

組換え体ヒツジンヒビン α サブユニットの免疫が 黒毛和種における一次主席卵胞の消長に及ぼす影響

竹之内直樹^{*1)}・大島 一修^{*2)}・平尾 雄二^{*1)}・島田 和宏^{*3)}
高橋 政義^{*3)}・下司 雅也^{*3)}・永井 卓^{*4)}・百目鬼郁男^{*5)}

抄 録：本研究では、ウシのインヒビン免疫で誘起される卵巣反応のうち、一次主席卵胞（first dominant follicle；1st.D.F.）の消長について調べた。免疫は28日間隔でインヒビンワクチン2 ml（組換え体ヒツジンヒビン α サブユニットとして0.5 mg）を皮下に投与することで行った。黒毛和種について観察した延べ89発情周期について、発情日に卵胞を除去した卵胞除去区（非免疫区：n=10, 免疫区：n=8）と非除去区（非免疫区：n=24, 免疫区：n=47）に分け、血中 estradiol-17 β （E2 β ）の推移を比較検討した。免疫・非除去区では、発情前後に持続的な複数の卵胞発育が観察され、1st.D.F.の発育時期と一致すると考えられる一過性のE2 β ピークは、発情後3.0 $\pm$ 0.2日目と、非免疫・非除去区（4.9 $\pm$ 0.3日目）より有意（P<0.01）に早く形成された。しかし、免疫・除去区では、非免疫・非除去区の排卵後と同様の1st.D.F.の発育が観察され、E2 β ピークの時期も非免疫・非除去区と同じになった。以上のことから、インヒビン免疫を行った黒毛和種では、主席化する複数の卵胞の一部は発情時にすでに発育を開始していると考えられた。

キーワード：インヒビン免疫, 主席卵胞, エストラジオール-17 β , 卵巣機能, ウシ

Effect of Immunization against Recombinant Ovine Inhibin α Subunit on Appearance of the First Dominant Follicle in Japanese Black Cows : Naoki TAKENOUCHI^{*1)}, Kazunaga OSHIMA^{*2)}, Yuji HIRAO^{*1)}, Kazuhiro SHIMADA^{*3)}, Masayoshi TAKAHASHI^{*3)}, Masaya GESHI^{*3)}, Taku NAGAI^{*4)} and Ikuo DOMEKI^{*5)}

Abstract : Inhibin immunization increases the ovulation rate in cows, though its precise effect on the ovarian response during the luteal phase has not yet been investigated. The aim of this study was to examine the effect of inhibin immunization on the fate of the first dominant follicle (1st. D.F.) in Japanese Black cows. Eighty-nine estrous cycles were divided into four groups, as follows : ablation groups (10 in the non-immunized group, 8 in the immunized group), made up of cows receiving follicle ablation at estrus, and non-ablation groups (24 in the non-immunized group, 47 in the immunized group), comprising the control animals. Concentrations of blood plasma estradiol-17 β (E2 β) were measured. The transient E2 β peak corresponding to the 1st.D.F. development was observed earlier in the immunized・non-ablation group than in the non-immunized・non-ablation group. In the immunized・non-ablation group, the emergence and development of the follicles occurred continuously throughout the pre- and post-estrus phase. On the other hand, the transient E2 β peak in the immunized・ablation group had not appeared by the day on which the peak was found in the non-immunized・non-ablation group, because the 1st. D.F. development, similar to that in the non-immunized・non-ablation group, was induced after the ablation. This study demonstrates that multiple "1st.D.F." begins to develop as early as the preceding estrous phase in inhibin-immunized Japanese Black cows.

Key words : inhibin immunization, dominant follicle, estradiol-17 β , ovarian activity, cow

* 1) 東北農業研究センター (National Agricultural Research Center for Tohoku Region, Morioka, Iwate, 020-0198, Japan)

* 2) 近畿中国四国農業研究センター (National Agricultural Research Center for Western Region, Oda, Shimane, 694-0013, Japan)

* 3) 現・畜産草地研究所 (National Institute of Livestock and Grassland Science, Tsukuba, Ibaraki, 305-0901, Japan)

* 4) 現・農業生物資源研究所 (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan)

* 5) 東京農業大学 (Tokyo University of Agriculture, Atsugi, Kanagawa, 246-0034, Japan)

2003年8月27日受付, 2003年11月13日受理

． 緒 言

ウシでは、発育期の主席卵胞 (dominant follicle : D.F.) から分泌されるインヒビンが下垂体からの卵胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone : FSH) の合成および放出を特異的に抑制する (Kaneko et al. 1995)。そのため、発情周期中に繰り返し形成される D.F. への発育は、通常単一の卵胞でのみ観察される。そのことから、卵胞内卵子を優良遺伝資源として効率的に利用するために、過排卵誘起処置に代表される複数の卵胞発育と複数排卵を誘起する手法は、ウシにおいて重要な繁殖技術の一つである。複数の卵胞発育を誘起する手法は、FSH または性腺刺激ホルモンを用いた卵胞への直接刺激によるものが一般的である。一方、生体内で FSH と負の相関関係にあるインヒビンを免疫的に中和し、内因性のインヒビンによる FSH 分泌の抑制を解除すると、卵胞への直接刺激と同様に複数の卵胞の発育を誘起できることが知られている (Glencross et al. 1992, 1994, Morris et al. 1993, 1997, Price et al. 1987)。さらに、インヒビン免疫によるこの卵巣反応は、免疫的手法を用いていることから、連続した発情周期で反復して誘起される (Bleach et al. 1996, Morris et al. 1995)。FSH 等の性腺刺激ホルモン投与により複数の卵胞発育を誘起する場合、誘起後一定の期間、薬物に対する卵巣反応が低下するため (Dorn et al. 1991, Hastler 1992)、短期間に反復して実施することが困難である。このような理由から、発情卵胞の複数発育および複数排卵誘起に関して、インヒビン免疫による手法は、FSH 等を用いた従来の方法と比較してその持続性および反復性に優れ、ウシにおいて連続した過排卵誘起処置や生体内卵子吸引を利用した成熟卵子の採取などへの適用が期待できる。

超音波画像診断技術の確立後、発情周期中における卵胞の消長や D.F. に関する研究が急速に進展してきた。近年、発情周期中における卵胞の制御が、過排卵誘起処置後の卵巣反応 (Bergfelt et al. 1997, Mapletoft et al. 2002)、受胎率 (Bo et al. 2002) および排卵同期化率 (Bo et al. 2003, Cavalieri et al. 2001, Martinez et al. 2000, Rivera et al. 1998) 等の向上に有効であることが報告されている。さらに生体内卵子吸引に関して、卵子を採取した時期の卵胞の発育ステージとその後の胚への発生率との関連性も報告されている (Hagemann et al. 1999, Machatkova et al.

