

論文の内容の要旨

論文題目：分娩後乳牛の初回排卵に係わる性腺刺激ホルモン分泌調節に関する研究

氏名 角川博哉

ホルスタイン種の高泌乳牛ではその繁殖効率を高めるため、分娩間隔を短縮させることが求められている。またそのためには分娩後の初回排卵を遅延させないことが重要と考えられている。乳牛では分娩後早期に急激な乳量の増加が起きる一方で、それを補う必要量の飼料を十分に摂取できないために大部分の乳牛は著しいエネルギー欠乏状態にある。また分娩後早期の負のエネルギー状態が分娩後の初回排卵までの日数に影響することも知られている。近年、血中には生体のエネルギー充足度を表す末梢側信号物質が存在し、その末梢側信号物質の濃度変化に対応して脳中枢が視床下部に作用し性腺刺激ホルモン（LH）分泌を調節するという仮説が考えられている。またラット等では末梢側信号物質の最重要候補はグルコースであると推測されている。乳牛においても分娩直後のエネルギーが著しく不足している状態では排卵誘起に重要な LH 分泌が抑制されている可能性が示唆されている。しかしながら、分娩後の初回排卵に関わる LH 分泌ならびに末梢側信号物質については明らかではなく、またその分泌調節機構についてはほとんど解析されていない。そこで本論文では、分娩後の初回排卵に関連する血中マーカーを検討するとともに、その LH 分泌調節機構を明らかにすることを目的に実験を行った。

まずグルコースをはじめとする血中マーカーが分娩直後の濃度域から健常域に回復するために要

した分娩後日数と分娩から初回排卵までの日数（以下、初回排卵日数）との関連を検討した。すなわち、初回排卵後2週間における各血中成分の濃度の平均±2標準偏差の範囲（健常域）内に、各個体の血中因子の濃度が達するに要した分娩後からの日数と初回排卵日数との相関関係について検討した。13頭のホルスタイン種乳牛から分娩前14日から分娩後約60日まで週に4回採血し、血漿中のグルコース、遊離脂肪酸（FFA）、ケトン体、尿素体窒素（UN）、ならびにプロジェステロン濃度を測定した。初回排卵後2週間のグルコース、UN、フリーコレステロール、コレステロールエステルの濃度は分娩前2週間から分娩後初回排卵までの期間の濃度と比較して有意に高く、また初回排卵後2週間のFFA濃度は初回排卵前のそれと比較して有意に低かった。しかしながらケトン体の濃度については、初回排卵前と初回排卵後との間に有意差は認められなかった。さらにこのうち、血中グルコースとFFA濃度については健常域内に復帰するまでに要した日数と初回排卵日数との間に有意な正の相関が認められた。したがって、血中グルコースとFFA濃度が分娩後の初回排卵に関連する因子、末梢側信号物質と考えられた。

次に分娩後の乳牛におけるLHの分泌反応について、GnRH投与によって検討した。分娩後のホルスタイン種経産牛24頭を以下の4群に無作為に選択した。すなわち分娩後10日群(9頭、全例初回排卵前)、分娩後30日群(初回排卵前30日群4頭、ならびに初回排卵後30日群6頭)、分娩後60日群(5頭、全例初回排卵後)の4群にそれぞれ分娩後10日、30日ならびに60日目にGnRHを投与し、15~30分間隔で投与後8時間まで頸静脈より血液検体を採取した。採取した各検体についてLH濃度を測定し、投与後の最高LH濃度（以下、pLH）ならびに、投与後8時間までのLH放出反応曲線とX軸に囲まれる面積（以下、 Σ LH）を算出した。また投与前の血液検体について血漿グルコース濃度を測定し、GnRH投与日におけるエネルギー充足率を日本飼養標準に基づき算出した。10日群におけるpLHと Σ LHは、他の3群に較べて有意($P<0.05$)に低く、またエネルギー充足率ならびにグルコース濃度も、他群に較べて低かった。またGnRH投与が初回排卵前であった分娩後10日群と初回排卵前の分娩後30日群の全例ではGnRH投与後数日以内に排卵した。したがって、卵巢は分娩後早期であってもLH放出が起これば排卵が可能であることが明らかとなった。すなわち分娩後早期の泌乳牛では、LH分泌が抑制されており、またこのような抑制は血中グルコース濃度に関連すると考えられた。

