2013). "Gonadotropin-releasing hormone, estradiol, and inhibin regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone surges: implications for follicle emergence and selection in heifers." *Biology of Reproduction* **88**(6): 165.
- Hazano, K., S. Haneda, M. Kayano and M. Matsui (2021). "Local sex steroid hormone milieu in the bovine oviduct ipsilateral and contralateral to preovulatory follicle or corpus luteum during the periovulatory phase." *Domestic Animal Endocrinology* **74**: 106515.

- Hill, S. L., G. A. Perry, V. R. Mercadante, G. C. Lamb, J. R. Jaeger, K. C. Olson and J. S. Stevenson (2014). "Altered progesterone concentrations by hormonal manipulations before a fixed-time artificial insemination CO-Synch + CIDR program in suckled beef cows." *Theriogenology* **82**(1): 104-113.
- Inskeep, E. K. (2004). "Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow." *Journal of Animal Science* **82 E-Suppl**: E24-39.
- Irikura, N., M. Uematsu, G. Kitahara, T. Osawa and Y. Sasaki (2018). "Effects of service number on conception rate in Japanese Black cattle." *Reprod Domest Anim* **53**(1): 34-39.
- Jaiswal, R. S., J. Singh, L. Marshall and G. P. Adams (2009). "Repeatability of 2-wave and 3-wave patterns of ovarian follicular development during the bovine estrous cycle." *Theriogenology* **72**(1): 81-90.
- Janson, P. O., J. E. Damber and C. Axen (1981). "Luteal blood flow and progesterone secretion in pseudopregnant rabbits." *Journal of Reproduction and Fertility* **63**(2): 491-497.
- Kanazawa, T., M. Seki, K. Ishiyama, T. Kubo, Y. Kaneda, M. Sakaguchi, Y. Izaike and T. Takahashi (2016). "Pregnancy prediction on the day of embryo transfer (Day 7) and Day 14 by measuring luteal blood flow in dairy cows." *Theriogenology* **86**(6): 1436-1444.
- Kanda, Y. (2013). "Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics." *Bone Marrow Transplantation* **48**(3): 452-458.
- Kawashima, C., K. Kida, K. G. Hayashi, C. Amaya Montoya, E. Kaneko, N. Matsunaga, T. Shimizu, M. Matsui, Y. Miyake, D. Schams and A. Miyamoto (2007). "Changes in plasma metabolic hormone concentrations during the ovarian cycles of Japanese black and holstein cattle." *Journal of Reproduction and Development* **53**(2): 247-254.
- Knickerbocker, J. J., W. W. Thatcher, D. B. Foster, D. Wolfenson, F. F. Bartol and D. Caton (1986).

- "Uterine prostaglandin and blood flow responses to estradiol-17 beta in cyclic cattle."
Prostaglandins **31**(4): 757-776.
- Lamb, G. C., J. S. Stevenson, D. J. Kesler, H. A. Garverick, D. R. Brown and B. E. Salfen (2001).
"Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2alpha for
ovulation control in postpartum suckled beef cows." Journal of Animal Science **79**(9): 2253-
2259.
- Li, Q., S. Zhang, W. Mao, C. Fu, Y. Shen, Y. Wang, B. Liu and J. Cao (2020). "17beta-estradiol
regulates prostaglandin E2 and F2alpha synthesis and function in endometrial explants of
cattle." Animal Reproduction Science **216**: 106466.
- Lucy, M. C. (2001). "Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end?" Journal of
Dairy Science **84**(6): 1277-1293.
- Luttgenau, J. and H. Bollwein (2014). "Evaluation of bovine luteal blood flow by using color Doppler
ultrasonography." Reproductive Biology **14**(2): 103-109.
- Madsen, C. A., G. A. Perry, C. L. Mogck, R. F. Daly, M. D. MacNeil and T. W. Geary (2015). "Effects
of preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows."
Animal Reproduction Science **158**: 96-103.
- Mann, G. E., D. V. Scholey and R. S. Robinson (2007). "Identification of elevated concentrations of
estradiol in bovine uterine endometrium." Domestic Animal Endocrinology **33**(4): 437-441.
- McNatty, K. P., D. M. Smith, A. Makris, R. Osathanondh and K. J. Ryan (1979). "The
microenvironment of the human antral follicle: interrelationships among the steroid levels in
antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro."
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **49**(6): 851-860.
- Miller, B. G., N. W. Moore, L. Murphy and G. M. Stone (1977). "Early pregnancy in the ewe: effects of
oestradiol and progesterone on uterine metabolism and on embryo survival." Australian Journal