2000)。一方、インヒビン免疫が卵巣機能に及ぼす影響について調べた報告では、発情および排卵前後の構造物、特に発情卵胞とその後に形成される黄体に関するものがほとんどであり、その卵巣反応を利用した、双子生産への適用性は報告されているものの (Morris et al. 1995)、黄体期の D.F. に関する報告は極めて少ない。黄体期の D.F. においても、発情卵胞と同様に、その消長に関してはインヒビンの影響を大きく受けることから (Bleach et al. 2001, Kaneko et al. 1995)、インヒビン免疫は D.F. に対しても何らかの影響を及ぼすものと考えられる。前述のように、近年、黄体期における D.F. は、卵巣上構造物としてのその重要性が高まっていることから、ウシにおいてインヒビン免疫が黄体期の D.F. に及ぼす影響を明らかにすることは重要と考えられる。本研究では、組換え体ヒツジインヒビン α サブユニットを抗原とした能動免疫により誘起される卵巣反応のうち、黄体発育期の一次 D.F. (first D.F.; 1st D.F.) の消長を調べた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ワクチンを御提供下さった Biotech Australia, Pty Ltd の C.G. Tsonis 博士に深く感謝の意を表する。また、供試牛の適切な管理をしていただいた農林水産省中国農業試験場畜産部 (現・独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構近畿中国四国農業研究センター畜産草地部) 業務第 4 科職員および農林水産省東北農業試験場 (現・独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構東北農業研究センター) 業務第 2 科職員の方々に感謝する。

． 材料および方法

1. 供試動物および試験方法

農林水産省中国農業試験場畜産部 (現・独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構近畿中国四国農業研究センター畜産草地部) および農林水産省東北農業試験場 (現・独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構東北農業研究センター) で繋養されている、正常な発情周期を営む黒毛和種雌牛それぞれ 12 頭および 10 頭を供試した。15 頭には組換え体ヒツジインヒビン α サブユニットを抗原とした能動免疫を行い (免疫区)、他の 7 頭は非免疫区とした。全供試牛で観察した延べ 89 発情周期 (非免疫区 : $n=34$, 免疫区 : $n=55$) のうち一部の周期

では、発情日に卵胞の除去を行い、供試牛群をさらに、除去区（非免疫区：n=10, 免疫区：n=8）と非除去区（非免疫区：n=24, 免疫区：n=47）に分けた。卵胞除去は超音波ガイドを用いた経膣法により行い、超音波画像上で観察できる卵胞をすべて吸引除去した。卵胞除去は、7.5MHzのコンベックス型探触子（UST-M15-2361-1；aloka, Tokyo, Japan）を装着した、超音波診断装置（SSD-1200；aloka, Tokyo, Japan）を用い、17Gのダブルルーメン吸引針（K-OPSD-1760；COOK IVF, Queensland, Australia）をポリプロピレン製の50ml遠心管を介して吸引ポンプ（KMAR-50000；COOK IVF, Queensland, Australia）に接続し、吸引圧70～80 mmHgで実施した。卵胞の除去に際しては、供試牛は枡馬内に起立位で保定し、直腸内の宿便を除去し、外陰部周辺の洗浄およびアルコールによる消毒を行った。前処置として、臭化グリフィニウム（パドリン注；武田，名古屋，日本）75 mgを静脈内に注射投与し、術中の腸管蠕動を抑制した。また、枡馬内での安静を保ち難い個体については、さらに前処置としてキシラジン（Ceractal；Bayer, Leverkusen, Germany）20 mgを筋肉内に注射投与し、術中における供試牛の安静を確保した。なお、発情日の卵胞除去は、すべての個体について乗駕許容行動の発現後に行った。発情前後の期間、全頭について連日あるいは隔日の間隔で血液を採取し、血中 progesterone (P) および estradiol-17 β (E2 β) の推移を比較検討した。また、複数排卵が観察された免疫・非除去区の26発情周期および非免疫・非除去区の8発情周期については、発情周期中、直径4 mm以下、5～9 mmおよび10 mm以上の卵胞数の推移を連日あるいは隔日の間隔で追跡した。卵巣の観察は、直腸検査ならびに5 MHz探触子（UST-588U-5；aloka, Tokyo, Japan）を装着した超音波画像診断装置（SSD-620；aloka, Tokyo, Japan）、または7.5MHz探触子（UST-5561-7.5；aloka, Tokyo, Japan）を装着した超音波画像診断装置（SSD-1200；aloka, Tokyo, Japan）により行った。発情観察は適宜行った。

2. 免疫薬物および免疫方法

ワクチンの作成はBrown et al. (1990)の方法に準じた。免疫薬物として、大腸菌由来のヒツジインヒビン α サブユニット（Biotech Australia, Pty Ltd, Sydney）0.25 mgをアジュバント1 mlと混和しワクチン化したものを用いた。アジュバントは、鉍

物オイル Marcol 52（Esso, Sydney, Australia）9容と界面活性剤 Montanide 888（SEPPIC, Paris, France）1容を混和したものを用いた。初回免疫は発情日に、追加免疫は初回免疫後28日目に行い、ワクチン2 ml（ヒツジインヒビン α サブユニットとして0.5 mg）を、頸部皮下に投与し免疫を行った。なお、免疫区については追加免疫後の初回発情周期以降、試験に供試した。