プロピレングルコールは糖源性物質として牛に投与される。そこで生理的な状態で血中グルコース濃度を増加させる方法としてプロピレングルコールを経口投与し、投与後のLH分泌について検討した。すなわち分娩後9日目の初回排卵前の乳牛7頭から、10分間隔で4時間血液検体を頸静脈より採取した後、プロピレングリコール(プロピレングリコール群、7頭)を経口投与し、投与後さらに10分間隔で4時間血液検体を採取した。なお対照(対照群、7頭)として水を経口投与した。採取した全検体について血漿LH濃度を測定し、LH分泌反応の指標である平均LH濃度、1時間あたりのLHパルス数ならびにその振幅を投与前後で比較した。また血漿グルコース、FFA、インスリン濃度

も測定した。投与前の LH 分泌反応の指標いずれにも群間の差は認められなかった。プロピレングリコール群の投与後の平均 LH 濃度と 1 時間あたりの LH パルス数は投与前と比較して有意($P < 0.05$)に増加したが、対照群では投与前後の変動は認められなかった。またプロピレングリコール群では投与後、血中のグルコース濃度とインスリン濃度は有意に増加したが、FFA の濃度に変化は認められなかった。したがって分娩後早期の乳牛では LH 分泌が抑制されており、その抑制の解除には血中グルコース濃度が関与すると考えられた。

分娩後早期の乳牛で増加している FFA 濃度も初回排卵日数に関連すると推測されたため、FFA を静脈内投与し、LH 分泌反応の変動について検討した。すなわち分娩後 13 日目の初回排卵前の乳牛 6 頭に、まず投与前に 10 分間隔で 30 分間血液検体を採取した後、FFA を静脈内点滴投与した(FFA 群)。また対照として生理食塩水を同様に投与した(対照群 5 頭)。採取した全検体について血漿 LH 濃度を測定した。また血漿グルコース、FFA、インスリン濃度も測定した。投与前の平均 LH 濃度に群間の差は認められなかった。投与中の血中 FFA 濃度は対照群に比べ FFA 群が有意な高値を示したが、平均 LH 濃度、1 時間あたりの LH パルス数、ならびにその振幅のいずれについても両群間で差は認められなかった。また血中グルコースならびにインスリン濃度にも FFA 投与による影響は認められなかった。したがって分娩後早期の乳牛に認められる LH 分泌の抑制には、血中 FFA 濃度は関与していないことが明らかとなった。

絶食ラットに認められる LH 分泌抑制はエストロゲン依存性の LH 分泌調節中枢を介することが知られている。そこで正常給餌下と絶食下(排卵日から LH 分泌が活発であるとされる排卵後 4 日目までの絶食)のホルスタイン種雌未経産牛に対してエストロゲンレセプターアンタゴニストであるタモキシフェンを極微量のエタノールに溶解して静脈内投与し、LH 分泌反応を検討した。絶食のみでは血中グルコース濃度の軽度低下は認められるものの LH 分泌反応の抑制は認められなかった。一方、溶剤とした極微量のエタノール投与によって LH 分泌は抑制され、この抑制は給餌下よりも絶食下で強く発現した。またこの抑制はタモキシフェン投与によって解除された。したがって、分娩後早期の乳牛に認められる血中グルコース濃度の低下にともなう LH の分泌抑制にはエストロゲンが何らかの作用を有しているものと推測された。

絶食ラットに認められる LH 分泌抑制はオピオイド依存性の LH 分泌調節中枢を介することも示唆されている。そこで分娩後早期のエネルギーバランスが負の初回排卵前の乳牛に持続型オピオイドレセプターアンタゴニストであるナルトレキソンを投与し、LH 分泌反応を検討した。すなわち分娩後 10 日目の乳牛 5 頭に、10mL の生理食塩水に溶解した 300mg のナルトレキソン(ナルトレキソン群、 $n=5$)または対照として 10mL の生理食塩水(対照群 5 頭)を静脈内投与した。投与前の平均 LH 濃度と 1 時間あたりの LH パルス数に群間の差は認められなかったが、ナルトレキソン群では投与後、平均 LH 濃度と LH パルス数の有意な増加が認められた。一方対照群では投与前後の平均 LH 濃度と LH パルス数の変動は認められなかった。したがって、分娩後早期の乳牛では血中グルコース

濃度の低下にともなう LH 分泌抑制にはオピオイドが関与するものと推測された。

以上の結果から、分娩後早期の乳牛ではエネルギー不足が LH 分泌を抑制し、分娩後の初回排卵までの日数が遅延することが明らかとなった。またその LH 分泌抑制に関連する末梢側信号物質は血中グルコース濃度であることも明らかとなった。さらに末梢側信号物質による LH 分泌調節中枢はエストロゲンならびにオピオイドが関与していると推測された。