

Compendium of animal reproduction

10th edition (2009)

「牛の実践臨床繁殖学」

監訳：小島敏之、DVM, PhD.

元鹿児島大学農学部獣医学科獣医繁殖学教授

MSD Animal Health

1. 哺乳類の繁殖生理

1.1 はじめに

哺乳類の繁殖プロセスは、2つの調節系、すなわち内分泌系と神経系により統御されている。内分泌系と神経系はそれぞれ特有の役割を担っており、これら2つの系の間で起こる巧妙な相互作用は、健康な子の娩出とその後の順調な発育に至るカスケードにおいて重要不可欠な働きをしている。第1章では、繁殖プロセスの仕組みに関する基本理論を紹介し、繁殖プロセスの各要素間の関係を例示するために、牛体内での現象を概説する。牛の繁殖周期に関するより詳細な情報は、第2章で説明する。本章の終わりの短いセクションでは、雄の体内における内分泌プロセスと季節性に関するいくつかの側面を解説する。

1.2 神経系、内分泌系、および細胞間情報伝達物質

神経系：環境からの刺激は、感覚器により受容され、脳に伝達される。繁殖に関わる感覚入力の例として、目から受容する情報（光、他の同種の動物）、鼻（性的に重要な匂い）、触覚（他の動物の接近）があり、それらの情報は視神経、嗅神経、および感覚神経により脳に伝達される。脳はその情報を変換して、必要に応じて反応し、神経線維を通じて標的器官にインパルスを送る。内分泌系：この系の主役であるホルモンとは、分泌腺または組織で生成され、ホルモン感受性組織内で特定の反応を誘発する化学物質である。内分泌系は、これらの化学情報伝達物質により作用を及ぼす。これは、フィードバックループの複合的な機序と、神経系およびさまざまな器官からのインパルスにより調節されている。その作用は、ホルモンの標的細胞への到達方法により細分できる (Norman and Litwack 1997)。

全身性ホルモン - 内分泌ホルモン

ホルモンの合成および貯蔵は、内分泌系において、解剖学的に限定された内分泌腺の特殊な細胞で行われる。これらのホルモンは血流に放出され、多くの場合遠隔の標的器官に（しばしば特殊な輸送蛋白質により輸送される。内分泌系には、ホルモンを全身循環系に放出する分泌腺（例：インシュリン）と閉鎖循環系に放出する分泌腺（例：GnRH）とがある。

傍分泌(パラクリン)ホルモン

いわゆる傍分泌ホルモンは、近傍の細胞または器官に効果を及ぼす。例として、隣接する精細管に作用する、精巣のライディッヒ細胞(間質細胞)により産生されるテストステロンが挙げられる。

自己分泌(オートクリン)ホルモン

自己分泌では、産生細胞が標的細胞ともなる。その好例として、プロスタグランジン類が挙げられる。

神経伝達物質

今日では、一般的に神経伝達物質がホルモン、すなわちホルモンメッセンジャーと見なされることが多くなっている。アセチルコリンの様な神経伝達物質は、傍分泌ホルモンと見なすことができる。現時点では、ホルモン系の中では内分泌機能の解明が最も進んでいる。過去10年間で、傍分泌および自己分泌機能への研究者の注目は増したが、それらの作用の詳細については、いまだ多くの不明な点がある。

標的細胞に到達したホルモンは特異的な反応を引き起こすが、その反応は、特定のホルモンの構造に対し特異的に高い親和性を有する細胞内または細胞外の特定分子構造を有する、標的細胞にあるホルモン固有の受容体によって活性化される。

従って、受容体は次の2つの重要な機能を果たす：

- ・ 標的細胞による特定のホルモンの認識
- ・ 信号を細胞特異的な応答に変換すること

ホルモン受容体の生化学的な構造は一様ではないものの、総じて、各々が特異的なホルモン実体を認識し、ホルモン実体と相互に作用する(酵素・基質相互作用の鍵-鍵穴モデルと対比して)。

それにも拘わらず、全ての受容体には2つの主要構成要素がある：

- a) 適合するホルモンを立体特異的に結合するリガンド結合領域
- b) リガンド領域-ホルモン複合体の存在を認識し、細胞特異的な生物学的応答を活性化するエフェクター領域。この応答には通常、標的細胞内の酵素の活性化または非活性化が含まれる。

ステロイドホルモンの受容体は、通常、標的細胞の細胞質および核部にみられ、そこでDNAと直接に相互作用する。ペプチドホルモンおよびタンパク質ホルモンの受容体は、通常、細胞外膜に位置する。ほとんどの受

容体、特に細胞膜内受容体は、情報を伝達するためにセカンドメッセンジャーを必要とする。代表的なセカンドメッセンジャーとして、図1に示した環状AMP (cAMP)がある。受容体と結合したホルモンは、細胞膜内のアデニル酸シクラーゼシステムを活性化する。続いて、ATPが環状AMPに変換される。セカンドメッセンジャーである環状AMPは、非活性のcAMP依存性プロテインキナーゼAを活性化し、活性触媒ユニットと調節ユニットに分離させる。プロテインキナーゼの活性触媒ユニットは、タンパク質または酵素のリン酸化反応を刺激し、そしてそれによりタンパク質合成、成長、ホルモン分泌などの細胞効果をもたらされる。ホルモンの循環濃度は原則として低いため、受容体は適合するホルモンとの結合のために、極めて効果的な捕捉メカニズムを必要としている。

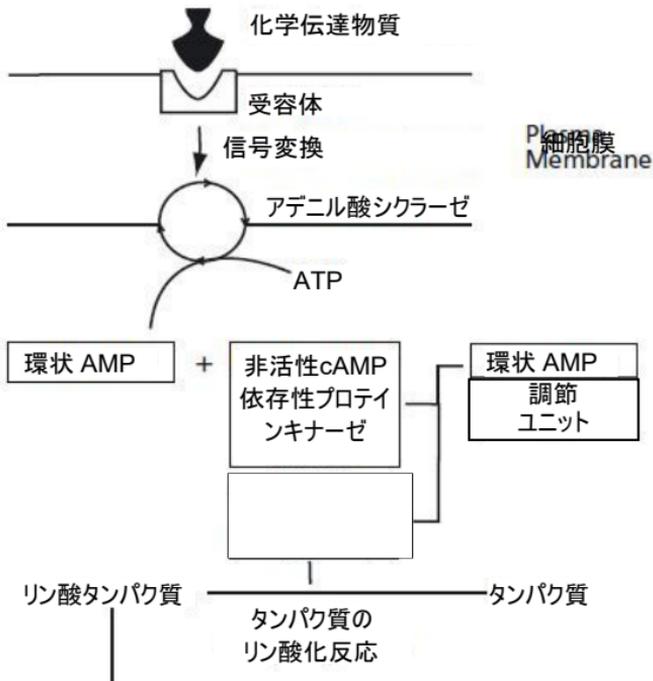


図 1 セカンドメッセンジャーとしての環状AMP

1 哺乳類の繁殖生理

内分泌ホルモン放出の効果は、状況により異なる場合がある。標的細胞の受容体の数と型は固定されているわけではなく、それらの形成と分解は動力学的なプロセスである。例えば、細胞中の1つのホルモンの機能が、別の伝達物質の受容体の誘導または分解であり得る。さらに、過剰なホルモンにより受容体が遮断されることがある。その場合、通常では非常に効果的なホルモン用量による過剰な刺激でも、さらなる効果は得られない。繁殖プロセスにおける病理学的状況は、受容体レベルでの障害が原因で起こることが多い。

1.3 雌における繁殖の制御

正常な繁殖力のある雌であっても、その生涯の大半において、発情周期活動が定期的に起こっていない状態（発情休止期）にある。春機発動前、妊娠、および授乳の期間を合算すると、その期間は発情周期活動を示す期間をはるかに上回る。それでも、注目されるのは多くの場合、繁殖プロセスへの人為的な介入（繁殖させる/させない、自然交配/人工授精の選択、発情期のコントロール、排卵の誘起等）が最も頻繁に起こるのが後者の発情周期活動期間であり、繁殖に関わる問題の大半が発生するのもこの期間である。

ホルモンによる繁殖制御の原則は、基本的に全ての家畜種において同じであるが、家畜種による相違点も存在する。年中発情周期を繰り返す多発情動物（牛、豚）もいれば、特定の季節にのみ発情周期を繰り返す多発情動物（馬、羊、猫）もいる。犬は単発情性の動物である。

また、排卵のメカニズムにも相違点がある。ほとんどの動物は自然排卵動物であるが、猫、ウサギ、およびラクダは、交尾時に膣と子宮頸部の感覚受容体の刺激により排卵が誘発される交尾排卵動物である。本章では、繁殖に関わる最も重要なホルモンの機能と相互作用（およびその分泌組織と標的組織）のみを、牛の発情周期を例として総括する。

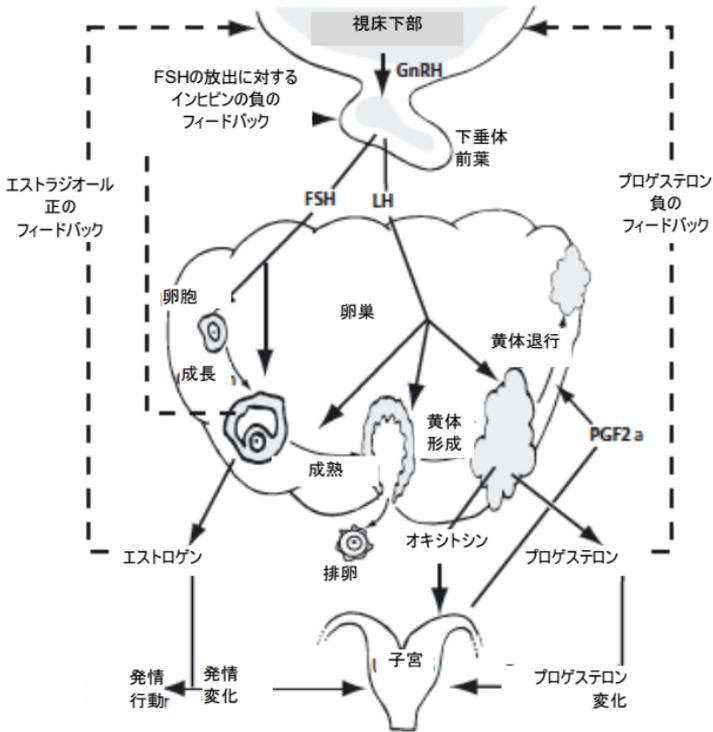


図2 雌の繁殖機能のコントロールにおける相互関係

哺乳類の繁殖プロセスは、複雑で未解明の部分の多い、中枢神経系 (CNS)、多くの分泌組織および標的組織、さまざまなホルモンの複合的活性のカスケード(連鎖)により調節されている。図2は、雌の繁殖に関わる最も重要な器官とホルモンを、その機能と相互作用の一部とともに示した略図である。

CNSは、動物を取り巻く環境からの情報(視覚、嗅覚、聴覚、および触覚刺激)を受け、繁殖に関連する有意な情報を、視床下部・下垂体・性腺軸を通じて生殖腺に伝達する。視床下部と下垂体は、脳の腹側部に近接して存在している。双方ともホルモン産生部位であるばかりでなく、

自らの分泌速度を調節するための精巧な恒常性フィードバックシステムを構成する標的器官でもある。

視床下部内の神経内分泌ニューロンは、CNSからの刺激を受けると、そこで産生される放出ホルモンの一種である、比較的単純な構造の10個のアミノ酸配列を持つペプチド(デカペプチド)の性腺刺激ホルモン放出ホルモン(ゴナドトロピン放出ホルモン、GnRH)を放出する。哺乳類ではGnRHの進化的な保存度が高いので、このホルモンに基づく繁殖制御技術はさまざまな種に幅広く応用されている。

GnRHは、視床下部-下垂体門脈系を介して、標的器官である下垂体前葉に輸送される。下垂体では、特定の細胞を刺激し、卵胞刺激ホルモン(FSH)と黄体形成ホルモン(LH)を分泌させる。GnRH、FSH、およびLHは、一定濃度で放出されているのではなく、連続してパルス状に放出されている。下垂体の分泌活性の調節において決定的な役割を果たすのは、GnRHパルスが一定濃度で放出されることではなく、GnRHパルスの振幅と頻度である。視床下部によるGnRH分泌の調節を介して、内部因子(性腺からのフィードバック機構)と外部因子(光周期、フェロモン、栄養、および代謝状態)の双方が、繁殖パターンに主要な影響を与える。

既に述べた通り、GnRHは下垂体細胞によるFSHとLHの放出を刺激する。性腺刺激ホルモン(ゴナドトロピン)であるFSHとLHは、糖タンパク質ホルモンのスーパーファミリーに属し、これらは、非共有結合した2つの異なるサブユニット、 α と β により構成されている。この2つのホルモンはそれぞれ独立したメカニズムにより調節されるため、生体内における分泌は同期していない。GnRHはLHの分泌を制御する上で極めて重要である。そのため、下垂体によるLHのパルス状の放出は、視床下部によるGnRHのパルス状の放出の直後に起こる。GnRHによる刺激は、LHの放出と生合成の両者を急激に誘発することにより、その産生源を満たす。大半の哺乳類では、下垂体のLH量はFSH量の10倍に上ると言われている。

一方、FSHの合成については、GnRHがその維持に不可欠とみられるものの、性腺に関わるさまざまな因子により調節されている。下垂体でのFSHの貯蔵は少量で、その分泌量は生合成の速度と程度を正確に反映している。

GnRHは視床下部より、休止時間を間に挟む一連の急激なバーストにより放出される。GnRHの分泌がパルス状であることにより、標的器官は常にホルモンの刺激に曝露された状態が保たれる:もし高濃度の絶え間な

い刺激であれば、標的器官の脱感作が起こることになる。高濃度のGnRHの継続的な投与は、下垂体のGnRHに対する反応性を次第に減退させることが、実験的に示されている。この脱感作は、おそらく下垂体細胞の細胞膜のGnRH受容体数の減少により起こると考えられている。

FSHは、視床下部・下垂体・性腺軸上の1つ下位のレベルで卵胞の発育を刺激する。LHは、内卵胞膜でコレステロールからのアンドロステンジオンの合成を刺激する。アンドロステンジオンはテストステロンに変換され、テストステロンは、卵胞の顆粒層細胞内でFSHの作用の下、芳香族化されて 17β -エストラジオール(エストラジオール)になる。エストラジオールは視床下部および下垂体に正のフィードバックをもたらし、GnRHのパルス状放出の頻度を増加させる。エストラジオールが一定の閾値を超えると、視床下部が反応してGnRHが急激に放出され、これを受けたLHの急激な放出により、排卵が誘起される。このように、卵巣の機能においては、FSHが卵胞の発育を刺激する一方、LHは卵胞の成熟、エストラジオールの産生、および排卵を刺激する。また、LHは黄体の形成と早期の黄体機能もサポートする。

エストラジオールの主要な効果のひとつは、発情徴候の誘発である。雌動物の発情とは、発情周期が繁殖可能な期間に入っており、交尾を許容する状態にあるというシグナルを他の動物に示す、行動的・身体的徴候を意味する。

顆粒層細胞では、インヒビンも産生される。このホルモンの作用は完全には理解されているわけではないが、「阻害」という意味の英語と同義の名前(inhibin)は、下垂体からのFSHの放出に対する負のフィードバックにより卵胞の発育をコントロールすることに由来する。排卵後、卵胞の残留物はLHの作用の下、黄体に再構築される。そして卵胞の空洞には血管が形成され、顆粒層細胞は大きさが増大する。黄体は主に分泌に関わる器官で、プロゲステロンとオキシトシンを産生する。

プロゲステロンは牛の正常な発情周期では必要不可欠なホルモンであり、受胎後には、妊娠の維持において主要な役割を担うホルモンである。GnRHのパルス状放出を減少させることにより、新たな排卵を阻害する役割がある。さらに、発育する胚の着床のために子宮内膜を備えさせ、さらに妊娠に悪影響のある、子宮壁の制御不能な収縮を抑制する働きもある。排卵によって卵胞から放出される卵子が受精しない場合、妊娠を知

らせるシグナルが出ることはなく、排卵後16日目頃に非妊娠子宮の内膜はプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$)を放出する。

PGF $_{2\alpha}$ は、黄体の退行プロセスを始動させる。プロスタグランジン類の黄体退行機序は完全に解明されていないが、血管収縮による黄体への血液供給量の減少、および黄体細胞自体への直接作用が関与していると考えられている。黄体退行が開始される最初の部位は、老化した黄体の大型黄体細胞である(Weems et al. 2006)。黄体で産生されるオキシトシンも、黄体退行において役割を持つと考えられている。非妊娠反芻動物の子宮内膜でのオキシトシンとその受容体の結合は、PGF $_{2\alpha}$ のバルス状分泌を刺激する。過去10年間に行われた実験は、エストロゲン(エストロン、エストラジオール及びエストリオールの総称)が子宮内オキシトシン受容体の発現を上方調整し、プロゲステロンが下方調整するという証拠を示している。しかしながら、子宮の標的細胞内での細胞内ダイナミクスが、発情周期のエストロゲンとプロゲステロンの曝露量変化によりどのような影響を受けるかは、現在考えられているよりも複雑な問題である可能性がある。子宮内膜のPGF $_{2\alpha}$ 分泌は黄体退行を始動させる。子宮静脈のPGF $_{2\alpha}$ は発情後、雌羊では11~13日目、雌豚では13~14日目、そして牛では16~17日目に増加し始める(Weems et al. 2006の総説より)。