3. ホルモン測定

外頸静脈よりヘパリン採血管に血液を採取後、直ちに遠心分離を開始し、3,000rpm, 1.5hr, 4℃の条件下で血漿を分離した。得られた血漿はホルモン測定まで-20℃で凍結保存した。血漿中PならびにE2 β の測定は、既報（竹之内ら1993, 1996）の酵素免疫測定法（enzymeimmunoassay：EIA）を一部変更して行った。血漿中PおよびE2 β は、それぞれ抽出および抽出精製を行いEIA用試料とした。E2 β の精製は牧野（1972）の方法に従い、Sephadex LH-20をもちいたカラムクロマトグラフィにより行った。測定は2抗体法EIAを測定原理とした。すなわち、二次抗体としてマイクロプレートに固相化した抗ウサギ γ グロブリンヤギ抗体（50ng/well, OEM Concept Inc, New Jersey, USA）と一次抗体とを結合させ、一次抗体に対してステロイド酵素胞合体（P酵素胞合体；P-3（O-carboxymethyl）Oximeperoxidase, 0.2ng/well, E2 β 酵素胞合体；E2 β -17 hemisuccinate-peroxidase 0.1ng/well, Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A.）とEIA用試料または標準品とを競合反応させた（図1）。一次抗体である抗Pおよび抗E2 β 血清は、それぞれ11 α -hydroxy-P-hemisuccinate-BSA（MAKOR Chemicals, Jerusalem, Israel）およびE2 β 17 hemisuccinate-BSA（Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A.）をウサギに免疫して得たものであり、それぞれ800,000倍、1,750,000倍に希釈しての使用が可能であった。抗P血清とP、11 α -hydroxy-P、20 β -hydroxy-P、17 α -hydroxy-Pとの交差性は、それぞれ100.0%, 27.1%, 2.6%, 2.1%であり、他のC21ステロイドおよびC18, C19ステロイドとの交差性は認められなかった。抗E2 β 血清とE2 β 、estrone, E2 α , estriolとの交差性は、それぞれ100.0%, 350.7%, 10.0%, 5.4%であり、C19, C21ステロイドとの交差性は認められなかった。PおよびE2 β EIAの測定感度は、それぞれ1pg/well以下および0.12pg/well以下であった（図2）。測定内および測定間変動係

数は、P の EIA ではそれぞれ 4.8 ~ 5.6% ($n=6$), 1.9 ~ 8.8% ($n=5$) であり、E2 β の EIA ではそれぞれ 4.3 ~ 8.9% ($n=9$), 4.8 ~ 9.7% ($n=6$) であった。

4. 統計処理

供試牛について、発情卵胞数、黄体数、黄体発育期の E2 β ピーク日および発情周期中の各卵胞数に関する

データを蓄積した。得られたデータは Harvey (1977) の最小自乗分散分析法により統計解析を行い、免疫ならびに発情日の卵胞除去が卵巢機能に及ぼす影響を調べた。