- of Biological Sciences **30**(4): 279-288.
- Miura, R. (2019). "Physiological characteristics and effects on fertility of the first follicular wave dominant follicle in cattle." *Journal of Reproduction and Development* **65**(4): 289-295.
- Miura, R., S. Haneda, M. Kayano and M. Matsui (2015). "Short communication: Development of the first follicular wave dominant follicle on the ovary ipsilateral to the corpus luteum is associated with decreased conception rate in dairy cattle." *Journal of Dairy Science* **98**(1): 318-321.
- Moore, S. G. and J. F. Hasler (2017). "A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science." *Journal of Dairy Science* **100**(12): 10314-10331.
- Moreira, F., F. F. Paula-Lopes, P. J. Hansen, L. Badinga and W. W. Thatcher (2002). "Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos." *Theriogenology* **57**(2): 895-907.
- Motoyama, M., K. Sasaki and A. Watanabe (2016). "Wagyu and the factors contributing to its beef quality: A Japanese industry overview." *Meat Sci* **120**: 10-18.
- Okuda, K., Y. Uenoyama, B. Berisha, I. G. Lange, H. Taniguchi, S. Kobayashi, S. Kobayashi, A. Miyamoto and D. Schams (2001). "Estradiol-17beta is produced in bovine corpus luteum." *Biology of Reproduction* **65**(6): 1634-1639.
- Otoi, T., K. Yamamoto, N. Koyama, S. Tachikawa and T. Suzuki (1997). "Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence." *Theriogenology* **48**(5): 769-774.
- Pate, J. L. (2020). "Roadmap to pregnancy during the period of maternal recognition in the cow: Changes within the corpus luteum associated with luteal rescue." *Theriogenology* **150**: 294-301.
- Patel, O. V., N. Takenouchi, T. Takahashi, M. Hirako, N. Sasaki and I. Domeki (1999). "Plasma oestrone and oestradiol concentrations throughout gestation in cattle: relationship to stage of gestation and fetal number." *Research in Veterinary Science* **66**(2): 129-133.

- Perry, G. A., R. A. Cushman, B. L. Perry, A. K. Schiefelbein, E. J. Northrop, J. J. J. Rich and S. D. Perkins (2020). "Role of preovulatory concentrations of estradiol on timing of conception and regulation of the uterine environment in beef cattle." *Systems Biology in Reproductive Medicine* **66**(1): 12-25.
- Perry, G. A. and B. L. Perry (2008). "Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows." *Domestic Animal Endocrinology* **34**(3): 333-338.
- Perry, G. A. and B. L. Perry (2008). "Effects of standing estrus and supplemental estradiol on changes in uterine pH during a fixed-time artificial insemination protocol." *Journal of Animal Science* **86**(11): 2928-2935.
- Perry, G. A., M. F. Smith, M. C. Lucy, J. A. Green, T. E. Parks, M. D. MacNeil, A. J. Roberts and T. W. Geary (2005). "Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(14): 5268-5273.
- Pushpakumara, P. G., R. S. Robinson, K. J. Demmers, G. E. Mann, K. D. Sinclair, R. Webb and D. C. Wathes (2002). "Expression of the insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine oviduct at oestrus and during early pregnancy." *Reproduction* **123**(6): 859-868.
- Resnik, R. and G. W. Brink (1978). "Effects of prostaglandins E1, E2, and F2alpha on uterine blood flow in nonpregnant sheep." *American Journal of Physiology* **234**(5): H557-561.
- Robinson, R. S., A. J. Hammond, D. C. Wathes, M. G. Hunter and G. E. Mann (2008). "Corpus luteum-endometrium-embryo interactions in the dairy cow: underlying mechanisms and clinical relevance." *Reprod Domest Anim* **43 Suppl 2**: 104-112.
- Roche, J. F. (1996). "Control and regulation of folliculogenesis--a symposium in perspective." *Reviews of Reproduction* **1**(1): 19-27.
- Sangsrivong, S., D. K. Combs, R. Sartori, L. E. Armentano and M. C. Wiltbank (2002). "High feed

- intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle." *Journal of Dairy Science* **85**(11): 2831-2842.
- Savio, J. D., L. Keenan, M. P. Boland and J. F. Roche (1988). "Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers." *Journal of Reproduction and Fertility* **83**(2): 663-671.
- Shingu, H., K. Hodate, S. Kushibiki, Y. Ueda, A. Watanabe, M. Shinoda and M. Matsumoto (2002). "Breed differences in growth hormone and insulin secretion between lactating Japanese Black cows (beef type) and Holstein cows (dairy type)." *Comparative Biochemistry and Physiology: Toxicology & Pharmacology* **132**(4): 493-504.
- Siddiqui, M. A. and O. J. Ginther (2014). "Switching of largest follicle from dominant to subordinate status when follicle and CL are in same ovary in heifers." *Theriogenology* **82**(2): 259-265.
- Spencer, T. E. and F. W. Bazer (2002). "Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy." *Frontiers in Bioscience* **7**: d1879-1898.
- Spencer, T. E., G. A. Johnson, R. C. Burghardt and F. W. Bazer (2004). "Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals." *Biology of Reproduction* **71**(1): 2-10.
- Spicer, L. J., E. Alpizar and S. E. Echtenkamp (1993). "Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro." *Journal of Animal Science* **71**(5): 1232-1241.
- Spicer, L. J. and R. E. Stewart (1996). "Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors." *Biology of Reproduction* **54**(1): 255-263.
- Sreenan, J. D. and P. Mulvihill (1975). "Egg transfer in the cow: factors affecting pregnancy and

- twinning rates following bilateral transfers." *Journal of Reproduction and Fertility* **44**(1): 77-85.
- Still, J. G. and F. C. Greiss, Jr. (1978). "The effect of prostaglandins and other vasoactive substances on uterine blood flow and myometrial activity." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **130**(1): 1-8.
- Sunderland, S. J., M. A. Crowe, M. P. Boland, J. F. Roche and J. J. Ireland (1994). "Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers." *Journal of Reproduction and Fertility* **101**(3): 547-555.
- Thatcher, W. W., M. Terqui, J. Thimonier and P. Mauleon (1986). "Effect of estradiol-17 beta on peripheral plasma concentration of 15-keto-13,14-dihydro PGF₂ alpha and luteolysis in cyclic cattle." *Prostaglandins* **31**(4): 745-756.
- Whittier, W. D., J. F. Currin, H. Schramm, S. Holland and R. K. Kasimanickam (2013). "Fertility in Angus cross beef cows following 5-day CO-Synch + CIDR or 7-day CO-Synch + CIDR estrus synchronization and timed artificial insemination." *Theriogenology* **80**(9): 963-969.
- Wijayagunawardane, M. P., A. Miyamoto, W. A. Cerbito, T. J. Acosta, M. Takagi and K. Sato (1998). "Local distributions of oviductal estradiol, progesterone, prostaglandins, oxytocin and endothelin-1 in the cyclic cow." *Theriogenology* **49**(3): 607-618.
- Wiltbank, M. C., A. H. Souza, P. D. Carvalho, R. W. Bender and A. B. Nascimento (2011). "Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle." *Reproduction Fertility and Development* **24**(1): 238-243.
- Xu, Z., H. A. Garverick, G. W. Smith, M. F. Smith, S. A. Hamilton and R. S. Youngquist (1995). "Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave." *Biology of Reproduction*

53(4): 951-957.

Zhuang, L. Z., E. Y. Adashi and A. J. Hsueh (1982). "Direct enhancement of gonadotropin-stimulated ovarian estrogen biosynthesis by estrogen and clomiphene citrate." *Endocrinology* **110**(6): 2219-2221.

永田俊一, 近藤昌弘, 金子浩之, 荒木一司, 南保泰雄, 及川正明, 渡辺元 and 田谷一善 (1996). "アセトニトリル・n-ヘキサシアン分配法を用いた低濃度の血中エストラジオール-17 β 測定のための簡便な脱脂法." *Journal of Reproduction and Development* **42**(5): j43-j49.

一般社団法人 家畜改良事業団(2021), 受胎成績調査

liaj.or.jp/giken/hanshyoku/jyutai.html (accessed January 25, 2022)

筒井敏彦. (2009). 人工授精, 山内亮 監修. 最新家畜臨床繁殖学, 第7版 pp.93. 朝倉書店, 東京.

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 編, 2016, 日本飼養標準・肉用牛, 2008年版, pp. 64, 中央畜産会, 東京

独立行政法人 農畜産業振興機構(2015), 肉用子牛を巡る最近の動向について

https://www.alic.go.jp/koho/kikaku03_000850.html (accessed November 18, 2021)

独立行政法人 農畜産業振興機構(2021), 国内の需要動向【畜産統計】畜産の情報

https://www.alic.go.jp/joho-c/joho05_001458.html (accessed November 18, 2021)

永田俊一, 近藤昌弘, 金子浩之, 荒木一司, 南保泰雄, 及川正明, 渡辺元 and 田谷一善 (1996). "アセトニトリル・n-ヘキサシアン分配法を用いた低濃度の血中エストラジオール-17 β 測定のための簡便な脱脂法." *Journal of Reproduction and Development* **42**(5): j43-j49.