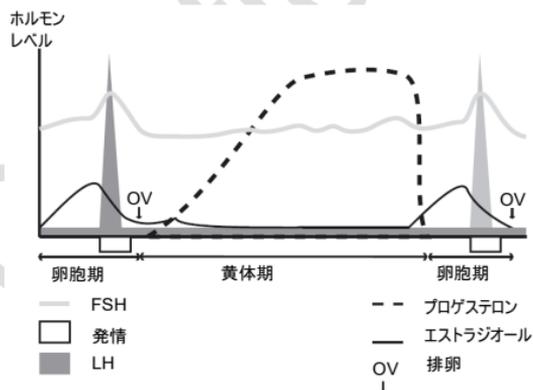


図3 牛の発情周期のホルモンレベル

黄体の退行により、血中のプロゲステロン濃度は低下し、視床下部に対するGnRH放出の遮断効果は解除される。これにより、新たな卵胞期

の開始と排卵前卵胞の最終的な発育が促進される。エストラジオールの産生を特徴とする卵胞成熟、発情、および排卵の期間は、発情周期のうちの卵胞期と呼ばれる。プロゲステロンが優勢となる、排卵から黄体退行にかけての期間は黄体期と呼ばれる(図3を参照のこと)。

繁殖に関与するホルモンを、その生成部位、主要機能、化学構造とともに表1に示す。なお、この表に含まれているのは、個々のホルモンについて知られている作用の一部のみであり、これらのホルモンの機能は完全には理解されているわけではない点に留意することが重要である。この表はすでに知られている内分泌作用のみを含んでいるが、ほとんどの生殖ホルモンは、まだ十分に研究されていない様々な傍分泌機能も有している。雌および雄の繁殖は、これらのホルモンの見事に調和した作用と反作用の相互作用により調節されている。過去数十年において著しい研究成果が上がっているものの、これらの極めて複雑なプロセスの完全な理解には未だ至っていない。

1 哺乳類の繁殖生理

表1 卵胞刺激ホルモン(FSH)の生物活性 (Norman & Litwak 1997より編集)

名称	生成部位	主要機能	化学構造
メラトニン	松果腺	昼/夜の長さの指標	インドールアミン
GnRH	視床下部	下垂体によるFSHおよびLHの放出を刺激する	ペプチド (10アミノ酸)
FSH	下垂体前葉	雌: 卵胞の発育と成熟を刺激する 雄: 精子形成を刺激する	糖タンパク質 (200を超えるアミノ酸)
LH	下垂体前葉	雌: 卵胞の成熟を刺激し、排卵、黄体の形成と維持を誘起する 雄: テストステロン産生を刺激する	糖タンパク質 (200を超えるアミノ酸)
エストロゲン類 (17β-エストラジオール)	卵巣(卵胞の顆粒層細胞)	発情行動を誘起する、排卵前のGnRH放出を刺激する	ステロイド
インヒピン	雌: 卵巣(卵胞の顆粒層細胞) 雄: 精巣(セルトリ細胞)	雌: 下垂体によるFSH放出を抑制(フィードバック機構)する	ペプチド
プロゲステロン	卵巣(黄体)	胚の着床に適した状態に子宮内膜を準備させる、妊娠を維持する、GnRH放出を減少させ新たな排卵を抑制する	ステロイド
プロスタグランジン F _{2α}	子宮	黄体の退行	脂肪酸

1.4 雄における繁殖調節

雄の繁殖も、基本的には雌と同様の原則に従って同じパターンを示す。雄表現型でも、発達と維持の役割を担うホルモンはゴナドトロピンである。ゴナドトロピンには、黄体形成ホルモン[LH、以前雄では間質細胞刺激ホルモン (ICSH)と呼ばれていた]、および下垂体により産生される卵胞刺激ホルモン(FSH)に加え、精巣により産生されるテストステロンなどの雄性ステロイドホルモンおよびインヒピンが含まれる。特定の状況下では、雌

性ステロイドホルモンであるエストラジオールとエストロンも雄で重要な役割を果たす。図4に雄における繁殖機能の制御系を示す。

視床下部からのGnRHは、FSHとLHの放出を刺激する。雄では、春機発動時期に、FSHがテストステロンとともに精巣の精細管のセルトリ細胞に作用し、精子産生を開始させる。成熟以降、生涯を通じて、FSHは精細管(生殖子およびセルトリ細胞)に直接作用し、精子形成を刺激する。セルトリ細胞はインヒビンを産生し、下垂体によるFSH分泌に対し負のフィードバック作用をもたらす。表2に、雄におけるFSHの生物活性の概要を示す。

表2 雄におけるFSHの生物活性 (Norman & Litwack 1997より編集)

標的細胞	作用
未成熟セルトリ細胞	有糸分裂を刺激
成熟セルトリ細胞	精子形成の始動 インヒビン合成の始動 アンドロゲン結合蛋白質 (ABP)、GnRH様ペプチド、ミュー管抑制因子 (MIF)*、プラスミノーゲン活性化因子、およびトランスフェリンなどの新たなタンパク質産生の刺激

* ミュー管抑制因子 (MIF) は、雄の胚形成中に、ミュー管の退化を引き起こす性腺ペプチドホルモンである。

LHは、ライディッヒ細胞によるテストステロンの産生を刺激する。テストステロンは、視床下部によるGnRHのパルス状放出を抑制することによりLH分泌に負のフィードバック作用を及ぼすため、LHの分泌はテストステロンとエストラジオールの血中濃度と反比例関係にある。

LHはライディッヒ細胞とセルトリ細胞の両方で生物学的応答を誘発することで知られているが、LH特異的受容体はライディッヒ細胞のみで確認されている。これは、セルトリ細胞に対するLHの作用が、傍分泌機序を介したものであることを示唆する。FSHに対する特異的受容体は主にセルトリ細胞に存在するが、精原細胞にもある程度存在している。

テストステロン(セルトリ細胞に作用する)は、精子形成にも必要である。機能性アンドロゲン核内受容体の存在は、精巣組織内のライディッヒ細胞、セルトリ細胞、および管周囲細胞内で認められている。テストステロンとその他のアンドロゲンは、雄の生殖器官の分化と成熟、雄の二次性徴の発現、および雄の繁殖における役割に合致する行動を司る。

1 哺乳類の繁殖生理

ライディッヒ細胞は、下記の主要機能を有している：テストステロンを産生すること、および精子形成プロセスに影響を及ぼすために精細管およびセルトリ細胞との複雑な傍分泌相互作用を開始させることである。性成熟に達する間、セルトリ細胞はその生化学的な機能と形態の両面において成熟する。そして、いわゆる血液精巣関門が形成される。セルトリ細胞は5つの重要な機能に関与する。すなわち、アンドロゲン結合タンパク質（ABP）などのユニークな調節タンパク質の産生、発育する精子への栄養供給、損傷した精子の貪食、成熟した精子細胞を運搬するための重炭酸塩およびカリウムに富む体液の生成、およびテストステロンからのエストラジオールの産生である。

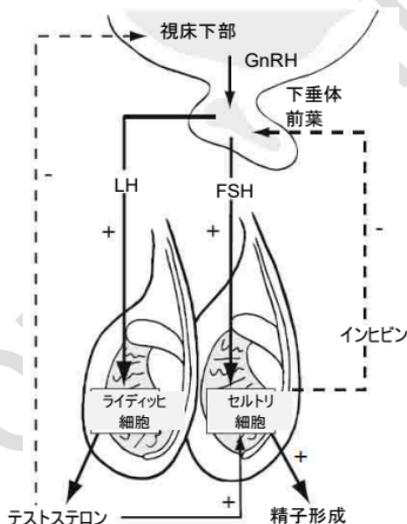
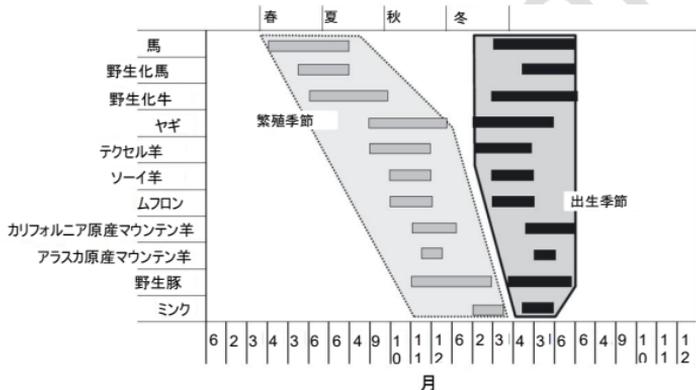


図4 雄の繁殖機能制御における相互関係

1.5 季節性

温帯地方では、動物は1年周期で繰り返す季節的な温度、天候、飼料資源量の変動に曝されるが、これらがその繁殖活動に影響をおよぼす場合がある。ほとんどの野生種、そして一部の家畜種に共通する特徴の1つは、一年のうち最適な時期、多くの場合は春に出産を迎えるように仕組みられた季節性繁殖の発達であり、これにより冬が訪れる前に、新生子が最適な気候および飼料資源の下で成長できることである(図5)。



テクセル羊: オランダ原産の家畜羊の一種、ソーイ羊: 原始的羊の一種で北欧原産の短尾種の羊

図5 一部の哺乳類における繁殖と出生の季節 (Chemineau et al. 2008より編集)

これは、性的活動期(発情期)と性的非活動期(発情休止期)が交互に起こることを意味する。家畜種のうち、羊、山羊、および馬では、繁殖プロセスの季節性がしっかりと保持されている。例えば、羊では、日長時間の短縮に伴い性的活動が開始され(短日性繁殖動物)、馬では、日長時間の延長に伴い性的活動が開始される(長日性繁殖動物)。温暖気候および寒冷気候のもとでは、馬や羊が十分な飼料があり生存の可能性が最も高い春に子を分娩するのはこのためである。動物種や品種に拘わらず、繁殖期は通常、生涯を通じて非常に安定的で、雌の排卵活動の開始と終了のタイミングは比較的一定しており、雄の精子産生量が最大値に達する時期も同様に一致している。この正確で持続的な時期設定は、雌雄両者での性的活動の発現および繁殖季節を、外的環境因

子に合致するように同期化できるようにするための複雑なメカニズムによるものである。

松果腺は、繁殖の季節性を調節する主要器官である；目および複合的な神経連絡を介して、日長を感知する(図6参照のこと)。松果腺はインドールアミンを産生し、そのうち最も重要なのはメラトニンで、メラトニンは夜に(暗い環境で)産生・分泌される。

日長の短縮に伴い、動物のメラトニン曝露は増加する。羊などの短日性繁殖動物ではこれにより、まだ完全に解明されていない何らかの方法で、視床下部からのGnRH分泌が刺激される。馬などの長日性繁殖動物では、メラトニン曝露の増加は逆の作用をもたらし、視床下部によるGnRH放出を抑制する。こうして日長の差が認識され、性行動を活性化または不活化できる信号に変換される。

一般的に、繁殖活動の内因性概年リズムを決定付ける日長は、2つの異なる、しかし互いに補完的な経路により作用を発揮する。それらは、性腺発達段階の外部環境変化に応じた調節、および同じ種の個体間における繁殖期の同期化である(Chemineau et al. 2008)。

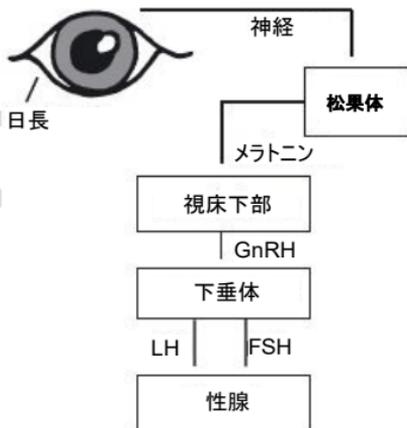


図6 繁殖における松果腺およびメラトニンの役割

1.6 参考文献

- Chemineau P., Guillaume D., Migaud M., Thiéry JC., Pellicer-Rubio MT., Malpoux B.** Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Rerod Domest Anim* 2008; 43 (Suppl. 2): 40-47.
- Clarke IJ., Pompolo S.** Synthesis and secretion of GnRH. *Anim Reprod Sci* 2005; 88: 29-55.
- Ginther OJ., Beg MA., Donadeu FX., Bergfelt DR.** Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci* 2003; 78: 239-257.
- Herbert CA., Trigg TE.** Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals. *Anim Reprod Sci* 2005; 88: 141-153.
- Mihm M., Bleach ECL.** Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci* 2003; 78: 217-237.
- Norman AW., Litwack G.** Hormones. 2nd Edn. Academic Press, 1997.
- Thiéry JC., Chemineau P., Hernandez X., Migaud M., Malpoux B.** Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domest Anim End* 2002; 23: 87-100.
- Weems CW., Weems YS., Randel RD.** Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Vet J* 2006; 171: 206-228.

2 牛の繁殖

2.1 生理

栄養の影響

乳牛群を対象とする多数の研究では、泌乳初期の乳量の顕著な増加により、様々な繁殖に関わる問題が増加することが明らかに示されている (Grohn et al. 1994; Macmillan et al. 1996; Poso and Mantysaari 1996)。さらに、乳牛の非常に高い遺伝的泌乳能力は、その栄養管理の変化と家畜群の頭数増加とともに、繁殖性能の緩やかな低下を伴ってきた。

妊娠後期では、栄養要求量が高いために必然的に乳牛を異化状態におくことになる。分娩後は、乳生産が追加的なブドウ糖、脂肪酸、およびタンパク質の高い要求量を満たすことを強いることになる。

高泌乳牛では、維持と必乳のための高いエネルギー必要量を満たせないことにより、特に分娩後の最初の数週間は負のエネルギーバランス状態になる。

全身を循環する血液中のブドウ糖濃度の低下は、肝臓内の糖新生を促進し、脂肪分解の有効な引き金として作用する。動員された遊離脂肪酸群 (NEFAs) は、乳牛のグルコース濃度を保つための代替エネルギー源として利用され、グルコースは乳腺で乳糖の産生に優先的に利用される。

分娩時に肥満状態にある牛は食欲が減退し、最終的には同じ群の正常な牛よりも負のエネルギーバランスが悪化することが証明されている。このような牛は、より甚大な体脂肪動員と肝臓のトリアシルグリセロール蓄積量の増加を示し (Rukkamsuk et al. 1998)、これにより生じる肝臓での脂肪蓄積が分娩後の繁殖障害に関連することを、多くの研究者が指摘している。

泌乳初期の3週間におけるエネルギーバランスは、分娩と分娩後最初の排卵の間隔に密接に関連している (Butler 2000)。さらに、深刻な負のエネルギーバランスは、分娩から分娩後最初の排卵までの間隔を延長させる危険性があるとの報告もある。泌乳初期の数週間における低エネルギー状態は、LH分泌を損なうだけでなく、LHの刺激に対する卵巣の反応性をも減少させる (Jolly et al. 1995; Butler 2000)。

高泌乳牛の内分泌環境

入手可能な大規模研究データの大半は、乳生産と繁殖性の間に拮抗関係があることを示している。その影響の程度が問題として取り上げられてきたにも拘わらず、特に多くの繁殖指標においては、これまでのところ乳生産との明確な関係性は実証されていない。しかし野外でのデータでは、高泌乳牛は未経産牛と比較して受胎率が大幅に低下することがはっきりと示されている。高泌乳牛の繁殖成績に及ぼす高レベルの乳生産が持つ負の影響は、繁殖機能の様々な側面を通して調節し得るものである。

発情強度とその持続性に対する高レベルの乳生産の負の影響について、これまでの研究文献では一致した見解はみられていない。しかし、現場の獣医師と生産者の双方は一樣に、高泌乳牛が発情発現に関する問題を引き起こしていることを報告している。Lopez et al. (2004) が報告した試験では、発情期間とエストラジオールの最高濃度との正の相関および乳生産との負の相関関係が認められている。Wiltbank et al. (2006)は、高レベルの乳生産が、循環血液中のエストラジオール濃度の低下につながり、結果として発情期間が短縮し、その強度が減少することを示唆している。また、エストラジオールの濃度低下は、高泌乳牛におけるエストラジオール誘発性の発情、GnRH-LHサージ、および排卵に至るまでの間隔の延長により、卵胞径の増加を引き起こす。

以上より、産乳量が特に高い牛では、その高代謝率のため、非泌乳牛とは内分泌状態が明らかに異なる。牛の泌乳量が多くなるにつれて、卵胞がより大きく発育するが、循環血液中のエストラジオール濃度は低濃度である (Lopes et al. 2004)。さらに、高泌乳牛では黄体組織容量がより大きいにも拘わらず、循環血液中のプロゲステロンは低濃度である。それは、泌乳牛において、乳量の増加に伴いステロイドホルモンの代謝が増加するためである。