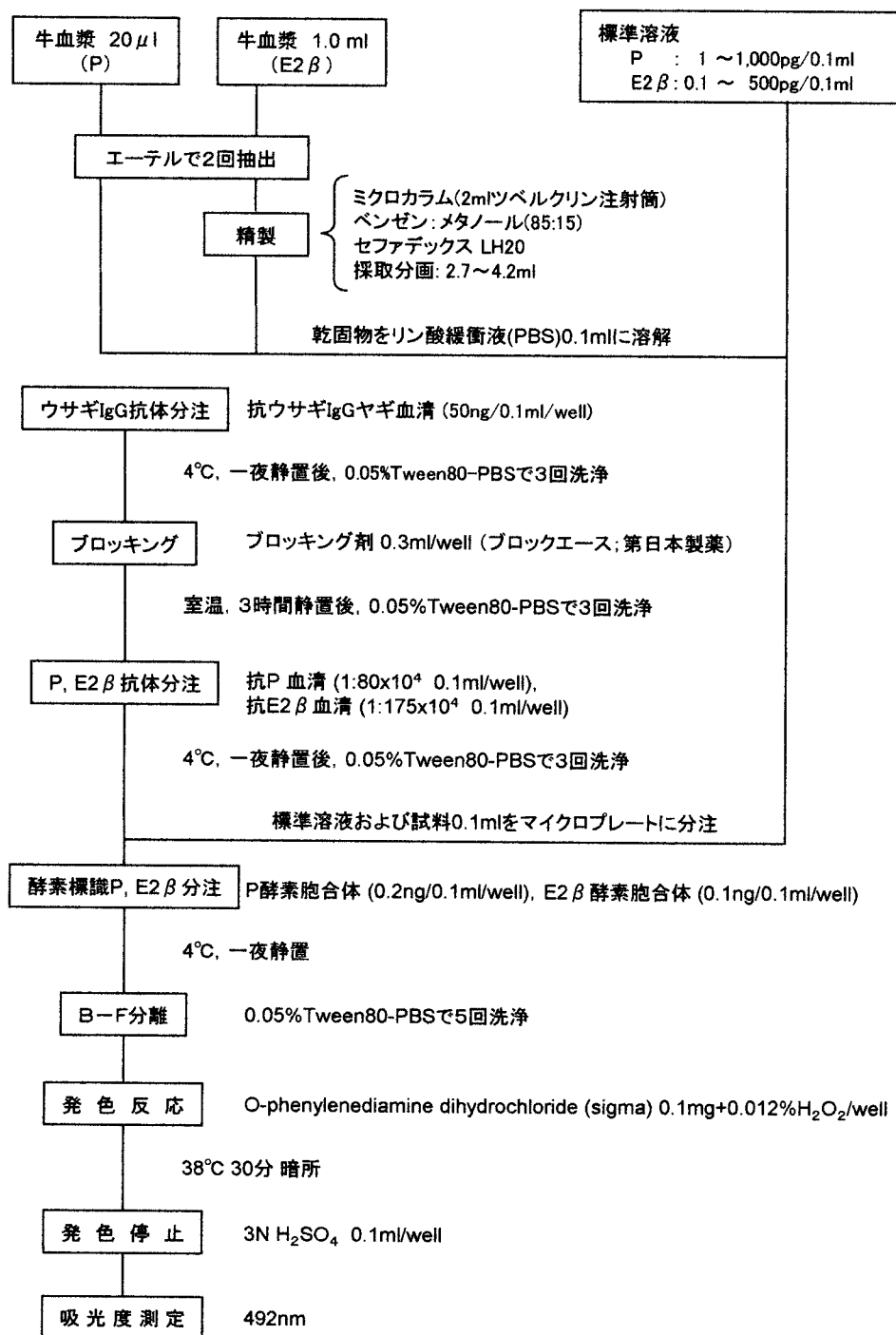


図1 2抗体法酵素免疫測定法の操作手順

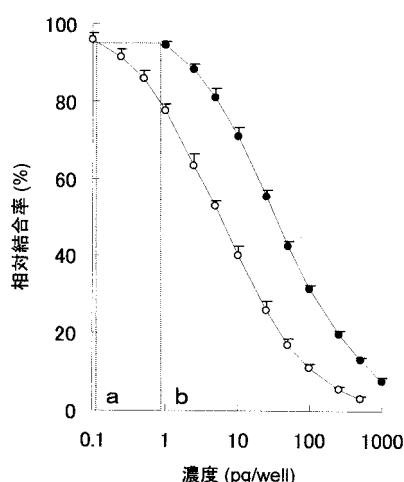


図2 2抗体法酵素免疫測定法による標準曲線 progesterone (●, $n = 5$, 平均値 + 標準偏差) および estradiol-17 β の測定感度は、各々 (○, $n = 7$) の標準曲線を示す。測定感度は相対結合率 95 % に相当する濃度で示した。その結果, progesterone, estradiol-17 β の測定感度は、各々 < 1pg/well (b), < 0.12pg/well (a) と算出された。

結 果

1. インヒピン免疫が黄体発育期の E2 β 推移に及ぼす影響

免疫・非除去区は、免疫後の卵巢反応である複数の卵胞発育とそれに続く複数排卵が誘起されたもの(複数排卵区: $n=36$)と誘起されなかったもの(単排卵区: $n=11$)とに区分した。免疫・非除去区(複

数排卵区)と免疫・除去区では、免疫による卵巢反応を反映し、発情期の卵胞数およびその後の黄体数は有意(非免疫・除去区(複数排卵区): $P < 0.01$, 免疫・除去区: $P < 0.05$)に増加した(表1)。

図3に、非除去区における発情周期中の血中PおよびE2 β の推移を示した。免疫の有無に関わらず、いずれの区でも、E2 β 値は発情2~3日前より上昇を開始し、発情日にピーク値を示した。発情日のE2 β 値は、単排卵性に経過した非免疫区と免疫区(単排卵区)では、それぞれ10.5, 9.0pg/mlであり、これに対して、免疫区(複数排卵区)では、免疫により誘起された複数の発情卵胞の発育を反映して21.5pg/mlと高い値を示した。その後E2 β 値は急激に低下した後、非免疫区と免疫区(単排卵区)では、発情後5日目に(図3A, C), また免疫区(複数排卵区)では発情後3日目に(図3B)それぞれ一過性のピークを形成した。この黄体発育期のE2 β ピーク日に関する分散分析の結果、免疫区(複数排卵区)でのピーク形成日は、他の2区と比較して有意($P < 0.01$)に早かった(表1)。この黄体発育期における一過性のE2 β ピーク値は、4.9~6.2pg/mlと、いずれの区でも発情日のピーク値より低かった。E2 β 値は、一過性のピーク形成後は漸減し、発情後8~9日目には2pg/ml前後の基底値まで低下した。P値はいずれの区でも発情3~4日前に低下を開始し、発情日には0.5ng/ml以下の低い値となった。その後上昇を開始し、発情後5日目までに1ng/ml以上の値に達した。なお、免疫区(複数排卵区)では、複数の黄体形成を反映して発情後のP値の上昇は、他の2区と

表1 各区における黄体発育期の estradiol-17 β (E2 β) ピーク日と卵巢反応に関する最少事情平均値と標準誤差

変動因	観察数	最少自乗平均値 ± 標準誤差		
		E2 β ピーク日*	卵胞数	黄体数
全平均	89	4.5 ± 0.2	3.1 ± 1.0	2.1 ± 0.7
試験区		P = 0.0000	P = 0.0002	P = 0.0041
非除去区				
非免疫区	24	4.9 ± 0.3 ^a	1.0 ± 1.6 ^a	1.0 ± 1.1 ^a
免疫区(複数排卵区)	36	3.0 ± 0.2 ^b	9.7 ± 1.3 ^b	5.9 ± 0.9 ^b
免疫区(単排卵区)	11	5.1 ± 0.4 ^a	1.0 ± 2.4 ^a	1.0 ± 1.7 ^a
除去区				
非免疫区	10	5.3 ± 0.4 ^a	1.0 ± 2.5 ^a	1.0 ± 1.7 ^a
免疫区	8	4.4 ± 0.5 ^a	2.6 ± 2.8 ^{ac}	1.8 ± 1.9 ^{ac}