Wiltbank et al. (2006)は、泌乳牛における繁殖関連の変化の一部は、飼料の摂取および肝臓を還流する血液の増加による、ステロイド代謝の劇的な増加に起因するものであるという考えを提示している。泌乳牛では、高栄養水準が継続すると、肝血流量の慢性的な上昇をもたらす、同様の体格および年齢の非泌乳牛にみられるステロイドホルモンの代謝速度の約2倍に達する。最近の試験結果は、ホルモン産生量が同等の場合でも、ステロイドホルモンの循環血液中の濃度は泌乳中の方が低いことを示している (Sangsrivong et al. 2002; Wiltbank et al. 2006)。

発情開始時点の低濃度エストラジオールに加えて、エストラジオールの代謝亢進により、LHサージ後に循環血液中のエストラジオールのより急激な減少

が見られるようである。このことは、高泌乳牛において発情持続期間が短縮する結果となる。高レベルの乳生産によるステロイド代謝の亢進は、受胎性により深刻な悪影響も及ぼし得る。排卵前卵胞と卵母細胞が、増加したLHパルスに長期間曝露される可能性があり、これにより卵母細胞の刺激過剰または未成熟な状態で活性化されることによる排卵が生じ、受胎性の低下につながるかも知れない。また、排卵後のプロゲステロンの上昇速度の減少も、胚の生存率低下による受胎性低下につながる可能性がある。

さらに高泌乳牛では、卵巢レベルで卵胞の成長と発育が、インスリン、インスリン様成長因子1(IGF-1)、レプチン、およびNEFA濃度の変化に直接影響を受ける可能性が高い。インスリンは卵胞の成長、成熟、およびステロイド産生を局所的に刺激するため、分娩後のインスリン濃度低下は、卵胞の発育障害との関連性が考えられる。

負のエネルギーバランスの影響は、牛の体調が回復し始めた後にも認められることを認識することが重要である。複数の研究者は、分娩の2～3ヶ月後という早期に、排卵前卵胞の健全性に及ぼす不良な代謝状態の持ち越し効果があると考えている。このような卵胞では、十分な量のエストラジオールを産生する能力が低く、含まれる卵母細胞の品質が粗悪で、排卵後、ステロイド産生能力の低い黄体が形成される可能性がある。

牛の発情周期における生理学

牛の性周期には、一般的に季節性はみられない。発情は、平均21日ごと、18～24日の範囲内で観察される。発情発現があった日は、周期の0日目とする。その持続時間は比較的短く、平均10時間、4～24時間の範囲で持続する。排卵は発情発現から約30時間後、すなわち発情行動の終了後に起こる。卵子の受精は卵管内で起こる。胚は、5日目ごろ卵管から子宮に下降する。妊娠は279～290日持続する。分娩から最初の排卵までの間隔は、牛の品種、栄養状態、産乳量、季節、および哺乳子牛の存在により大きく変動する。分娩後の最初の排卵は、しばしば発情行動を伴わず、この状態は「鈍性発情」として知られている。2.4.1を参照のこと。

牛における卵胞の成長

反芻動物での卵胞の成長と発育は、発情周期当たり2～3回の連続した卵胞波によって特徴づけられる。超音波検査の導入により、卵胞の発育と選択のステージについて、大量の情報が収集できるようになった。各卵胞波において、卵巢内の貯蔵卵胞全体から卵胞の1集団が動員され、選択され

た主席(優勢)卵胞が、排卵前期まで成長を続け成熟する一方、他の卵胞は閉鎖退行する。卵胞発育は、成長期、選択期、および逸脱期の3つの明確な段階に区別できる。

各卵胞波では、3~6個の卵胞が同時に動員され、直径4~5mm以上に発育する。卵胞波の開始後数日以内に、1つの卵胞が主席卵胞として発現する。主席卵胞は発育と分化を続ける一方で、他の卵胞は発育を止め、閉鎖退行する。2回の卵胞波からなる周期では第1波の主席卵胞は、3回の卵胞波からなる周期では第1波および第2波の主席卵胞はそれぞれ退行する。しかし、いずれの卵胞波の主席卵胞も、それが1つ目の波のものである場合を含め、優位性を維持する期間中の黄体退行の誘起(PGF_{2α}の投与等による)などの適切な内分泌条件が与えられた場合には、排卵し得る卵胞である。

卵胞波の動員

牛およびその他の種では、卵胞波に先行して、または同時に、FSH濃度がわずかに増加する。

1集団として発育する卵胞は、すべてFSHに対し特異的な受容体を有し、その発育はFSHに依存する。この段階で、発育中の卵胞はLH様刺激にตอบสนองするために必要なLH受容体数が不足しており、この成長段階がFSH依存期と呼ばれる所以である。牛では、卵胞の新たな波に関連する、GnRHサーージと同程度の連続的なFSH濃度増加は、発情周期中、分娩後、妊娠中、および春機発動前に発生する。

主席卵胞の選択

いまだその理由は詳しく解明されていないが、FSHのわずかな上昇により動員された卵胞群からは、主席卵胞が1個のみ選択される。主席卵胞を特徴づける性質は、より優れたエストラジオール産生能力であると考えられる。主席卵胞によるエストラジオール、およびおそらくはアンドロゲンの分泌は、FSH上昇の中止と、その後の基底濃度の持続に結びついている(Ginther et al. 2000a,b)。主席卵胞となる卵胞は、FSHが低濃度かつLH濃度の上昇した環境下で発育を続けられるよう、LH受容体を獲得する。このことは、新たに選択された主席卵胞の顆粒層細胞のLH結合能力が亢進していることにより確認することができる。

FSH濃度を間接的に低下させることにより、主席卵胞は下位の卵胞が発育するための重要な要素を低下させ、不可欠なサポートを減らしていくが、同時にFSH濃度が低下しLH濃度が上昇することによって、逆に主席卵胞はその発育のための恩恵を受けている。この主席卵胞が他の卵胞から逸脱して

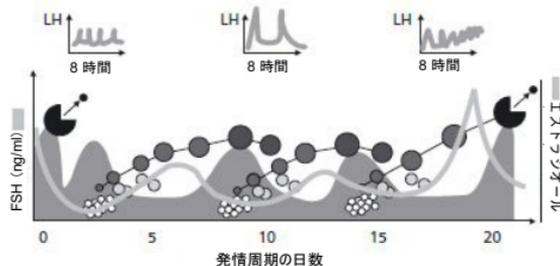
発育する際には、FSH刺激の減退にも拘わらず、主席卵胞は卵胞細胞増殖を維持し、エストロジオール産生を亢進させることができる。主席卵胞がFSH受容体の高mRNA発現量と高FSH結合量を増加または維持している可能性があり、これにより直径8.5mmの閾値を超えることができる(Mihm and Evans 2008)。

近年、成長因子であるインヒピンおよびインスリンなど他の調節因子が主席卵胞の分化と選択において果たす役割についての重要な知見が明らかになった(Fortune et al. 2001; Mihm and Bleach 2003)。成長ホルモンは、インスリン様成長因子1(IGF-1)、およびその主要な担体タンパク質と結合タンパク質の合成速度を増加させる。卵巣がIGF-1遺伝子の発現と受容の両者において重要な部位であることは、今日では広く認められている。IGFシステムのほとんどの化合物は、牛の卵胞で発現する。さらに、最近 Silva et al. (2009)が発表した総説では、牛のIGF-1が関与するプロセスとして、一次および二次卵胞の発育の刺激、二次および胞状卵胞によるエストロジオール産生、胞状卵胞の顆粒層細胞の増殖、卵母細胞の生存能力と成熟、ゴナドトロピンに対する卵胞の感度上昇、卵胞の優位性、および複数排卵が挙げられている。

IGF-1はFSHの誘発する顆粒層細胞分化、また特にLH受容体獲得を促進することが確認されているため、後に主席卵胞となる卵胞の非結合型IGF-1の濃度上昇が、主席卵胞が発育する上で有利に作用している可能性がある。

選抜された主席卵胞

選抜後、主席卵胞の発育、エストロゲンの活性化の度合い、および寿命は、LHパルスパターンにより制御されている。そのため、GnRH、そしてLHの放出パターンの変化は、主席卵胞の継続的発育とその排卵に多大な影響を及ぼすことになる。現在、例えば黄体ホルモン療法後に見られるLHパルスの頻度増加は、この卵胞の優勢期間を2～7日から14日に延長し、それにより卵母細胞の生殖能力に影響が及ぶことが広く知られている。牛におけるGnRH/LHパターンに直接および間接的に作用する、栄養、環境、さらに感染因子さえも、主席卵胞の運命に顕著な影響を与え、結果として排卵と受胎性にも影響を与える。



黄体の形成と機能

黄体と呼ばれる他のものとはっきり区別できる構造物が、排卵された卵胞の代わりに形成される。黄体は、排卵された卵胞の顆粒層細胞および内卵胞膜細胞の構造的・機能的変化を含む、黄体形成と呼ばれるプロセスにより造られ、一時的な内分泌腺の構造を呈する。

牛の黄体には、ステロイド産生特性を有する細胞が少なくとも2種類存在する:すなわち、大型黄体細胞および小型黄体細胞である。排卵後、大型黄体細胞は顆粒層細胞から、小型黄体細胞は卵胞の内卵胞膜細胞からそれぞれ形成される。黄体は、ステロイド産生黄体細胞だけではなく、血管内皮細胞、様々な免疫細胞、および線維芽細胞など他の多様な細胞種により構成されている点に注意する必要がある。

黄体の形成は、LHの作用に直接刺激される。しかし、ステロイドホルモンとタンパク質ホルモン、成長因子、エイコサノイド、およびサイトカインが機能的な黄体の確立に重要な役割を果たすことについては、明確な証拠が示されている (Berisha and Schams 2005)。

牛とその他の家畜では、下垂体から放出されるLHが、黄体によるプロゲステロンの合成と分泌の最も強力な調節因子である (Skarzynski et al. 2008)。LHは、特定のLH受容体を介し、小型黄体細胞でのプロゲステロン産生を刺激する。また最近、黄体内のプロゲステロン濃度が、黄体の機能維持をサポートする上で最も重要な因子の1つであることが示されている。

新たに形成される牛の黄体には、第4～6日まで外因性PGF_{2α}の作用に対する抵抗力が備わっている。また、性腺外由来のPGF_{2α}に対する黄体の感度は、黄体期の終了時期に向かって次第に増すようである。

黄体退行

黄体の退行プロセスは、妊娠しなかった動物において持続的な発情周期を発現させるのに必須で、新しい主席卵胞の発育を促し、牛に妊娠成立の

可能性を与える。牛での黄体退行は、発情後第16～17日に、黄体後期に子宮から放出されるPGF_{2α}に惹起されて始まる。牛では、子宮静脈内PGF_{2α}濃度は発情後第16～17日になって初めて上昇する。

黄体退行の一連の過程(カスケード)は、次のように要約できる: 黄体により産生されるオキシトシンは、子宮内膜内の特定のオキシトシン受容体(黄体期後期の卵胞により産生される限られた量のエストラジオールにより誘導される)と結合し、その結果、子宮内膜細胞からのPGF_{2α}放出が刺激される。PGF_{2α}は子宮静脈内に放出され、前述の通り、卵巣動脈を通じて卵巣に到達し、黄体の退行を引き起こす。

黄体の急激な機能的退行は、プロゲステロン産生の減少と、これに続く構造的退行により特徴付けられる。

PGF_{2α}の黄体退行作用機序は完全には解明されているわけではないが、2つの主要な機序が示唆されている:

1. 黄体の血流量減少

最近、黄体血流の急激な減少は、PGF_{2α}の主要な黄体退行作用の1つであるという説が提示された。黄体退行時に起こる組織学的変化には、細動脈壁の細胞の肥大と過形成、血管中膜での弾性線維の蓄積、血管内膜のムコイド変性、内皮細胞の毛細管腔内への突出、およびそれらを横断する接着接合の形成が含まれ、これらの結果として血管径の減少が起こる。また近年、PGF_{2α}類縁体の黄体退行を促す用量を黄体中期に投与することにより、黄体退行カスケードにおいて重要な役割を果たすことが確認されている黄体内の血管作動性物質が増加することが確認されている。PGF_{2α}注射後8時間での黄体への血液供給の減少は、最初に黄体容量の有意な減少に反映される黄体の構造的退行の発現と同時に起こることが示された。

2. 黄体細胞への直接作用

通常、LHに応答して産生されるcAMPの合成の減少とcAMPのステロイド産生作用の抑制の双方に起因する、PGF_{2α}の黄体細胞への直接作用は、LH受容体の数の減少によりさらに増幅される。黄体退行の構造相で、黄体細胞はアポトーシスの過程を経る(いわゆる「プログラム細胞死」)。

この説は、PGF_{2α}に誘発される血漿プロゲステロン濃度の減少が、黄体の容量と黄体の血流量の双方の減少が検知される前に生じることを示す研究結果により、さらに裏付けられた。

2.2 牛群の繁殖管理

適正な乳と子牛の生産とは、群内の全ての雌牛が1年に1頭健康な子牛を分娩すること、すなわち365日間隔で分娩することである。分娩後の適正な日数を超えても受胎できない期間は経営的にマイナスであると、多くの研究により報告されている(Groenendaal et al. 2004; De Vries 2006)。今日の多くの専門定期刊行誌では、特に乳牛において、分娩間隔の延長により分娩後のエネルギー資源と繁殖プロセスの回復のための時間がより長く得られ、繁殖成績に好影響をもたらし得るのではないかとすることに疑問を提示している。人工授精の成功率をより高めるためには、自発的授精待機期間(VWP)を経た直後に授精することよりも、通常は分娩の70~90日後に授精することで達成されることが明確に実証されているにも拘らず、酪農および季節的肉用牛経営では、遅い時期の人工授精は概して経済的には合わないと考えられている(Arbel et al. 2001)。

乳牛群の繁殖管理は、農場管理パッケージ全体のほんの一要素に過ぎず、これは獣医療の領域に留まっている。農場の繁殖成績は、牛1頭1日当りの乳生産、後継牛頭数、および積極的または消極的な淘汰処分を通して、採算性に直接影響を与える。繁殖管理プログラムは、多様な現場コスト、畜舎およびその他の農場設備、農場の目指しているゴールとその価値、および経営スタイルにより異なることを認識することが重要である。

牛群の繁殖衛生管理プログラムを成功させるには、獣医療サービスの費用対効果の価値を酪農家としっかりと情報交換することが重要である。

本章では、牛群の繁殖管理の主要側面について概説する。

2.2.1 繁殖性の評価

表1は、乳牛群の繁殖性を分析・評価するために一般的に用いられるパラメーターと目標値の一覧である。

2 牛の繁殖

表1 乳牛群の繁殖パラメーターと目標値

パラメーター	目標値
分娩-受胎の間隔 (平均空胎期間)	< 90日
分娩-初回人工授精の間隔	< 70日
初回授精の受胎率	> 60% (北海道 > 50%)
受胎ごとの授精回数	< 1.5
流産 (妊娠45日～265日齢の間)	< 3%
不受胎を理由とする淘汰処分	< 5%
初回出産時の月齢	24ヶ月齢

哺乳子牛を抱えている肉用繁殖牛群では、離乳子牛が主要な収入源である。繁殖成績の主要な数値を表2に示す。

表2 肉牛群の繁殖パラメーターと目標値

パラメーター	目標値
繁殖期間	< 63日
受胎率 (繁殖季節終了後35日の時点)	> 95%
子牛の分娩時の生存率 (妊娠が確認された牛のうち)	> 93%

これらの数値は、温帯気候で集中管理されている乳牛および肉牛での数値で、同一または類似の地域で飼育される牛群のみと比較する必要がある。

2.2.2 経済的側面

繁殖障害に起因する経済的損失には次の3つの主要要素がある：

- 不適切な時期または非効率な人工授精による損失
- 分娩間隔の延長
- 遺伝能力が高い個体の繁殖障害を理由とする淘汰処分

不適切な時期の人工授精による損失

牛の繁殖成績に影響を及ぼす内分泌障害は、しばしば不規則な発情周期、発情兆候の欠如、または排卵の遅延となって現れる。管理不良も原因

であるが、この結果、不適切な時期に人工授精を実施することになる。人工授精を反復すると、人工授精にかかるコストを増加させ、精液の無駄を生む結果となる。

分娩間隔の延長

分娩間隔が延長すれば、結果として泌乳期間および乾乳期間が延長する。損失総額は、分娩間隔の延長に伴い増大する(表3を参照のこと)。分娩間隔の延長は、分娩後の受胎に至る人工授精実施日の間隔が延長することに直接起因しており、空胎日数により表される。分娩と授精の間隔延長による損失は、合計乳生産量の減少として現れることが広く知られている(表3を参照のこと)。

表3 乳牛群の空胎日数に関連する推定損失

泌乳	一日当り純損失乳量
標準乳量 - 6.000 L/泌乳(305日)	
初産	10.88L
5産	15.03L
平均	13.72L
高乳量 10.000 L/泌乳(305日)	
初産	16.97L
5産	21.18L
平均	19.87L

出典: Esslemont and Kossaibati (2002)

繁殖障害を理由とする淘汰処分

近年の淘汰処分による更新率は、米国の大規模なコマーシャル農場では34%に上ることもあり、世界の大規模農場の多くでもほぼ同等で、繁殖障害が主要原因の1つとなっている。

不受胎のために成熟前に淘汰されることが原因による損失額は、処分される牛の月齢と乳生産量により変動する(図1)。これらの損失は、その牛から将来得られるであろう収入に相当する。これらの損失は、高泌乳牛にとって2産目の泌乳期において最大であり、その後年齢増加と乳生産量低下に伴い減少する(Dijkhuizen et al. 1991)。

高価値の若い牛が淘汰処分される場合、将来の乳生産量だけでなく、後継の未經産牛の供給源としての遺伝的な潜在力も失うことになる。

2 牛の繁殖

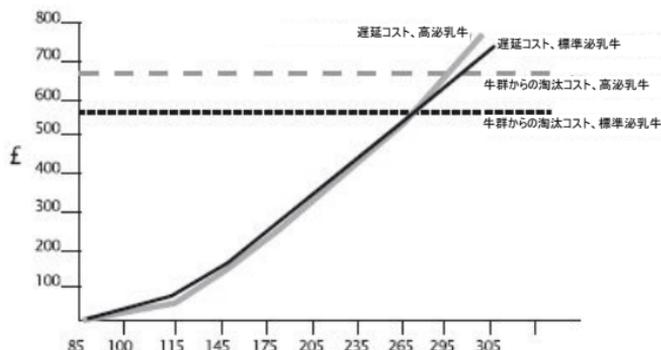


図1 家畜群の淘汰処分の推定コスト
出典: Esslemont and Kossaibati (2002)

さらに、年間更新率が高い場合、牛群の年齢構成において、初産牛が増加する傾向が高くなる。分娩後の繁殖障害は初産牛で最も高く、この傾向が一定の閾値を超えると、乳生産と繁殖効率の双方に悪影響が起きてくる。

2.2.3 妊娠診断

高水準な繁殖効率を維持するためには、乳牛および肉牛双方における妊娠の正確な早期診断が不可欠である。早期診断は、個体および群の両レベルで受胎性を早期検知するためにも必要となる。

発情非回帰(ノンリターン)

繁殖供用(交配あるいは人工授精)後3週間前後で発情が認められない場合、原則として妊娠状態であると見なされる。しかし、発情監視が効果的に行われていたとしても、これらの牛全てが妊娠しているわけではない。一方、妊娠牛7%ほどは、妊娠中に発情の兆候を示す。このような牛に人工授精した場合、胚死滅または死産に至ることがある。

直腸検査

早期妊娠診断(1~3ヶ月)は、以下の組み合わせにより行われる: 左右不対称な子宮角、妊角の弾性減少と妊角内の波動を呈する内容物(後には両角に認められる)、妊角側卵巣の触知可能な黄体、胎膜スリップ反応陽性、および羊膜囊の触知である。その後の妊娠ステージ(3ヶ月経過後)では、

子宮頸の位置が骨盤縁の前方に位置するため、子宮を容易に引き出せなくなる。子宮は弛緩し、宮阜(子宮小丘)や、ときには胎子も触知可能である。子宮動脈の直径が増大し、震盪音が検知可能である。表 4 を参照のこと。

表 4 直腸検査での妊娠徴候

妊娠ステージ	胎膜スリップ	羊膜嚢	胎子	宮阜	子宮動脈の震盪音	
					同側	対側
30日	+	+				
45日	+	+				
60日	+	+				
75日	+	+		+		
90日	+		+	+		
105日			+	+	+	
4ヶ月			+	+	+	
5ヶ月			+	+	+	+
6ヶ月				+	+	+
7ヶ月			+	+	+	+

直腸検査の利点は、速やかに結果が得られ、非妊娠牛への処置を早期に行えることである。牛を保定するのに適切な設備が利用可能であれば、最小限の機器と人員のみで行うことができる。熟練した獣医師であれば、妊娠30日から牛の妊娠を検知できる。

直腸検査での誤診の一般的要因として、子宮をうまく引き出せなかったこと、異常な子宮内容物(子宮蓄膿症または子宮粘液症)の存在、および繁殖供用日が不正確かつ曖昧なことが挙げられる。直腸からの触診により胚・胎子にリスクが及ぶ可能性については、相反する報告がある。羊膜嚢の早期または不適切な触診により、胚が損傷を受け、胚が死滅する可能性がある。しかし、Romano et al. (2007) の近年の発表では、妊娠34～41日に、いわゆる「胎膜スリップ」技術を用いた直腸検査により妊娠診断を行っても、胚・胎子の生存性に影響が及ばないことが示されている。

上述した直腸検査の利点に拘わらず、この方法による妊娠診断では胎子の発育(奇形、生存能力等)に関する情報が得られず、また、非妊娠と診断した場合は、人工授精を再び安全に行えるまでの期間を比較的長くとらなければならない。

プロゲステロン・アッセイ

繁殖供用(交配あるいは人工授精)後18～24日での開花期黄体によるプロゲステロンの分泌は、妊娠の早期兆候で、乳または血漿により評価が可能である。この評価は、発情周期が長いことによる偽陽性診断を避ける意味において、繁殖供用(交配または人工授精)後24日目に行うのが最適である。

Pieterse et al. (1990)の研究では、臨床的に用いる生乳中プロゲステロン酵素免疫測定法(EIA)の感度(妊娠検知の正確さ)は93.1%であった。しかし、その特異度(非妊娠検知の精度)はわずか39.3%で、これは実際には妊娠していないかなり多くの牛が妊娠と診断されたことを意味する。誤診の原因として最も多いのは、早期胚死滅だけではなく、子宮蓄膿症/黄体遺残、発情周期が短いこと、卵巣囊腫(黄体囊腫)、検体と診断キットの不適切な取扱いである。

これは、プロゲステロンの測定値のみに依存するだけでは不十分であり、交配の約40日後かそれ以降に直腸検査で妊娠を確認する必要があることを示している。ただし、授精日と第21日の間および第24日目に連続してサンプルを採取した場合には、非妊娠の早期診断の精度は95%～100%に近づく。このように、生乳中プロゲステロン濃度測定を非妊娠の牛の早期検知のために用いることにより、繁殖プログラムへの再導入が可能となる。

超音波検査

経直腸超音波断層法を用いた妊娠早期の妊娠状態の判定は、乳牛の繁殖管理において最も実地的な超音波応用法の1つである(表5)。自然交配または人工授精後の非妊娠牛の早期検知は、人工授精供用間隔を短縮し、人工授精供用率を増加させることにより、繁殖効率と受胎率を高める。リアルタイム(Bモード)超音波は信頼性が高く、比較的簡易な妊娠診断法である。ほとんどの農場条件下では、早ければ人工授精後26日目には超音波を用いて迅速かつ正確に妊娠を診断することができる。

超音波スキャン技術を用いた場合、99%以上の精度に到達可能で、受胎性に関する問題を迅速に特定することができる。一般的に、農場において超音波検査が実際に応用できるかどうかは次の2つの要因に左右される:それは、検査者のその技術に関する習熟度及び牛の保定設備とそれへの牛の誘導率である。両方の要因が最適化された場合、超音波検査の速度を直腸検査のそれと同等にすることができ、一方で各個体から直腸検査以上の情報を収集することができる。スキャン法の主な利点は、直腸検査よりも早期に正確な診断を下すことができる点である。

表 5 超音波検査により確認可能な牛の受胎産物の初回検知日

特性	初めて検知可能な日齢	
	平均値	範囲
胚本体	20.3	19 ~ 24
心拍	20.9	19 ~ 24
尿膜	23.2	22 ~ 25
脊髄	29.1	26 ~ 33
前肢芽	29.1	28 ~ 31
羊膜	29.5	28 ~ 33
眼窩	30.2	29 ~ 33
後肢芽	31.2	30 ~ 33
胎盤節	35.2	33 ~ 38
複蹄	44.6	42 ~ 49
胎動	44.8	42 ~ 50
肋骨	52.8	51 ~ 55

Curran et al. (1986)より引用

超音波は直腸検査より妊娠を早期に確認できるため、多くの場合妊娠損失の検知率は高まる。人工授精後28日目に妊娠が確定された牛のうち、10～16%は56日目までに早期胚死滅・胎子損耗を経験する(Mee et al. 1994; Vasconcelos et al. 1997)。そのため、超音波を用いて人工授精後28日目に妊娠が確定された牛については、その後は胎子損耗率が大幅に減少する60日目前後に再検査を実施すべきである(Vasconcelos et al. 1997)。

双胎妊娠の確認

経直腸的超音波法により、交配あるいは人工授精後40～55日目までには双子を受胎している牛を正確に確認できる。双胎を確認するために早期検査を実施する際には、両側の子宮角を全長にわたって入念にスキャンし、胚を見落とさないようにしなければならない。双子が確認された場合、牛の種類(乳牛、肉牛、乳肉兼用種)により、中絶、再交配、継続管理など、分娩までのいくつかの管理方法が考えられる。双胎妊娠への対応方法は現場の条件下では限られているが、双胎妊娠牛の確認は、常に多くの利点があり、分娩時に特別な看護を要する。

胎子の性別判定

経直腸超音波を用いることによって、生殖結節の形態と位置を検査することにより牛胎子の性別を判定できる；これは、妊娠55～60日目の期間において信頼性および正確性のある方法である (Fricke 2002)。早期妊娠診断や卵巣構造の検査と比較して、胎子の性別判定でははるかに高いレベルの習熟度と経験が必要とされる。胎子の性別判定は魅力ある技術であるが、得られる情報が経営的観点から利用できるものである場合にのみ繁殖管理に導入すべきである。酪農経営において、雌胎子を妊娠している牛の比率を知ることは、更新用の若雌牛を群から選抜する場合には価値がある。更新用の牛の期待頭数が必要数に満たない場合、他の導入先からの購入を計画しなければならない。一方で、胎子の性別判定を効果的に利用し、特定の比率の乳雄子牛を生産して人工授精センターなどに販売することもできる。

妊娠特異的分子の検出に基づく早期妊娠診断

過去10年間で、牛の早期妊娠診断のために、妊娠特異的タンパク質の検出に基づく技術が開発された。

妊娠関連糖タンパク質 (PAGs)

妊娠関連糖タンパク質 (PAGs) は、妊娠特異タンパク質B (PSPB) を含むさまざまな名称で知られている。これらの物質は、真獣類の胎盤の外層上皮細胞層 (絨毛膜/栄養外胚葉) 内に発現する巨大な糖タンパク質ファミリーの構成要素である。PAG分子は、アスパラギン酸プロテイナーゼ (AP) として知られるタンパク質分解酵素のグループに属している。近縁性の高いPAG分子が、初期胚盤胞の発育から分娩までの期間、複数確認されている (Sousa et al. 2006)。妊娠特異タンパク質Bは、その種のタンパク質では、牛で確認された最初のもので (Butler et al. 1982)、後に、妊娠関連糖タンパク質と同様のN末端アミノ酸配列を有することが明らかとなった (Xie et al., 1991; Lynch et al., 1992)。妊娠特異タンパク質BおよびPAGは両者とも後に、boPAG-1 (牛妊娠関連糖タンパク質1) として再分類されている。

牛体内のPAG平均濃度は、妊娠15～35日目に増加する。しかし、血清PAG濃度の個体間変動により、信頼性の高い妊娠指標としての使用は妊娠26～30日目ごろまでに制限される (Humblot 2001)。

放射免疫測定 (RIA) (Haugejorden et al. 2006; Lopez-Gatius et al. 2007; Ayad et al. 2009) または酵素結合免疫吸着法 (ELISA) (Green et al., 2005; Silva et al. 2007; Friedrich and Holtz 2010) のいずれかを用いた

複数の診断法がある。大学および研究施設の複数の研究室では、実験目的でPAGに基づく検査が妊娠診断に用いられており、一部では商業的サービスとして獣医師にこの検査が提供されている。

PSPB用のELISA試験(BioPRYN™、BioTracking社、モスクワ、アイダホ州、米国)は、米国、カナダ、オーストラリアおよびハンガリーで入手可能である。この試験は、認可を受けた研究所で血清検体を用いて行われ、乳牛および肉牛では授精後30日目から、若雌牛では28日目からの妊娠診断に使用することが推奨されている。現時点で入手可能なデータでは総じて、この種の試験は授精後30日目以降に実施した場合に優れた診断価値があることを示している。PAG分子は分娩後も長期間血液循環中に残存するため、PAGによる試験は、分娩後60日以上経過後に授精した牛のみを対象とすることに留意する必要がある。

EPF(早期妊娠因子)/ECF(早期受胎因子)

早期妊娠因子(EPF)は妊娠マウスにおいて発見され(Morton et al. 1976)、その後、羊と牛においてロゼット抑制試験により同定された(Nancarrow et al. 1981)。

EPFは、特定の増殖調節および免疫調節特性を有することが確認されており、妊娠成立と、in vivoおよびin vitroでの正常細胞および新生細胞増殖を成功させるために必要な物質である(Cavanagh 1996)。ロゼット抑制力価の有意な差異は、人工授精後13、16、および25日目の妊娠および非妊娠牛間に認められ(Sakonju et al. 1993)、EPF活性測定値を早期妊娠診断に使用できることが示唆された。複数の文献が、EPFに基づく臨床検査の正確性を評価する試験で相反する結果を報告しており、人工授精後早期に使用した場合に特異性が低いことを示している(Cordoba et al. 2001; Ambrose et al. 2007)。

近年、新たに市販の牛用早期妊娠検査が利用可能となった。早期受胎因子(ECF)試験(Concepto Diagnostics社、ノックスビル、テネシー州)は、受胎後48時間以内に妊娠関連糖タンパク質を検知することが報告されている。ただし、有望なデータは限られており、現場での大規模な使用を推奨するには未だ十分とは言えない。

2 牛の繁殖

2.2.4 発情および発情確認

繁殖成績は、乳牛群および肉牛群の生産性と経済効率に影響を与える主要な因子である。人工授精を使用する牛群では、発情発見率と受胎率は、分娩季節の短縮度と最終的な分娩間隔を決定する2大因子である。発情発見が不十分かつ／あるいは不正確な場合、人工授精実施の遅延、受胎率の減少、そして結果として分娩間隔の延長につながる(表6)。

発情

発情は、排卵直前に発生する生理学的及び行動的徴候の複合したものである。発情は4～24時間持続する。発情の徴候としては:乗駕許容、外陰部の腫脹、膣粘膜の充血、透明で弾性のある粘性性の膣分泌物、尾根部の毛の逆立ち(軽い皮膚損傷が伴う場合有り)、落ち着きのない状態、グループ形成、顎の擦りつけ、フレーメン、他の牛を舐める・押す・攻撃する、他の牛への乗駕、ロードシス(前弯姿勢)、および飼料摂取量や泌乳量の減少が挙げられる。

発情徴候は、特に何頭かが同時に発情(または発情前期)状態である場合、誤って解釈されることが頻繁にある。これらの様々な兆候のうち、スタンディング反射(乗駕を許容する反射行動)が真に信頼できる発情兆候である。この徴候が発現した牛を、「スタンディング発情」状態にあると言う。

表 6 1日の視認回数による発情目視発見の精度

観察頻度	有効性
1日1回	60%
1日2回	80%
1日3回	90%
1日4回	95～100%

発情発見補助器具

発情発見を容易にするための補助器具がいくつか知られている。

ヒートマウントディテクター

ヒートマウントディテクターは、牛の背の正中線上、尾根部の前に貼り付けて使用する。ディテクターの反応は、牛が乗駕されたことを示す。この器具の実験的評価では矛盾する結果が示されている。ディテクターの紛失、寒冷な気候での乏しい乗駕行動、および密集して収容されている場合の誤検知率の高さが、その理由のすべてとして報告されている。

近年の技術発展により、発情乗駕検知器具はより精巧化してきた。点滅で乗駕回数と初回乗駕時からの経過時間を知らせる検知器もある。

しかし、おそらく最も精巧な検知器は、感圧式の電池式無線送信器を内蔵したものであろう。無線送信器が起動されると、無線信号を送信し、これを受信器が検知する。受信した信号はデジタル化され、日付、時刻、各乗駕の持続時間、および牛の個体識別情報とともにパソコンに保存される。このタイプは米国において広く使用されている。

テールペイントは、尾根部前の正中線上に軽く塗布する鮮明な色のペイント(全長20cm、幅5cm)で、乗駕する牛の摩擦により退色し、摩擦がなければ4週間以上染色が持続する。このツールは発情発見の効率を向上させると考えられるが、小区画畜舎や牛が密集していると誤検知件数が増加すると考えられる。