注. 同一カラム内で異符号間に有意差あり: $P < 0.01$, ただし ac - b: $P < 0.05$

* 発情日を0日とした発情周期日数。

比較して大きかったが、いずれの区でも P 値の推移に大きな違いは認められなかった。

2. インヒビン免疫が発情周期中の卵胞の消長に及ぼす影響

非除去区について、免疫が発情周期中の卵胞の消長に及ぼす影響を図 4 に示した。非免疫区では、4 mm 以下の卵胞数は、16～18 日目（0：発情日）から

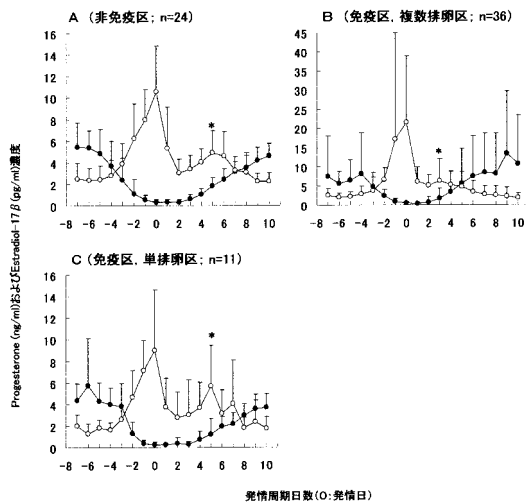


図 3 非除去区における発情周期中の progesterone (●) および estradiol-17β (○) の推移 (平均 + 標準偏差)

* 黄体発育期における estradiol-17β ピーク

1～3 日目まで増加し、それ以降は低下した(図 4 A)。5～9 mm の卵胞数は、16～18 日目に最も多く、その後低下し、19～3 日目の発情前後は一定の数で推移したが、4～6 日目にはさらに低下した (図 4 B)。10 mm 以上の卵胞数は、5～9 mm の卵胞数が低下した 19～0 日目および 4～6 日目に増加した (図 4 C)。総卵胞数は、発情後 1～3 日目以降低下し、この時期は 4 mm 以下および 5～9 mm の卵胞数の低下時期と一致していた (図 4 D)。

免疫区では、4 mm 以下の卵胞数は 19～3 日目には非免疫区と比較して有意 ($P < 0.01$) に少なく、4～9 日目は非免疫区とは逆に増加した (図 4 A)。5～9 mm の卵胞数の推移は両区で大きく異なっており、発情周期日数と免疫の有無との交互作用に有意 ($P < 0.01$) な差が認められた。免疫区の 5～9 mm の卵胞数は 19～0 日目 1～3 日目まで増加し、4～6 日目以降まで低下は認められなかった。また、非免疫区と比較して 1～3 日目の卵胞数は多い傾向にあり、4～9 日目は有意に多かった (図 4 B)。10 mm 以上の卵胞数の推移は非免疫区と類似していたが、19～12 日目のあいだ卵胞数は多く推移した (図 4 C)。総卵胞数は、黄体発育期の 16～18 日目は非免疫区より有意 ($P < 0.05$) に少なかったが、その後は非免疫区での推移と異なり黄体発育期の 19～6 日目まで増加した (図 4 D)。

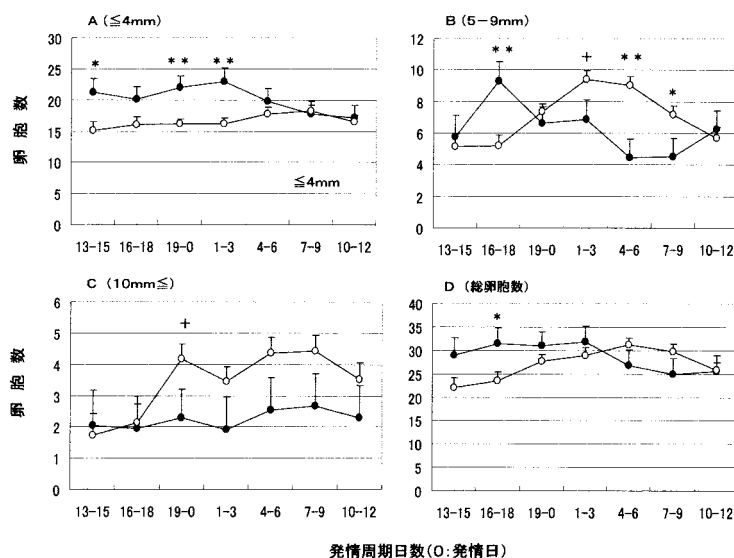


図 4 インヒビン免疫が発情周期中の卵胞の消長に及ぼす影響 (最少自乗平均 + 標準誤差)

●：非除去区・非免疫区 (n = 24), ○：非除去区・免疫区 (複数排卵区, n = 36)

同一日数内で両区間に有意差または傾向有り：** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, + $P < 0.1$

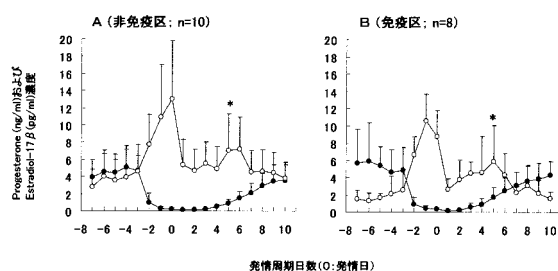


図5 非除去区における発情周期中の progesterone (●) および estradiol-17 β (○) の推移
* 黄体発育期における estradiol-17 β ピーク

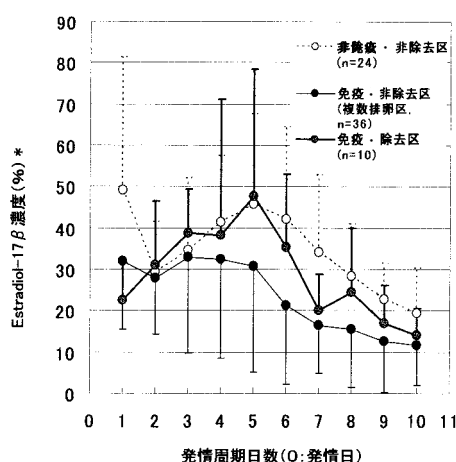


図6 インヒビン免疫および卵胞除去が黄体発育期の estradiol-17 β 推移に及ぼす影響 (平均+/-標準偏差)
* 発情期のピーク値を 100%とした相対濃度