発情発見用牛

発情発見用牛(精管切除牛またはテストステロン投与した淘汰牛)は、発情した牛に乗駕することにより、飼育スタッフの注意を惹く。チンボールマーカまたは色付きチョークを装着させる場合もある。攻撃的行動や、臍疝行動(お気に入り以外の発情牛を無視)は、この検知システムの欠点である。また、精管切除した牛が生殖器感染症の媒介者である可能性もある。

歩数計

発情した牛の歩数は、発情前後と比較して2倍以上に増加する。したがって、歩数計を用いて歩行距離を測定することにより、発情牛を特定できることになる。ただし、通常時の歩行活動には個体間で有意差があるため、発情の可能性が高い牛の特定について、信頼性の高い閾値を設定することはできない。そのため比較は、同一個体のデータ間でのみ有効である。これによりコンピューター化が必要となり、コストが大幅に増加する。それでも、発情チェックと歩数計による発情発見の組み合わせは、非常に有効かつ正確な検知方法である。

テレビ監視

この方法では、限定されたスペースで、カメラにより牛の挙動を監視および録画する。1日の録画映像を入念に評価する必要があり、牛の挙動の主観的解釈に依存することとなる。

腔粘液の電気抵抗測定—ドラミンスキー法

腔粘液の電気抵抗の変化を、腔内プローブを備えたいわゆるドラミンスキー装置により測定する方法である。

この方法で信頼性のある結果を得るためには、個々の牛について、過去の発情時の測定結果の十分な記録と、現在の発情から数えて少なくとも2回分の測定値が必要となる。単一の測定値は誤った結論を招く場合がある（基準値は提供されるが、個体間差が大きい）。

2.2.5 人工授精のタイミング

受精は、卵管内の峽部と膨大部の接合部で起こる。卵子の寿命は約12～18時間で、その生存能力は時間とともに低下する。人工授精後約8時間後には、卵管峽部に十分な数の精子が到達している。受精には精子の授精能獲得が必要であり、その特徴は、精子の最高度の運動性獲得と先体反応の完了である。排卵に対する授精の最適なタイミング（授精排卵間隔=IOI）は、主に精子の授精能の保有期間と雌生殖器内での卵母細胞の寿命に依存する。

精子の寿命も限られているため、授精の時期が早すぎた場合、卵子と受精する前に死滅してしまう危険性がある。逆に、授精の時期が遅すぎた場合、卵子の受精能力が失われる。

通常は、発情終了後10～15時間以内に排卵が起こる。したがって、最適な授精時期は、発情終了時近くということになる（表7を参照のこと）。実際の条件下では、牛の発情状態は継続的に監視されないため、発情終了時刻は明確には確認できない。卵子と精子はいずれも寿命が限られているため、最適な受胎率が達成される時間幅は約12時間ということになる。

Roelofs et al. (2006)の研究は、受胎の可能性が高いIOIはかなり長いことを示している（排卵の36時間～12時間前の間）。しかし、受精した卵子が正常な胚に発育する可能性が高いIOIはさらに短時間である（排卵の24時間～12時間前の間）。

表 7 発情に関連した最適な授精時期



実際的な見地から、AM/PMルールの使用が最適である。それは、午前中に発情が確認された牛を午後人工授精する方法である。翌朝も発情を示している牛については、再度人工授精をする。午後または夜に発情が確認された牛は、翌朝人工授精する。実際この方法は、受胎の可能性を最大限に確保することと最適な質と発育能力を有する胚を得ることの両方を可能にする折衷策である(図2)。言い換えれば、早めの人工授精は、良質な胚を得る可能性を高めるが、受精率が低下する(卵母細胞を「待つ」ことにより、精子の生存率が下がるため)。一方、遅めの人工授精は、高い受精率を可能にするが(多量の新鮮な精子)、かなり早めに排卵された卵母細胞の老化により、粗悪な胚が生じる危険がある(Saacke 2008)。

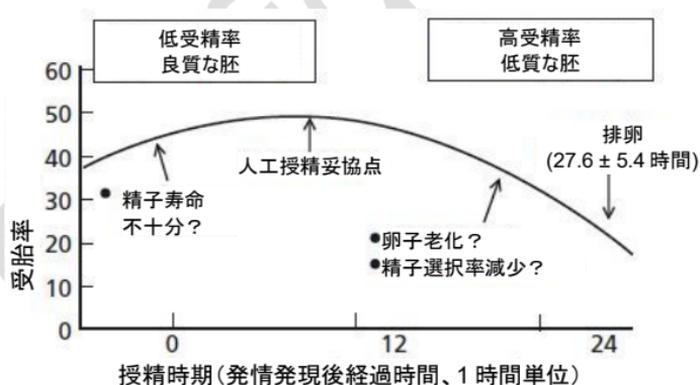


図 2 人工授精時期を関数とした受胎率と胚品質の関係
(出典：Saacke 2008)

2 牛の繁殖

2.3 発情のコントロール

2.3.1 発情のコントロールを行う理由

発情周期を薬剤療法に調節することによって、発情および排卵を誘起したり、発情発現時刻および排卵時刻を制御したりすることができる。

一般的に、牛の発情をコントロールする主な理由は以下に分類できる：

- 肉牛群および乳牛群双方での無発情期／非周期性を管理するため
- 発情発見を容易にするため、また管理上の目的から（人工授精技術者の手配、季節繁殖）、事前に設定された時間範囲内で発情を誘起するため
- 胚移植に関与するドナー牛（供胚牛）とレシピエント牛（受胚牛）の厳密な発情同期化のため
- 鈍性発情、黄体遺残、卵巣嚢腫などの特定の障害を治療するため

発情コントロールプログラムの費用対効果と計画立案

発情コントロールプログラムを牛群に導入する決定を下す際、特に薬剤療法を選択する必要がある場合には、考慮すべき要因がいくつかある。ある農場にとって最も有益となりうるシステムを選択するには、過去の繁殖成績が非常に参考になる。品種、牛群の年齢構成、および生産性のレベルを注意深く分析する必要がある。人的資源、農場スタッフの教育・技能レベルおよび作業環境も考慮しなければならない。複雑な方法を導入する場合には、製剤の正確かつ適切な時期の投与を遵守できるか否かが計画の有効性を決定的に左右するため、これらの考慮が特に重要である。

発情コントロールプログラムの費用は、受胎率向上の可能性や空胎日数の減少だけでなく、発情発見に要する経費が減少することにも心を留めておく必要がある。発情の目視発見は労働集約性がより高いため（たくさんの人手を要する）、同期化プログラムよりも費用をより重視すべきである。体系的な繁殖プログラム導入の有益性を判定する際は、費用対効果を各牛群について計算すべきである。

発情管理のある側面について、肉牛と乳牛で別個に説明する必要がある

肉牛

肉牛群は多くの場合、広範囲に、しかもグループ単位の管理が行われる。そのため発情発見は、乳牛群の場合と比較して労働集約性ははるかに低く、そしてその精度も低下する。哺乳子牛の存在と季節的な影響により、肉牛の周期行動が減退または阻害されることがある。そのため多くの肉牛は、人工授精を行うべき期間である分娩後40～60日に発情の徴候を示すことはない。

大半の肉牛群の繁殖は、特定の時期に限定される。卵巢活動の再開が間に合わず受胎できなかつた牛は、通常淘汰処分される。

肉牛群では、人工授精が自然交配よりもいくつかの利点を有している：

- 雄牛の必要飼育頭数を減らすことができる
- 後代検定済みの雄牛の高品質な精液を使用できるため、牛群の育種価値が上昇する
- より均一な子牛生産が可能になる

肉牛群では、発情発見はしばしば人工授精の成功を制限する要因となる。発情コントロールおよび同期化が、その解決策となる。自然繁殖期間開始時の黄体ホルモン/PMSGシステムの使用により、卵巢活動が刺激および同期化される。それにより、自然交配に依存する場合と比較して、分娩期間を早め、分娩がある全体の期間を短縮することができる。

このようなシステムの有益性は顕著である：

- 分娩期間が集約されるので、密接に監視することになり、難産による子牛の損失を低減できる
- 事前設定した日に離乳させた場合、子牛の成熟度と体重を販売日まで増すことができる
- 分娩期間を短縮化でき、次のシーズンの牛群の受胎率を向上させることができる
- 子牛を月齢が近似する品質の均一なバッチごとに販売することができ、これにより商品価値が上昇する
- 人工授精の使用を可能にし、及び／あるいは促進し、より合理的に精液管理ができる

乳牛

分娩時期が一年全体にわたる乳牛群では、肉牛よりも個体単位の集中的な管理が必要になる。1年で牛1頭当孩子牛1頭という目標により、分娩か

2 牛の繁殖

ら受胎までの間隔は約85日に限定され、この間に子宮修復が完了して卵巣活動が再開し、発情が発見されなくてはならない。一般的に、約25%の乳牛で分娩後40日目までに発情が発見されていない。

乳牛での発情コントロールは、以下に適用するために応用される：

- 分娩後の生理的発情休止期にある牛の発情と排卵を誘起し、分娩から初回授精までの間隔を短縮するため
- 胚移植に向けてドナー牛とレシピエント牛の同期化を行うため
- 発情発見率の向上または発情発見に要する時間の短縮を図り、一群の牛の発情を同期化するため
- 牛群の分娩時期をコントロールするため

多くの酪農場では、発情が効率よく観察されていないために、繁殖成績が著しく制限されている。乳生産量の上昇と、群の頭数規模の増加は、酪農場の繁殖管理方法に影響を及ぼしており、これにより、発情発見の不要な事前設定された時間での人工授精を可能にする発情同期化プログラムの開発機運が刺激されている。

より綿密な経済的分析については、De Vries (2006)、Olynk and Wolf (2008) およびOlynk and Wolf (2009)を参照のこと。

2.3.2 発情コントロールの方法

発情周期をコントロールする有効なシステムに不可欠な要件とは、発情と排卵が予期可能な12～24時間内に高頻度で起こり、かつ事前設定された時間での1回のみ的人工授精によって高い受胎率が得られることである。

ゴナドトロピンがサポートする卵胞の発育中、卵胞が必要とする量は変化するため、いかなる処置牛においても、処置時の卵胞波の段階に拘わらず、予測可能な新たな卵胞波の発現を刺激する目的のための、1種類でシンプルな外因性ホルモン製剤による処方を開発することは困難である。

発情をコントロールするためのすべての薬剤療法を、牛群の繁殖効率の向上、繁殖システムの改善、またはシステムの弱点の補正を目的とした有用なツールとして考えるべきである。場合によっては、発情周期のコントロールシステムは「鈍性発情」や卵巣嚢腫などの特定の繁殖障害の治療処置として用いることができる。

しかし、発情周期をコントロールする薬剤療法は決して、繁殖牛への正しい栄養供給および適切な飼養管理に代わるものとして考えるべきではない。

卵巣が活動状態の牛での発情周期は、次の3つの方法により操作が可能である：

- $\text{PGF}_{2\alpha}$ の使用により、黄体の早期退行を誘起すること
- $\text{PGF}_{2\alpha}$ およびGnRH類縁体の連続使用により、黄体退行誘起後に卵胞発育を同期化させること
- 「人工」の黄体として作用する黄体ホルモンを使用すること

発情休止期（排卵しない）の牛では、卵胞成長と排卵の誘起後に生理的な黄体期間が見込まれる次のシステムを採用すべきである：

- 通常、GnRHおよび/またはPMSG/eCGと併用される黄体ホルモンを基盤としたシステム
- GnRHによる卵巣活動の刺激に続く、オブシンク（排卵同期化）法

$\text{PGF}_{2\alpha}$

発情周期の第6日から第16日まで（天然 $\text{PGF}_{2\alpha}$ の放出期間に相応）に $\text{PGF}_{2\alpha}$ （Estrumate[®]）を投与すると、黄体退行が誘起され、黄体期が終了する。新たな卵胞期が開始され、牛は発情状態を呈し、その後排卵する。誘起された発情での受胎性は、自然発情でのそれと同様である。発情周期を繰り返す、それぞれが異なり、未確認の発情周期ステージにある1群の牛を同期化するには、単回注射では不十分である。初回投与後11～14日後に全頭が開花期黄体を有していることになるので、2回目の注射をこの時期に行う。

急激な黄体退行にも拘わらず、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ による処置後の発情発現までの間隔はさまざま、処置時の牛の卵胞発育ステージに依存する（図3）。機能的な主席卵胞を有する牛では、黄体退行の誘発により主席卵胞が排卵されるため、2～3日以内に発情する（図4）。しかし、卵胞波の優勢相より前期にある牛は、主席卵胞を形成するのに2～4日を要するため、発情発現の間隔までの間隔がより変動的である。

2 牛の繁殖

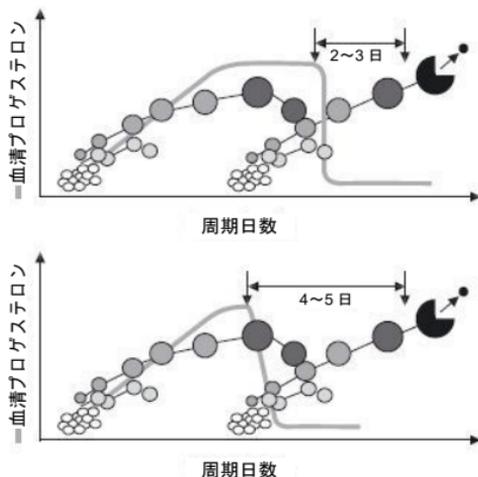


図3 牛におけるPGF_{2α}注射から排卵までの間隔

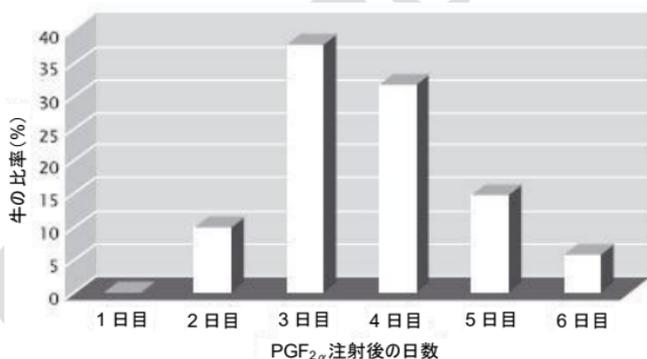


図4 PGF_{2α}処置牛の発情発現日の分布

発情を確認した後の人工授精は最高の受胎率をもたらし、これは特に成乳牛において推奨される。未経産牛はより同調的な反応を見せ、72~96時間目の定時授精法は、正常発情周期を示す肉牛および乳用未経産牛に

用いることができる。PGF_{2α}は黄体に作用するため、正常発情周期を示す牛に対してのみ効果がある。

PGF_{2α}は、農場スタッフの意図、品種、および農場の状態次第で、いくつかの方法で発情コントロールに用いることができる。Cavalieri et al.(2006)による概説は、最も頻繁に使用されるシステムの要点を述べている(図5)。

Confidential

2 牛の繁殖

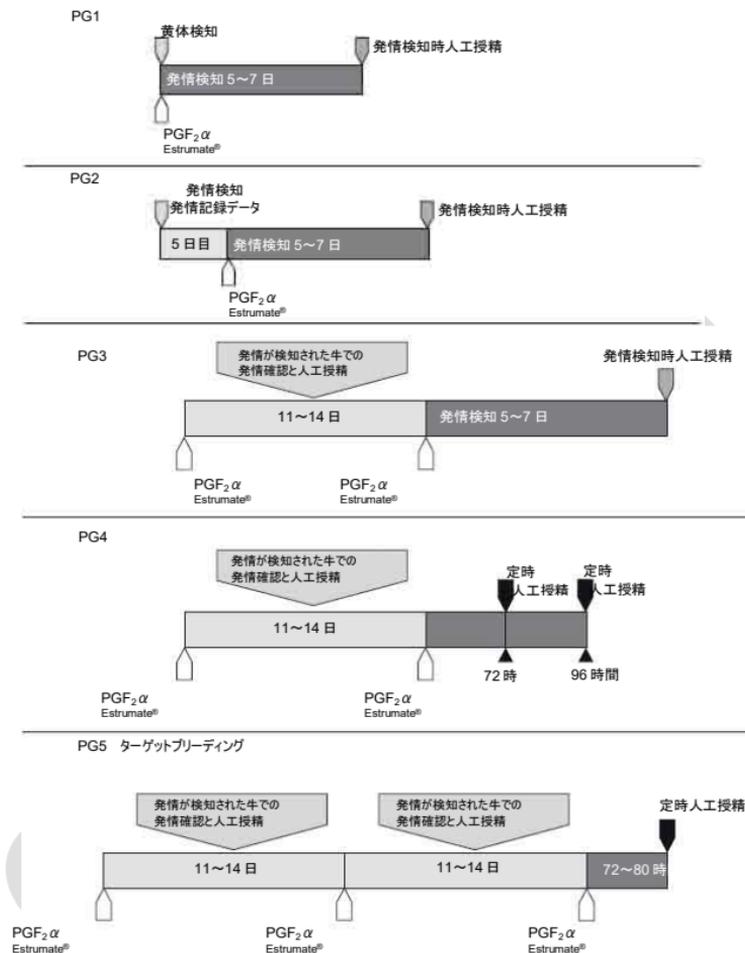


図5 PGF₂αによる発情管理の各種システム

複数回投与方法(図5のPG3とPG4)は、通常、牛群全体に対して発情を同期化させるために計画されるもので、ほとんどの牛において処置後7日以内の発情発現が期待される。処置費用削減を目的として単回投与方法(図5のPG1とPG2)も開発されたが、これらは複数回投与方法と比較して、大幅に

融通性が低下する。単回投与システムは、処置後に黄体退行が起こる可能性が最も高い牛へのPGF_{2α}の戦略的な投与に頼る方法で、さらに処置への高い反応率を確実に得るために、より長期間にわたる発情発見および/または黄体の検知を要する。

いわゆるターゲットブリーディングプログラム(図5のPG5)は、大規模な乳牛群での繁殖効率を改善するために開発された(Nebel and Jobst 1998)。このシステムでは、牛への処置を統一的に週の日に行い、平日における処置と人工授精を容易にする。牛は14日おきの間隔でPGF_{2α}注射を受け、発情観察に基づいて人工授精される

3回目のPGF_{2α}処置後に発情が発見されなかった牛については、最後のPGF_{2α}注射の72~80時間後の定時に人工授精される。

連続的なPGF_{2α}処置を用いるこれらのプログラムは、分娩後の子宮感染症罹患率が高い牛群において有益であることが確認された。PGF_{2α}は子宮収縮を促進し、子宮内膜の免疫細胞に好影響を与えると仮定されている。さらに、この方法によれば、連続する各黄体期が短縮されることにより、プロゲステロンによる免疫抑制作用が低下する。しかし一部の専門家は、これにより処置を受けた牛の将来的な受胎性にリスクが及ぶと異議を唱えている。分娩後の初回排卵直後に処置を開始し、中断せずに数周期継続した場合、処置牛には完全な黄体期を経験する機会がまったくない。これは、プロゲステロンへの限定的な曝露に起因する受胎性の低下につながる。

肉牛への応用。

肉牛では、分娩後の無発情が高頻度で起こることから、この分類に入る牛では、PGF_{2α}投与は発情管理に適した方法とは見なされていない。それにも拘わらず、この方法を用いる場合は、牛に正常発情周期が見られ、適切なボディコンディションであることを確保することが不可欠である。

PGF_{2α}およびGnRH類縁体

オブシンクという名称で知られているプログラム(図6)は、主に乳牛に用いられ、PGF_{2α}の単回投与に間に挟んだGnRH類縁体の注射を2回行う方法である(Pursley et al. 1995)。現場では、この同期化法があらゆる発情周期ステージにある牛で用いられる可能性があり、GnRHをPGF_{2α}と併用することにより、黄体退行の誘起時に卵胞の発育状態を斉一化の方向に導く。その結果、PGF_{2α}の誘起による黄体退行後の発情予測の精度とLHサージの同期性がいずれも改善され、卵胞発育と黄体退行両者の同期化が可能となる。

2 牛の繁殖

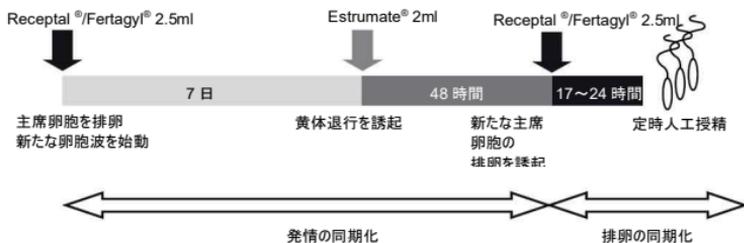


図6 オブシンク法のプロトコル

GnRHの初回投与は、発情周期の任意の段階で行われ、主席卵胞が存在する場合には、約85%の牛で、その排卵または黄体形成を引き起こす(Pursley et al. 1995)。PGF_{2α}の投与は、GnRHにより誘起された黄体(副黄体)もしくは黄体化卵胞の退行を引き起こし、また実際には、それ以前の自然排卵後に生じたいかなる黄体をも退行させる(図7)。現行の卵胞波の運命が変化した牛の卵巣には、2回目のGnRH処置時までには新たな主席卵胞が存在しているはずである。卵胞波周期の優勢相の前にGnRH投与を受けている牛では、卵胞波を変化させていないので、この場合もまた2回目のGnRH処置時には主席卵胞を有することが期待される。乳牛の排卵反応は厳密に同期化されて、2回目のGnRH注射の約26~32時間後に起こる。したがって、2回目のGnRH投与後17~24時間での定時授精では、受胎成功の確率が高くなるはずである(Peters et al. 1999)。

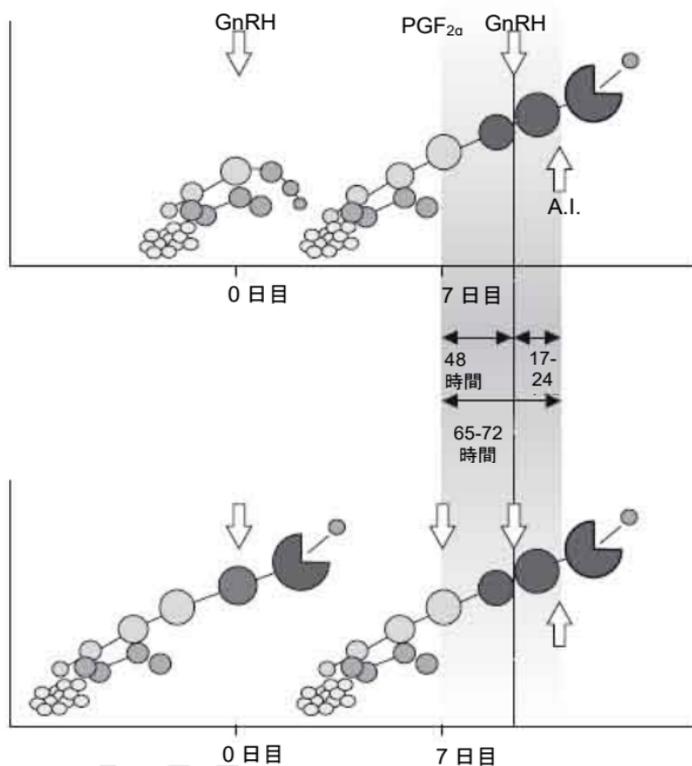


図7 オブシンク法による処置牛の卵胞の動態

オブシンクにより、分娩後の初回人工授精の正確なスケジュール設定が容易となると同時に、分娩後早期の繁殖成績が向上し、発情発見が不要となることにより労力が節約される。

Coleman et al.(1991)およびTwagiramungu et al.(1992)は、GnRHとPGF_{2α}により同期化された牛の受胎率は35～65%の範囲内で、初の発情観察時に人工授精された対照群と同様の水準にあることを報告している。

オブシンク法の有効性

発情と排卵を効果的に同期化するGnRH-PGF_{2α}による方法の効力は、初回GnRH注射時の卵胞発育のステージに依存する。オブシンク法による受胎性は、牛がGnRHの初回注射により排卵した場合に最も高率となる。

Vasconcelos et al.(1999)は、泌乳中の乳牛において、オブシンクを開始した発情周期日の影響と、それにより得られた受胎率を調査した(表8)。

表8 発情周期におけるオブシンク法開始日別の卵胞発育の誘起効果：
出典：Vasconcelos et al.(1999)

発情周期のステージ(日目)	初回GnRH注射 による排卵	2回目GnRH注射 による排卵
1-4	23%	94%
5-9	96%	89%
10-16	54%	85%
17-21	77%	81%
全体	64%	87%

その研究結果によれば、発情周期の1日目から12日目までの間にオブシンク法を開始した場合に受胎率は最高を示したと結論付けられている。オブシンク法の最も有望な開始時期を選定するために牛の発情周期を監視することは、ある意味、牛の発情周期のステージに拘わらず実施可能であるというこのシステムの概念に反する。

過去数年間に実施された複数の研究では、オブシンク法の使用により得られた受胎率と、PGF_{2α}(Pursley et al. 1997; de la Sota et al. 1998; Keister et al. 1999; Stevenson et al. 1999; Stevenson et al. 2000a; Cartmill 2001)、黄体ホルモン(Geary et al. 1998; Williams et al. 2002)、オブシンク法に変更を加えたさまざまな方法(Bartolome et al. 2002; Pancarci et al. 2002)、および自然交配(Cordoba and Fricke 2002)などの他の発情管理プログラムにより得られた受胎率と比較されている。

Rabiee et al.(2005)は、オブシンク法、自然交配、PGF_{2α}の単回、2回、または3回投与、セレクトシンク、ヒートシンク、およびオブシンクのバリエーションを使用した数多くの試験で報告された結果を統合し、より高い見地から分析(メタ分析)・比較した。彼等は、オブシンクプログラムでの受胎率と自然交配で得られた受胎率との間に有意差はないと結論付けた。さらに、オブシンク処

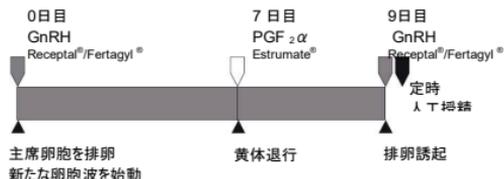
置牛群とPGF_{2α}処置牛群では、受胎と妊娠の可能性に有意差は認められなかった。オブシンク法、ヒートシンク法、およびセレクトシンク法による処置牛の受胎確率の比較でも、有意差はみられなかったとしている。

オブシンク法の変法(表8)

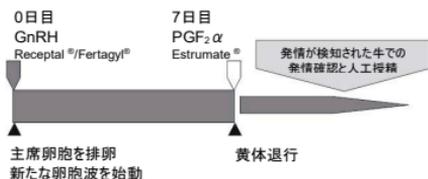
GnRH注射に対する排卵反応と、GnRHによる排卵誘起後の黄体機能は、ともにGnRH投与時の卵胞の大きさに依存する。プレシンクおよび古典的オブシンク法を改変した方法は、排卵がGnRHの初回注射により誘起される確率を増加させると同時に、PGF_{2α}とGnRHの投与後に黄体退行および同期化された排卵が起こる確率をも増加させると考えられている。

2 牛の繁殖

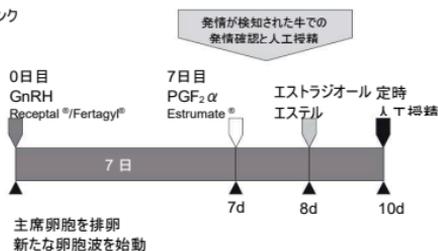
コシク



セレクトシク



ヒートシク



プレシク

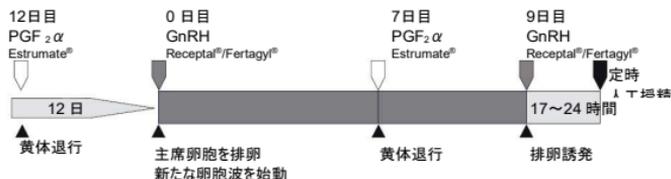


図8 オブシク法を改変した方法

出典: Cavalieri et al. (2006)

古典的なオブシンク法の改変法のうち最も簡易なもの1つは、いわゆるコシンク法であるが、この方法が古典的オブシンク法と異なる点は、2回目のGnRH注射と人工授精が同時に、すなわちPGF_{2α}による処置の48時間後に行われることである (Small et al. 2001)。

コシンク法を用いた大半の研究は、PGF_{2α}注射とGnRH+人工授精との間隔を48時間とすることを重点としていたが、処置後から発情までの間隔を、PGF_{2α}投与後60～64時間(オブシンクで用いられる間隔)とした方が、肉牛 (Geary et al. 2000; Stevenson et al., 2000b; DeJarnette et al. 2001a)および乳牛 (DeJarnette et al. 2001b)の授精の適切なタイミングに、より適合することが示されている。

これまでに報告されている結果は、オブシンクの使用により得られた結果と比較して同等か、わずかに低いのみで、牛をハンドリングする必要性は減少する (DeJarnette and Marshall 2003)。しかし、Olynk and Wolf (2009)による確率的解析では、リスク回避的な経営者はオブシンクを用いた繁殖に追加費用を費やしても、コシンクに伴う受胎率減少の潜在的リスクを回避したいと考えていることが示された。

最終的に古典的オブシンク法を実施する牛の卵巢動態をさらにもっと斉一にするため、さまざまなプレシンク法も提案されている (図9)。これは、最終のオブシンクを実施する大多数の牛が、確実に初回GnRH注射時にLH反応性の主席卵胞を有する最善の機会を提供する。

オブシンク法実施前のプレシンク法は、14日間隔でPGF注射を2回行い、2回目の注射をオブシンク法の初回GnRHの12日前に投与方法である。このプレシンクオブシンク法は、正常発情周期を見せる授乳中の牛において受胎率を18%(25%から43%に)引き上げたことが、Moreira et al.(2001)により報告されている。

プレシンク法による黄体退行作用に反応する能力を有するのは正常発情周期を見せる牛のみであるため、PGF_{2α}を用いたプレシンク法は、これらの牛のみで最終オブシンク後の授精の有効性を向上させ得ることを重視すべきである。

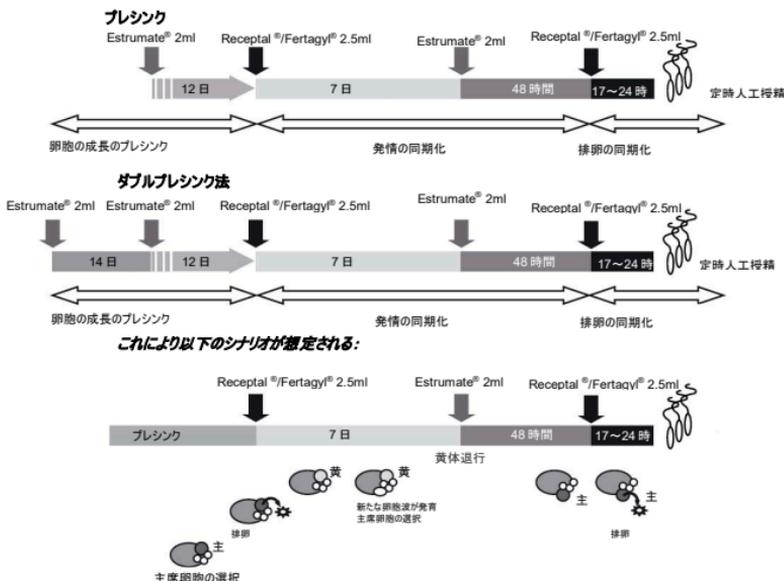


図9 PGF_{2α}によるプレシंक法を行った牛での卵胞動態

GnRHによる分娩後のプレシंकも、実際のオブシंक法の7日前から着手できる。この方法は、正常発情周期を示す牛と無発情期の牛の双方で潜在的に効果的であるという利点もあり(Thompson et al. 1999; Stevenson et al. 2006)、これは若雌牛でも有益であることが示されている(Stevenson et al. 2008)。

従来のオブシंकまたはコシंक法の前に実施するプレシंक処置としてのPGF_{2α}とGnRHの併用も試みられ、さまざまな成功が得られているが、多くの場合、最終的なオブシंक人工授精に対する受胎率にある程度の改善が認められている(DeJarnette and Marshall 2003)。

米国でより広範囲に使用されているヒートシंक法では、2回目のGnRH注射の代わりにエストラジオールエステルを用いる(Geary et al. 2000; Stevenson et al. 2004)。この方法の支持者は、エストラジオールが主席卵胞の排卵をより厳密に同期化し、処置牛において発情の行動的表現を増加させると指摘している。食用動物でのエストロゲン使用については懸念が

増しており、ヨーロッパでは使用される可能性がほぼないことから、このシステムの応用は地理的に限定されている。さらに、ヒートシンクの使用に関する研究の大半は米国が行っているものの、米国市場では、現時点で乳牛に使用が認可されているエストラジオール含有製品はないことが強調されるべきである。

hCG注射または強力なGnRHアゴニスト(作動薬)であるデスロレリンを含有するインプラントを、オブシンク法の2回目のGnRH注射の代わりに用いて排卵を誘起することも行われてきた。hCGの使用に伴う結果と受胎率は、GnRH後の人工授精によるものと同等であったが(De Rensis et al. 2002)、デスロレリンを用いる方法を実施した場合、視床下部の脱感作により(Padula et al. 2002; Padula and Macmillan 2005)排卵間隔が延長し(Bartolome et al. 2004)、さらに高用量のデスロレリン投与では受胎率は低下した(Santos et al. 2004)。

古典的オブシンク法実施時に、2回目のGnRH注射をhCGに替えて用いることは特に有望と思われる。排卵誘起と機能的黄体の形成を誘起するhCGの有効性について、複数の著者が言及している(Rajamehendran and Sianangama 1992; Schmitt et al. 1996a, 1996b)。従来のオブシンク法では、排卵の同期化と誘起のためにhCGが投与される(De Rensis et al. 2002)。