3. 発情日の卵胞除去が黄体発育期の E2 β 推移に及ぼす影響

除去区における発情周期中の血中 P および E2 β の推移を図5に示した。両区とも E2 β 値は、非除去区 (図3) での推移と同様に、発情2～3日前より急激に上昇を開始し、非免疫区および免疫区では発情日にそれぞれ 13.0, 8.7pg/ml の高値に達した。その後、両区とも E2 β は急激に低下し、発情後5～6日目に再度ピークを形成した。この黄体発育期の E2 β ピーク形成時期は両区で同等であった (表1)。P 値は両区とも発情3日前に急激に低下し、発情前後には 0.5ng/ml 以下の低い値で推移した。その後 P 値は上昇を開始し、発情後6日目までに 1 ng/ml 以上の値に達した。両区間で P 値の推移に大きな違いは認められず、かつ非除去区 (図3) と同様の推

移を示した。

図6にインヒビン免疫および卵胞除去が黄体発育期の E2 β 推移に及ぼす影響を示した。なお、E2 β の推移は、発情期のピーク値を 100%とした相対濃度で示した。黄体発育期における E2 β のピーク形成時期は、非免疫・非除去区では、発情後5日目に観察された。一方、免疫・非除去区 (複数排卵区) でのピーク形成時期は発情後3日目と早期に観察されたが、発情時に卵胞除去を行うことにより、黄体発育期の E2 β ピーク形成時期は有意 ($P<0.01$) に遅れ、非免疫・非除去区と同様に5日目となった。

考 察

ウシでは、発情周期中に大型で単一の D.F. が主に2回 (Knopf et al. 1989, Lucy et al. 1992, Savio et al. 1988, Sirois et al. 1988) または3回 (Lucy et al. 1992, Pursley et al. 1993, Savio et al. 1988, Sirois et al. 1988) 繰り返し形成されることが知られている。これらの D.F. のうち、発情後最初に形成される 1st. D.F. は、黄体形成ホルモンの排卵前サージ 5.8 時間後に発育を開始し、さらに卵胞発育開始約 60～61 時間後に 1st. D.F. とほぼ同時期に発育を開始した次席卵胞との逸脱が起こり主席化する (Ginther et al. 1998, Kulick et al. 1999, 2001)。また、末梢血中では発情後5日目をピークとして一過性の E2 β の上昇が観察されるが (Bleach et al. 2001, Kaneko et al. 1991, 1996, 永田ら 1996)、この一過性の上昇時期と 1st. D.F. 内の E2 β 上昇時期とは一致し (Fortune et al. 2001, Martin et al. 1991)、さらに Pursley et al. (1993) は血中 E2 β の上昇時期と 1st. D.F. の発育開始時期および最大径に達した時期との間に有意な正の相関があることを明らかにしている。これらの報告から、黄体発育期における一過性の E2 β 上昇は、1st. D.F. を分泌母体とし、その発育時期を反映すると考えられる。今回の結果でも、非免疫・除去区では最小自乗平均で発情後 4.9 日目に一過性の E2 β のピークを認め、この時期は他の報告 (Bleach et al. 2001, Kaneko et al. 1991, 1996, 永田ら 1996) と一致した。また、1st. D.F. の発育開始も、他の報告 (1998, Kulick et al. 1999, 2001) と同様に発情後から観察された。しかし、免疫・非除去区 (複数排卵区) での黄体発育期の E2 β ピークは、発情後 3.0 日目に有意 ($P<0.01$) に早く形成された。このことは、免疫牛では E2 β 分泌能を有する 1st. D.F. が早期

に誘起されていることを示している。このことから、免疫は 1st. D. F. の発育時期を変化させていると考えられた。なお、免疫による卵巣反応が誘起されなかった免疫・非除去区（単排卵区）では、黄体発育期の E2 β ピークは非免疫・非除去区と同等であったことから、E2 β ピークの早期形成は、免疫により複数の発情卵胞が誘起された場合の特徴的所見と考えられた。

今回の試験において非免疫区では、黄体発育期（発情後 1～9 日目）における、9 mm 以下の卵胞数の低下とそれに相反した 10 mm 以上の卵胞数の増加を特徴としていた。1st. D. F. である 10 mm 以上の卵胞数の増加は発情後 4 日以降に観察され、この時期は、発情後 4 日目に 1st. D. F. が 10 mm 以上に達するとする報告（Kulick et al., 2001）と一致した。また、同時期に 9 mm 以下の卵胞数が低下したが、これは 1st. D. F. の発育と関連して他の卵胞の発育が抑制された結果と考えられ、9 mm 以下の卵胞数の低下時期は、1st. D. F. と他の卵胞との逸脱時期、すなわち 1st. D. F. 以外の卵胞の発育が停止する時期が発情後 3 日目であるとする報告（Ginther et al. 1998, Kulick et al. 1999, 2001）とほぼ一致した。これらのことから、非免疫区における黄体発育期の卵胞数の推移は、1st. D. F. の形成とそれ以外の卵胞の発育停止を示していると考えられた。一方、免疫区では、1～3 日目に以降にすべての卵胞数が増加した。このことは、免疫区では、1st. D. F. 以外の卵胞も退行することなく発育することを示しており、10 mm 以上の卵胞数の推移から多くの 1st. D. F. が形成されていると考えられた。なお、非免疫区では発情前（16～0 日目）の期間、5～9 mm の卵胞数ピーク（16～18 日目）は 10 mm 以上の卵胞数ピーク（19～0 日目）に先んじて観察され、19～0 日目には低下したが、この 5～9 mm の卵胞数推移は、一部の卵胞が 10 mm 以上に発育を継続しかつ多くが閉鎖退行することを示していると考えられた。しかし、免疫区では、10 mm 以上の卵胞数は 1～3 日目に排卵を反映して一過性に低下したが、5～9 mm の卵胞数は 19～0 日目から 1～3 日目のあいだ持続的に増加したことから、免疫区では発情前後のさまざまな時期に卵胞は発育を開始しており、それらの多くは閉鎖退行することなく発育を持続していると考えられた。