近年発表された予備データによると、この方法は、高泌乳牛および熱ストレスを受ける牛群では、GnRHのみによるオブシンクよりも明らかに有利であるという期待を抱かせるものである。De Rensis et al. (2008)は、晩春から夏にかけて、複数の泌乳牛群で古典的オブシンク法(GPG)とhCG-オブシンク法(GPH)を実施した。授精後3、6、9日目に、GPH群ではGPG群よりも高い平均血漿プロゲステロン濃度が認められた。この研究は、定時人工授精法で排卵を誘起するためにhCGを使用することは血漿プロゲステロン濃度を上昇させ、温暖な気候での乳牛の受胎率を向上させることを見出した。Schmitz et al. (2008)が第16回ICAR(国際家畜繁殖学会)会議で発表した研究要旨でも、乳牛において、従来のオブシンクプログラムの2回目のGnRH注射をhCGに替えることにより、同様の肯定的な効果が得られることが報告されている。

オブシンク型プログラムでのhCG注射により有益な結果が得られたのは主に、hCGによる黄体刺激作用とその作用の延長に起因すると考えられる。hCGによる排卵誘起は、より高いステロイド産生能力を有する黄体の形成につながる可能性のあることが、以前から主張されてきた(Schmitt et al. 1996a; Schmitt et al. 1996b)。さらに、羊や牛でのhCG処置は、大型黄体細胞数

の増加と、これと同時に生じる小型黄体細胞数の減少、これに伴う血漿プロゲステロン濃度の増加に結びついている。

オブシンク法とGnRH投与量

オブシンク型システムでの排卵を誘起するためのGnRH使用に関する最初の基礎研究は、強力なGnRH類縁体であるプセレリン 8 μ gを使用して実施された。その後、多くの研究でゴナドレリンが使用されたが、投与量は100 μ gに過ぎなかった。このGnRH投与量は米国では標準的だが、処置費用を削減できる可能性があるため、その他多くの国でもかなりの注目を集めている。

しかし、プセレリンはゴナドレリンと比較して40倍から200倍強力であると推定されていたため、このゴナドレリン投与量では、生物学的力価の相当な減少を意味した(Chenault et al. 1990)。それ以降、特に、牛に高い比率で排卵誘起することがシステムの同期化の精度と有効性を決定する要因となる複合的なオブシンク型同期化システムにおいて、排卵を誘起するための低ゴナドレリン用量の有効性を多くの著者が疑問視してきた。より少用量のゴナドレリン(25 μ gおよび100 μ g)は、黄体期の主席卵胞を排卵させる上で、効果が不十分であるか(100 μ g)、全く効果がない(25 μ g)ことが示された(Mihm et al. 1998)。Cartmill et al.(2001)の報告によると、オブシンク法で100 μ gのゴナドレリンを用いた場合、排卵の同期発生が認められたのは、正常発情周期を示す牛の68%のみであった。一方、Fricke et al.(1998)とVasconcelos et al.(1999)は、低用量および標準用量のゴナドレリンを使用した場合、排卵誘起について同等の結果を示した。

しかし、近年一部の研究では、低用量のゴナドレリンにより誘起された排卵は多くの場合、正常な黄体形成につながらないことを示している。この処置は、処置を受けた牛でその後の妊娠維持と受胎率に明らかな悪影響を有しているようである。Cordoba and Fricke (2002)とShephard (2002)は、50 μ gまたは100 μ gのゴナドレリン投与量を用いてオブシンク法の処置を受けた牛では、発情周期短縮の発生増加が認められ、黄体期の短縮と受胎の失敗を暗示している。この発情周期短縮は、発情周期を示す牛と無発情の牛両者に見られた。これは、黄体形成の異常が、低用量のGnRH注射による卵胞閉鎖、排卵、および黄体発育に対する不十分な効果に起因している可能性が最も高いことを示している。

Colazo et al.(2009)によるごく最近の研究では、ゴナドレリンの3段階の用量(50 μ g、100 μ g、および250 μ g)について、卵巣摘出牛のLH放出に与える影響について検討された。250 μ gのゴナドレリンを投与された牛の平均血漿LH濃度はGnRH投与量の影響を受け、50および100 μ gを投与された牛

よりも多量のLHが下垂体より放出された。また、250 μ gを投与された牛は、GnRHを50 μ g投与された牛と比較してLHサージが長時間持続した。

黄体ホルモン

Crestar[®]等の黄体ホルモン処置は、発情周期の黄体期を模倣する。正常な受胎性を伴う発情を得るために必要な処置期間は10～12日とされている。

現在の黄体ホルモンベースのシステムすべてに共通する特徴は、以下を目的とした、処置開始時のエストラジオール投与である：

- 黄体の寿命を短縮すること
- 現行の卵胞波を終結させ、新たな卵胞の発現を誘起すること

プロゲステロン/黄体ホルモン放出システムはすべて、処置を受けた牛の血液循環で実際の黄体期よりは下回るが、一定濃度のプロゲステロンレベルを作り出すので、黄体ホルモンとともに用いられるエストラジオールエステルのこの2つ目の機能は、特に重要である。これらの濃度レベルは負のフィードバック作用をもたらすのに十分で、排卵前のLHサージ、排卵、および発情を妨げる。しかし、LH放出を完全に遮断することはできず、微量のパルス状分泌は維持されるので、処置開始時に主席卵胞が卵巣に存在する場合はその遺残を許容することになる。卵胞の優性の持続が4日を超えた場合(主席卵胞遺残)、卵母細胞の能力減少と胚死滅の増加が原因となって、繁殖性が進行性に低下する(図10; Diskin et al. 2002)。

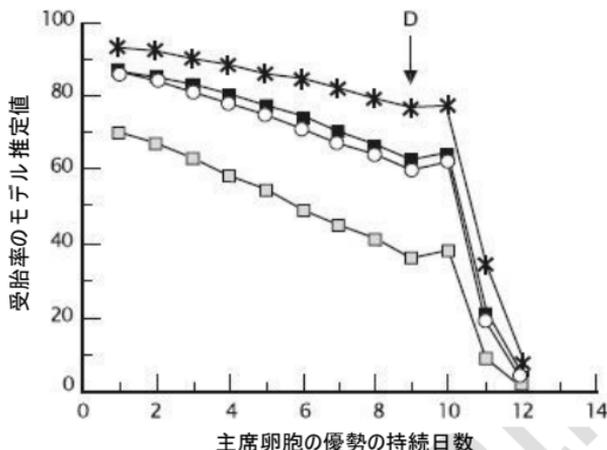


図10 排卵前卵胞の優性持続期間増加に伴う受胎率の推定 (Diskin et al., 2002)
 図中、4つの線は、主席卵胞の優勢持続期間が10日を超えると受胎率が急激に低下することを示す4パターンを示している(監訳者追加)。

外因性エストラジオールのプロゲステロンとの併用投与は、卵胞波の発現前または発現中に投与した場合は、主席卵胞の形成の抑制または直径の減少を引き起こす。これはFSH、そしておそらくLHの抑制によるものと考えられる。卵胞が選択された際、この処置により、次の卵胞波の発現時期を継続的に変化させることなく、主席卵胞の直径を減少させる(図11)。無発情無排卵に分類される牛に、6~8日間低用量の黄体ホルモンを投与した場合、機能的黄体の非存在下で発情周期を回帰する牛で見られるような遺残主席卵胞の形成を誘起することはほとんどない(McDougal et al. 2004)。Cerri et al. (2009)は、プロゲステロンを放出する腔内装置(CIDR[®])を高泌乳で発情周期を回帰するホルスタイン種の牛に処置すると、黄体期レベルを下回るプロゲステロン濃度を保持するのに対し、無発情の高泌乳牛への同処置では、初回人工授精の受胎率に影響することなく、発情周期の誘起を促すことを発見した。

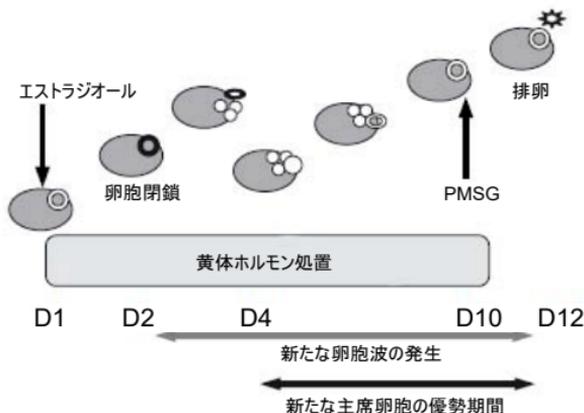


図11 プロゲステロンベースの発情同期化プログラム開始時に
エストラジオールを投与した牛の卵胞動態

プロゲステロン同期化処置開始時でのエストラジオールの使用は、プロゲステロンの処置期間が12日に延長された場合にも、プロゲステロンの抜去時またはその24時間後に、全個体で必ずしも黄体退行の完了を保証するものではない。従って、エストラジオールに反応しない個体では、黄体退行を確実にするために、プロゲステロンの抜去時または抜去前にPGF_{2α}を投与することが強く推奨される。

Crestar[®]等の黄体ホルモンを用いた処置の利点の1つは、無発情の牛において発情周期を開始させることができることである。発情周期を示さない牛では、黄体ホルモンは視床下部・下垂体・性腺軸を感作し、黄体が正常な寿命を維持することを可能にする。黄体ホルモンを除去した際のPMMSG投与により、卵胞の成熟と排卵はさらに刺激される(図11)。無発情の治療における、Crestar[®]その他黄体ホルモンベースの方法での成功率は、処置開始時点での分娩後日数、牛の体調、その他の潜在的な原因により変動する(50~70%)。それでも、Crestar[®]およびその他の黄体ホルモンベースのシステムは、繁殖シーズン初期における繁殖期間の短縮と最初の同期化した発情時での高受胎率が見込まれることから、肉牛の発情管理における選択肢と考えられている。またこれにより、初回発情時に人工授精したが未受胎で、再度人工授精を行う牛を迅速に把握でき、分娩期間の短縮化が可能となる。黄体ホルモン物質による処置後の発情と排卵は、PGF_{2α}注射後と比較して、より早期に、より正確な時期に起こる。Crestar[®]の場合は、単回の定時授精が推奨される(表9)。

2 牛の繁殖

表9 若雌牛と経産牛の各種生産システムにおけるCrestar®の使用、

家畜の種類	0日目	インプラント除去48時間前	9～10日目	人工授精
肉用若雌牛	Crestar®インプラントと注射	x	400-600IU PMSG (Folligon®)の注射 インプラント除去	インプラント除去48時間後
乳用若雌牛	Crestar®インプラントと注射	x	インプラント除去	インプラント除去48時間後
肉用経産牛	Crestar®インプラントと注射	x	500-700IU PMSG (Folligon®)の注射 インプラント除去	インプラント除去56時間後
乳用経産牛	Crestar®インプラントと注射	プロスタグランジンの注射 (Estrumate®)	300-400IU PMSG (Folligon®)の注射 インプラント除去	インプラント除去56時間後

最近の研究では、処置開始時にエストラジオールに替えてGnRHを投与するシステムが提案されている (Thompson et al. 1999; Stevenson et al. 2000a; Stevenson et al. 2000b; Garcia et al. 2004)。この変化は、ヨーロッパにおける食用動物へのエストラジオールエステル使用の禁止が明らかに関連している (Lane et al., 2008)。また、EU内の制限は、ヨーロッパ連合の枠を越え広範な影響を及ぼしている。例えば、EUはニュージーランドおよびオーストラリアの両国に対してエストラジオールエステル使用を禁止することを強制している。ニュージーランドでは、安息香酸エストラジオールの動物用医薬品としての使用は実質的にすべて禁止されており、オーストラリアでは泌乳牛に対して安息香酸エストラジオールを不使用とする自主協定が存在する。

GnRHは主席卵胞の排卵とその後の追加的な黄体の形成を誘起するため、GnRHと黄体ホルモンを併用するシステムでの作用機序は、エストラジオール/プロゲステロンベースのシステムとはわずかに異なる (図12) (Cavaliere et al. 2006)。

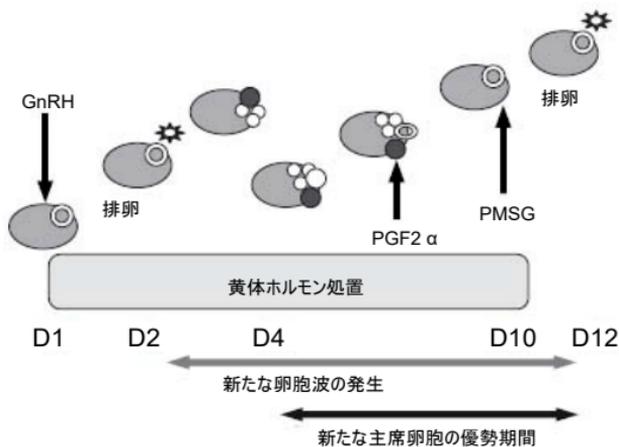


図12 黄体ホルモンベースの発情同期化プログラム開始時におけるGnRH処置牛の卵泡動態

このシステムを採用する場合、特定の考慮すべき重要点がいくつかある。

エストラジオールの代わりにGnRHを使用することにより、卵泡の成長を刺激すること(無排卵の牛では特に重要)や、追加的な黄体の形成など、プロゲステロン濃度を上昇させ、発情誘起時の受胎率に好影響を及ぼすといった追加的な利点が期待できる。GnRHの投与は、相当な比率で新たな黄体形成を誘起するが、黄体退行促進因子を含まないため(従来システムでのエストラジオール)、処置を受ける全個体にPGF_{2α}類縁体を投与する必要があり、できればプロゲステロン源を除去する48時間前に投与するのが理想的である(図13)。

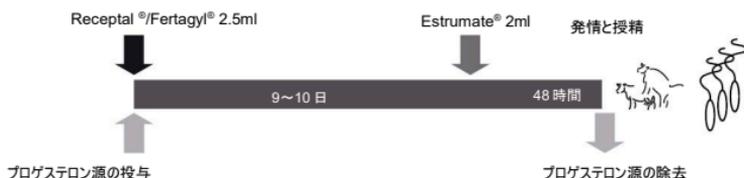


図13 処置開始時にGnRHを投与するプロゲステロンベースの発情同期化プログラムの例

この方法は、近年使用が増加している、完璧な古典的オブシーク法と黄体ホルモン/プロゲステロンの併用処置法にも応用されるようになってきている。こういったプログラムには、オブシーク法の初回GnRH注射時でのプロゲステロン放出装置の挿入(例:PRID® プロゲステロン放出腔内装置)が含まれる。その後装置を抜去し、PGF_{2α}を注射して、48時間後に2回目のGnRH投与を行う。このシステムは、乳牛群で古典的オブシーク法の有効性を増すことが示されているが(El-Zarkouny et al. 2004; Ambrose et al. 2005; Stevenson et al. 2006)、肉牛でも効果的であると考えられる。

卵胞波の発育中およびその後の排卵に至る卵胞の発育中にプロゲステロンを追加することは、卵母細胞の質に明らかに有益作用をもたらし、また無発情の牛の処置に使用した場合には、人工授精後の黄体期短縮の発生をも減少させることは疑う余地がない。Melendez et al.(2006)は、オブシークプログラムを行い外因性プロゲステロンを補給した牛は、オブシークプログラムを行いプロゲステロンの追加補給を行わなかった牛と比較して、人工授精後の受胎率とプロゲステロン濃度が上昇することを示した。

発情回帰する牛での発情の再同期化

適期に再授精する牛の頭数を増加させる目的で、過去に同期化され人工授精されたが発情回帰した牛を再同期化するためにさまざまな戦略が用いられてきた。これらの戦略には、プロゲステロン放出装置を用いることや、過去に授精した牛にオブシーク型プログラムを適用させることが含まれる。

再同期化の時期を検討する際の適切なシステムは通常以下のように分類できる:

1. ブラインド・リクルートメント

人工授精済みグループのうち、不受胎牛が確認される前に再同期化を開始する方式である。このシステムは人工授精済みの牛でのGnRH使用を主体とし、多くの国でいくつかのGnRH類縁体の適応として認可されている。GnRHは通常、人工授精後23~24日後に投与し、その7日後に超音波検査を行う(Chebel et al. 2003)。非妊娠が確認された牛にはPGF_{2α}を注射し、その後完全なオブシーク法を継続する。従って再授精は、前回の人工授精の約32日後に実施されることになる。後述のターゲット・リクルートメントと比較して、授精前の期間は大幅に短い、このシステムでは、すでに妊娠している牛の多くが不必要な処置を受けることとなる。

2. ターゲット・リクルートメント

人工授精済みグループの不受胎牛が確認された直後に再同期化が開始される方式である。このシステムは、超音波妊娠診断の早期使用（人工授精後27～28日目）または早期妊娠診断をベースにしている（2.2.3を参照）。不受胎牛はPGF_{2α}が注射され、次回発情確認時に人工授精するか、プレシンクされたオブシンクに参加させることができる（Bartolome et al. 2005a; Bartolome et al. 2005b; Bartolome et al. 2005c）。したがって、再授精は前回人工授精の約30～31日後（PGF_{2α}による発情誘起と発情確認時の人工授精）か、49日後（完全なプレシンクされたオブシンクを使用する場合）に可能である。