卵胞の除去後、直ちに次の卵胞発育が開始することが知られている（Garcia et al. 1998）。また内分

泌学的には、卵胞除去後 1.5 日以内に FSH の上昇を認め（Adams et al. 1992, Badinga et al. 1992, Tohei et al. 2001）、さらに 5 日以内に E2 β とインヒビンの増加を誘発する（Tohei et al. 2001）とある。卵胞除去後におけるこれら卵胞およびホルモンの消長は、発情周期における排卵後の推移（Bleach et al. 2001, Ginther et al. 1998, Kaneko et al. 1991, 1996）とよく一致する。今回、発情日の卵胞除去を行った結果、非免疫区では黄体発育期の E2 β ピーク時期に変化は認められなかったことから、発情日の卵胞の吸引除去後に誘起される D. F. は、非除去区で観察される 1st. D. F. とほぼ同等に発育し、E2 β 分泌能を有するものと考えられた。また、免疫区（複数排卵区）でも卵胞除去の結果、黄体発育期の E2 β ピークは非免疫・除去区と同じ時期に形成されることから、非免疫区と同様の現象が誘起されていると考えられた。さらに、発情日の卵胞除去により免疫区（複数排卵区）に特徴的である黄体発育期における早期の E2 β ピーク形成が消失することは、免疫区では主席化にいたる卵胞の発育は発情日にすでに開始していたことを示している。すなわち、免疫・非除去区（複数排卵区）では、発情前にすでに 1st. D. F. の発育が誘起されている結果、黄体発育期の E2 β ピークが早期に形成されることが考えられた。なお、P は卵胞除去の有無にかかわらず、ほぼ同等の推移を示した。このことは、発情日の卵胞除去は、排卵後に形成される黄体と同等の機能を有する黄体あるいは黄体組織の形成を誘起するものと考えられた。

本研究では、E2 β の推移ならびに黄体発育期の 1st. D. F. の消長を調べた結果、免疫牛では非免疫牛と比較して早期に E2 β 分泌能を有する複数の 1st. D. F. の形成が誘起されていることが明らかとなった。さらにこの現象は、非免疫牛では 1st. D. F. の発育は排卵後に開始することに対して、免疫牛では発情前後のさまざまな時期に発育を開始した複数の卵胞のうち、発情前に発育を開始し排卵に至らなかった卵胞がその後も閉鎖退行することなく発育を続けた後、主席化し、E2 β 分泌能を獲得した結果と考えられた。

引用文献

- 1) Adams, G. P.; Matteri, R. L.; Kastelic, J. P.; Ko, J. C.; Ginther O. J. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers.

- J. Reprod. Fertil. 94 : 177 - 188.
- 2) Badinga, L. ; Driancourt, M. A. ; Savio, J. D. ; Wolfenson, D. ; Drost, M. ; De La Sota, R. L. ; Thatcher, W. W. 1992. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 47 : 871 - 883.
- 3) Bergfelt, D. R. ; Bo, G. A. ; Mapletoft, R. J. ; Adams, G. P. 1997. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 49 : 1 - 12.
- 4) Bleach, E. C. L. ; Muttukrishna, S. ; Cunningham, F. J. ; Knight, P. G. ; Glencross, R. G. 1996. Effect of inhibin immunization using different synthetic peptide fragments of the bovine α -subunit on plasma anti-inhibin titres, plasma FSH concentrations and the incidence of multiple ovulation in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 41 : 1 - 12.
- 5) Bleach, E. C. L. ; Glencross, R. G. ; Feist, S. A. ; Groome, N. P. ; Knight, P. G. 2001. Plasma inhibin A in heifers : Relationship with follicle dynamics, gonadotropins, and steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular fluid. *Biol. Reprod.* 64 : 743 - 752.
- 6) Bo, G. A. ; Baruselli, P. S. ; Moreno, D. ; Cutaia, L. ; Caccia, M. ; Tribulo, R. ; Tribulo, H. ; Mapletoft, R. J. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*. 57 : 53 - 72.
- 7) Bo, G. A. ; Baruselli, P. S. ; Martinez, M. F. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 78 : 307 - 326.
- 8) Brown, R.W. ; Hungerford, J.W. ; Greenwood, P.E. ; Bloor, R.J. ; Evans, D.F. ; Tsonis, C.G. ; Forage, R.G. 1990. Immunization against recombinant bovine inhibin alpha subunit causes increased ovulation rates in gilts. *J. Reprod. Fertil.* 90 : 199 - 205.
- 9) Cavalieri, J. ; Farin, P. W. ; Kinder, J. E. ; Van Camp, S. D. ; Whitacre, M. D. ; Washburn, S. P. ; Britt, J. H. 2001. Ovarian follicular development following administration of progesterone or aspiration of ovarian follicles in Holstein cows. *Theriogenology*. 55 : 805 - 821.
- 10) Dorn, C. G. ; Baker, J. F. ; Lunt, D. K. ; Kraemer, D. C. 1991. Repeated, short interval superovulation in virgin heifers. *Theriogenology*. 35 : 302. (Abstract)
- 11) Fortune, J. E. ; Rivera, G. M. ; Evans, A. C. O. ; Turzillo, A. M. 2001. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol. Reprod.* 65 : 648 - 654.
- 12) Garcia, A. ; Salaheddine, M. 1998. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology*. 50 : 575 - 585.
- 13) Ginther, O. J. ; Bergfelt, D. R. ; Kulick, L. J. ; Kot, K. 1998. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle. *Theriogenology*. 50 : 507 - 519.
- 14) Glencross, R. G. ; Bleach, E. C. ; McLeod, B. J. ; Beard, A. J. ; Knight, P. G. 1992. Effect of active immunization of heifers against inhibin on plasma FSH concentrations, ovarian follicular development and ovulation rate. *J. Endocrinol.* 134 : 11 - 18.
- 15) Glencross, R. G. ; Bleach, E. C. ; Wood, S. C. ; Knight, P. G. 1994. Active immunization of heifers against inhibin : effects on plasma concentrations of gonadotrophins, steroids and ovarian follicular dynamics during prostaglandin-synchronized cycles. *J. Reprod. Fertil.* 100 : 599 - 605.
- 16) Hagemann, L. J. ; Beaumont, S. E. ; Berg, M. ; Donnison, M. J. ; Ledgard, A. ; Peterson, A. J. ; Schurmann, A. ; Tervit, H.R. 1999. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles : interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol. Reprod. Dev.* 53 : 451 - 458.
- 17) Harvey, W. R. 1977. User's guide for LSMLMW. Ohio State Univ., Columbus, 1 - 59.
- 18) Hastler, J. F. 1992. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 75 : 2857 - 2879.

- 19) Kaneko, H. ; Terada, T. ; Taya, K. ; Watanabe, G. ; Sasamoto, S. ; Hasegawa, Y. ; Igarashi, M. 1991. Ovarian follicular dynamics and concentrations of oestradiol-17 β , progesterone, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone during the periovulatory phase of the oestrous cycle in the cow. *Reprod. Fertil. Dev.* 3 : 529 - 535.
- 20) Kaneko, H. ; Kishi, H. ; Watanabe, G. ; Taya, K. ; Sasamoto, S. ; Hasegawa, Y. 1995. Changes in plasma concentrations of immunoreactive inhibin, estradiol-17 β and FSH associated with follicular waves during the estrous cycle of the cow. *J. Reprod. Dev.* 41 : 311 - 320.
- 21) Knopf, L. ; Kastelic, J. P. ; Schallenberger, E. ; Ginther, O. J. 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers : test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* 6 : 111 - 119.
- 22) Kulick, L. J. ; Kot, K. ; Wiltbank, M. C. ; Ginther, O. J. 1999. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*. 52 : 913 - 921.
- 23) Kulick, L. J. ; Bergfelt, D.R. ; Kot, K. ; Ginther, O. J. 2001. Follicle selection in cattle : Follicle deviation and codominance within sequential waves. *Biol. Reprod.* 65 : 839 - 846.
- 24) Lucy, M. C. ; Savio, J. D. ; Badinga, L. ; De La Sota, R. L. ; Thatcher, W. W. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.* 70 : 3615 - 3626.
- 25) Machatkova, M. ; Jokesova, E. ; Horky, F. ; Krepelova, A. 2000. Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. *Theriogenology*. 54 : 543 - 550.
- 26) 牧野拓雄. 1972. 性ステロイドホルモンの Radioimmunoassay. *日本内分泌学会雑誌*. 49 : 629 - 645.
- 27) Mapletoft, R. J. ; Steward, K. B. ; Adams, G. P. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 42 : 601 - 611.
- 28) Martin, T. L. ; Fogwell, R. L. ; Ireland, J. J. 1991. Concentrations of inhibins and steroids in follicular fluid during development of dominant follicles in heifers. *Biol. Reprod.* 44 : 693 - 700.
- 29) Martinez, M. F. ; Adams, G. P. ; Kastelic, J. P. ; Bergfel, D. R. ; Mapletoft, R. J. 2000. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. *Theriogenology* 54 : 757 - 769.
- 30) Morris, D. G. ; McDermott, M. G. ; Diskin, M. G. ; Morrison, C. A. ; Swift, P. J. ; Sreenan, J. M. 1993. Effect of immunization against synthetic peptide sequences of bovine inhibin alpha-subunit on ovulation rate and twin-calving rate in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 97 : 255 - 261.
- 31) Morris, D. G. ; McDermott, M. G. ; Grealy, M. ; Diskin, M. G. ; Morrison, C. A. ; Swift, P. J. ; Sreenan, J. M. 1995. Effect of immunization against synthetic peptide sequences of the alpha N-subunit of bovine inhibin on ovulation rate, gonadotrophin concentrations and fertility in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 103 : 285 - 291.
- 32) Morris, D. G. ; Browne, D. ; Diskin, M. G. ; Sreenan, J. M. 1997. Effect of peptide to carrier ratio on the immune and ovarian response to inhibin immunization in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 48 : 1 - 8.
- 33) 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, 田谷一善. 1996. アセトニトリル・n-ヘキササ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. *J. Reprod. Dev.* 42 : j43 - j49.
- 34) Price, C. A. ; Morris, B. A. ; O'Shea, T. ; Webb, R. 1987. Active immunization of cattle against partly purified follicular fluid from sheep. *J. Reprod. Fertil.* 81 : 161 - 168.
- 35) Pursley, J. R. ; Stevenson, J. S. ; Minton, J. E. 1993. Ovarian follicular waves in dairy cows after administration of gonadotrophin-releasing hormone at estrus. *J. Dairy Sci.* 76 : 2548 - 2560.
- 36) Rivera, G. M. ; Goni, C. G. ; Chaves, M. A. ; Ferrero, S. B. ; Bo, G. A. 1998. Ovarian follicular wave synchronization and induction of ovulation in postpartum beef cows. *Theriogenology*.

- 49 : 1365 - 1375.
- 37) Savio, J. D. ; Keenan, L. ; Boland, M. P. ; Roche, J. F. 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. J. Reprod. Fertil. 83 : 663 - 671.
- 38) Sirois, J. ; Fortune, J. E. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. Biol. Reprod. 39 : 308 - 317.
- 39) 竹之内直樹, 居在家義昭, 大島一修, 島田和宏, 高橋政義. 1993. 牛血中プロジェステロンの酵素免疫測定法. 中国農試研報, 12 : 125 - 132.
- 40) 竹之内直樹, 大島一修, 島田和宏, 高橋政義. 1996. マイクロプレートを用いた牛血漿中エストラジオール-17 β の酵素免疫測定法. 日本繁殖生物学雑誌, 43 : j9 - j14.
- 41) Tohei, A. ; Shi, F. X. ; Ozawa, M. ; Imai, K. ; Takahashi, H. ; Shimohira, I. ; Kojima, T. ; Watanabe, G. ; Taya, K. 2001. Dynamic changes in plasma concentrations of gonadotropins, inhibin, estradiol-17 β and progesterone in cows with ultrasound-guided follicular aspiration. J. Vet. Med. Sci. 63 : 45 - 50.