人工授精から不受胎牛の発見および再授精までの期間は、ブラインド・リクルートメントと比較して長くなるが、ターゲット・リクルートメントは不受胎個体のみ処置を行うことを意図しており、より経済的で、慎重な薬剤使用に関する推奨を遵守していると言える。

プロゲステロンとエストラジオールの併用は他にも各種使用されており、その結果もさまざまである（Galvao et al. 2007; Cavalieri et al. 2008）。さらに、人工授精後のエストラジオール使用による黄体機能への副作用の可能性については、さらに調査が必要と考えられる。

2 牛の繁殖

2.3.3 人工授精された牛の受胎性に影響する要因

乳牛では、泌乳牛と非泌乳牛での受精率の各平均値はそれぞれ、76.2%（範囲：55.3～87.8%）および78.1%（範囲：58.0～98.0%）と同等である（Santos et al. 2004）。肉牛での受精率は平均75.0%で、範囲は60～100%である。

Humblot(2001)は、不受胎の20～45%が受精障害と早期胚死滅に、8～17.5%は後期胚死滅/胎子損耗に、1～4%は晚期流産に起因することを示している。交配失宜、受精障害および胚・胎子損耗に加えて、2つの不受胎の原因が存在する。

これは、人工授精後の損失に寄与する要因が以下のように分類できることを意味する。

1. 受精障害の要因：

- a. 卵胞成長阻害と粗悪な卵母細胞をもたらす好ましくない内分泌環境
 - 暑熱ストレス
 - 負のエネルギーバランス
 - BVDVまたはIBRVによる感染
- b. 排卵の遅延および/または障害
 - 暑熱ストレス
 - 負のエネルギーバランス
- c. 精子の質に影響する要因
 - 精子形成に影響する要因：BVDV、IBRV、ブルセラ菌類による感染、暑熱ストレス、発熱
 - 精子が雌の生殖器に注入される以前の生存性に影響する要因：精液保存技術、精液の保管維持管理

2. 早期胚発育、妊娠認識、および着床に影響する要因

- a. 早期黄体機能の障害
 - 乳牛での高代謝率
 - BVDVまたはIBRVによる感染
 - 初回の発情休止期後のプロゲステロン刺激不足
 - 早期に黄体退行を引き起こす黄体に有害な要因：乳房炎に関連するマイコトキシン、細菌毒素
- b. 子宮内膜の機能障害と好ましくない子宮環境
 - 血漿中尿素態窒素の濃度上昇
 - 潜在性子宮内膜炎

3. 後期胚/胎子死亡を引き起こす要因

- a. 胎子に直接悪影響を及ぼすか、胎盤機能を損なう感染因子
 - ウイルス感染: BVDV、IBRV、
 - 細菌感染: プルセラ菌類、クラミジア菌類、
 - 原虫感染症: ネオスポラ・カニナム、トリコモナス類
- b. 胎子に直接悪影響を及ぼすか、胎盤機能を損なう非感染因子
 - マイコトキシン、
 - 特定の物質: PVP(ポリビニルピロリドン)、鉛等

2.3.3.1 排卵遅延

発情持続時間のばらつきと発情発見にまつわる問題は、適期を外した人工授精、それに起因する受胎率の低下につながる。一方、高泌乳牛では、排卵遅延と卵胞閉鎖はいずれも不受胎の原因となり得る。春季に観察されるいわゆる「無症状」の受胎障害は、高い割合でこれらの因子に起因する。

排卵は発情の発現から約30時間後、すなわち発情行動の終了後に起こる。しかし、エストラジオール値の最高時(最大発情徴候)との関連で実際の排卵時間は、様々な因子の影響を受ける。他で述べた通り、代謝の欠陥および過剰な代謝率による黄体機能の障害、または高い環境温度(暑熱ストレス)は、排卵遅延の原因となる場合がある。発情後の排卵遅延は、牛の受精が成功する機会を最小限に抑える。

凍結・融解された精子は比較的に生存時間が短いため、人工授精の成功は排卵時期に対して人工授精が適期に行われるか否かに大きく依存することになる。卵母細胞の受精率は、排卵後8~12時間で有意に低下し、排卵より25~40時間前の授精は、受胎率の大幅な減少の原因となる。

また、卵胞の優勢の長期化は、卵母細胞の受精能の障害と胚損耗の増加と関連する(Diskin et al. 2002)。Bloch et al. (2006)が最近発表した研究では、発情から排卵までの間隔が異なる牛の内分泌プロファイルが調査されている。その結果、排卵前のエストラジオール濃度減少と小規模で遅発性の排卵前LHサージとの関連性が示される一方、発情から排卵までの間隔延長との関連性も指摘された(図14)。

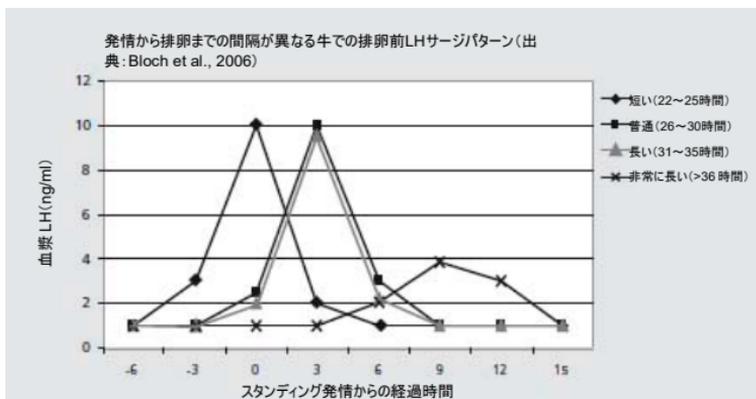


図14 発情から排卵までの間隔が異なる牛での血漿中排卵前LHサージの濃度(出典: Bloch et al. 2006)

さらに、この研究では発情から排卵までの間隔が長い、または非常に長い牛の黄体中期のプロゲステロン濃度が、短い間隔または普通の間隔の牛と比較して低いことが認められた。これにより、早期プロゲステロンパターンの不良による早期胚死滅に、排卵遅延と発情から排卵までの間隔延長が寄与している可能性について、重要な手がかりが得られている。

2.3.3.2 子宮環境の不良

乳牛群の受胎率を制限するその他の要因として、エネルギー供給不足の状態にありながら粗タンパク質を多量に与えられる牛での、尿素と窒素の濃度蓄積による毒性がある。アミノ酸の分解に伴い、アンモニアと尿素的濃度はともに上昇する。これは子宮内膜のpHの好ましくない変化につながり、着床が障害されると考えられている。さらに、血流と子宮内膜液の窒素および尿素濃度上昇は、胚の生存能力とその後の発育能力に影響し得るとの報告もある。子宮環境の最も顕著な変化は黄体中期に生じるが、この時期は早期の胚発育にとって、最終的に胚の長期的生存を決定する重要な期間である。Rhoads et al. (2006)による最近の研究では、泌乳牛での高い血漿中尿素態窒素濃度は、卵母細胞や授精後7日目の子宮から回収される以前の胚に作用することにより、胚の生存能力を減弱させることが明らかにされている。

潜在性子宮内膜炎と持続的な炎症プロセスに起因する子宮内膜の不可逆的な形態変化が、胚の着床にどう影響するかに関しては、得られる情報

が限られている。しかし、雌馬での入手可能なデータは、このような変化が妊娠の認識に悪影響を及ぼし、着床プロセスを損なう可能性があり、これにより早期胚死滅が生じることを明らかに示している。さらに Hill and Gilbert (2008)は、炎症を起こした子宮内膜と接触させることにより調整した培地で培養した牛の胚は、その品質が低下することを明らかにした。これは、潜在性子宮内膜炎に罹患した牛の早期胚死滅の機序が、胚質の変化であることを示していると考えられる。

2.3.3.3 妊娠の認識および維持における早期黄体機能の重要性

妊娠初期のプロゲステロン濃度が、人工授精の成功に顕著な影響を与えることは、長年にわたり立証されている。

Robinson et al. (2008)の最近の調査によると、機能的黄体形成と排卵後のプロゲステロン濃度増加は、発育する胚にとって非常に重要であることがわかっている。末梢血中プロゲステロン濃度は排卵後4日目ごろから上昇し始め、8～10日目までに最大値に達する。このエストラジオール濃度の急激な減少とそれに続くプロゲステロンの上昇が、胚の生存と発育をサポートする卵管および子宮内膜の機能の両者のタイムリーな制御を確実にしている。排卵後4～10日目、プロゲステロン受容体量は、子宮内膜腺と子宮内膜上皮組織の双方において最大値に達する。子宮内膜腺は、アミノ酸、ブドウ糖、輸送蛋白質、および成長因子からなる組織栄養素 histotroph と呼ばれる複合体を合成し、分泌し、さらに、その分泌液はそれらを運搬する機能を持っている。組織栄養素は、着床前期の発育中の胚盤胞に必要な不可欠な栄養素と調節分子の供給源である。

妊娠維持に失敗した牛では、乳中 (Lamming et al. 1989; Mann et al. 1995) および血漿中 (Mann et al. 1995, 1996; Butler et al. 1996; Mann et al. 2001) のプロゲステロン濃度が低値であることが、多くの研究で明らかになっている。(図 15)。

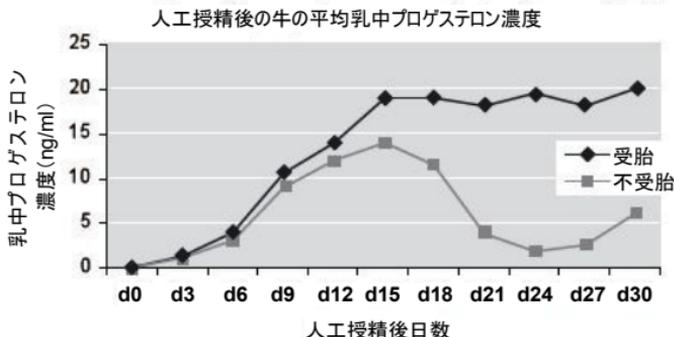


図15 後に受胎または不受胎が確認された牛の人工授精後のプロゲステロンプロファイル (出典: Mann et al. 1999)

プロゲステロンが高濃度の牛の胚は、排卵後5日目の早期から発育の進行が認められた (Green et al. 2005)。

乳牛では、繁殖性と泌乳量が反比例することが、十分に立証されている。Lopez et al. (2005) は、高泌乳牛のプロゲステロン循環濃度が低泌乳牛と比較して低いことを示した。これは、高泌乳牛の代謝率はより高く、それに伴いプロゲステロン異化作用もより急速に進むことと関連すると考えられている (Wiltbank et al. 2006)。

牛での妊娠認識および維持に関するいくつかの研究では、胚の十分な発育能力が継続的な黄体機能発揮の前提条件であり、これら2つの因子群が密接に関連していることが示されている。Mann et al. (2001) の研究では、胚の発育の度合いと母体のプロゲステロン環境が密接に関連していることが実証されている。同研究では、排卵後のプロゲステロン濃度上昇が1日でも遅れた場合、その後の胚発育が有意に減少することが示された。

発育中の胚に対するプロゲステロンによるサポート不足が、反芻動物での母体の妊娠を認識するための、胚のシグナルとして広く認識されているインターフェロン- τ (IFN- τ) を合成・分泌する能力に影響し得ることは明らかである (Mann et al. 1998)。

胚盤胞の伸張はIFN- τ の産生を惹起する。IFN- τ は排卵後12~25日目の子宮洗浄液で検知可能である。初回人工授精後16日目に胚発育不良が見られ、IFN- τ 産生が少量または皆無だった牛は、排卵後のプロゲステロン濃度の増加の遅延を呈し、また発育が良好な胚を有する牛に比べ黄体期のプラトー値が低いことが示された。

2.3.3.4 牛の繁殖効率に対する高気温の影響

暑熱ストレスは、晩夏に人工授精した乳牛の低繁殖性の主な要因と考えられている。暑熱期での受胎率は、冬季と比較して20～30%の間で変動する(Wolfenson et al. 2000; De Rensis and Scaramuzzi 2003)。

乳生産性が高レベルになると牛の代謝率と代謝熱産生を増加させるので、近年の泌乳量の相当な増加は夏期の不妊症候群をさらに悪化させている。泌乳牛が安定した体温を維持することができる気温の上限(上臨界温)は高くても25～27℃である。つまり、熱ストレスは熱帯のみに限定される問題ではなく、酪農業界全体に多大なコストを課している。

秋季にも、夏の暑熱ストレスの持ち越し効果が、繁殖性に影響することが証明されている(Wolfenson et al. 1997; Wolfenson et al. 2002)。繁殖へのこの負の影響は、秋季最初の1～2ヶ月間、牛がもはや暑熱ストレスに曝露されていないにも拘わらず持続する(図16)。これは、40～50日後に主席卵胞へと発育する胞状卵胞に、暑熱ストレスが作用することによるものと考えられている(Roth et al. 2000; Roth et al. 2001a; Wolfenson et al. 2002)。

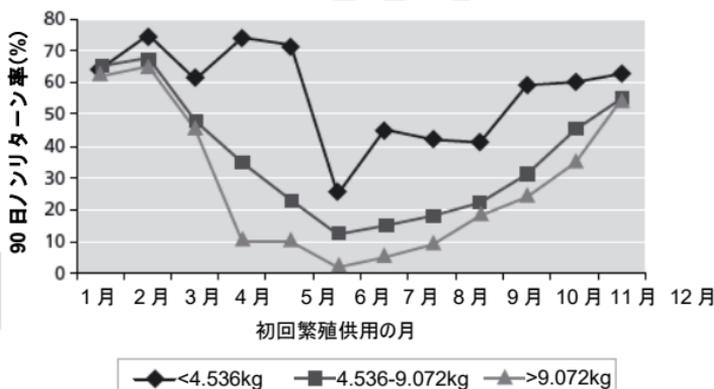


図16 サウスジョージア州およびフロリダ州のホルスタイン種牛における泌乳量別90日ノンリターン率の季節的变化(出典: Wolfenson et al. 1997)

暑熱ストレスが牛の繁殖機能にもたらす負の影響メカニズム

高気温が乳牛の繁殖プロセスにおよぼす悪影響については多くの記述があり、以下を含んでいる:

- 繁殖行動パターンへの負の影響
- 内分泌相互作用の障害
- 卵胞発育パターンの変化
- 卵母細胞と胚の質低下
- 栄養状態とエネルギーバランスへの負の影響

繁殖行動パターンへの暑熱ストレスの影響

暑熱ストレスの影響下では、発情期間の短縮とその強度は、自発運動及び乗駕のような他の発情徴候の明らかな減少とともに低下する。Nobel et al (1997)は、ホルスタイン種の乗駕回数が冬季は8.6回であるのに対し、夏季は発情1回当たり4.5回であることを明らかにした。

このように、鈍性発情および無発情の頻度上昇は、高気温に曝露された牛において最も一般的な所見のひとつである。

内分泌環境と卵胞発育パターンへの暑熱ストレスの影響

暑熱ストレスが視床下部-下垂体-卵巣軸機能にどのような影響を及ぼすのかについての機序はまだ完全に解明されていない。高気温に曝露された牛では、下垂体からのFSHの分泌障害を示す所見は見当たらない。これに対し、暑熱ストレスを被っている牛では、LHパルス放出の頻度と振幅はともに明らかに減少する。したがって、高温環境下では、エストラジオールの分泌減少をもたらすLHが乏しい環境下で主席卵胞が発育すると考えられる。そしてこれが、発情徴候の発現不良と繁殖性低下につながる (De Rensis and Scaramuzzi 2003)。また、LHパルス(頻度と振幅)の減少は、卵胞の優勢の長期化、排卵の遅延、および遺残主席卵胞の形成につながり、これらは卵母細胞の質の顕著な低下と受胎率低下の原因となる (Diskin et al., 2002; Bridges et al. 2005)。卵胞のステロイド産生能力の変化は、発育の最終段階まで持続し、内卵胞膜細胞のアンドロステンジオン産生の減少と主席卵胞由来の卵胞液のエストラジオール濃度の低下につながる。

エストラジオール産生量の低い大卵胞がより多く発育することにより、2個排卵と双子分娩の発生率も増加すると考えられる (Wolfenson et al. 2000)。

牛の循環血中プロゲステロン濃度の低下は、繁殖機能の障害および受胎率の低下と関連付けられてきた (Butler et al. 1996; Lamming et al. 1989; Mann et al. 1995; Mann et al. 2001)。黄体からのプロゲステロン分泌量の

不足が、暑熱ストレスに曝露された牛の繁殖性低下の原因となり得るか否かについては、活発に議論されている。Wolfenson et al. (2002)は、最近発表した研究において、冷涼期および暑熱期に全身循環でのプロゲステロン濃度を分析するだけでなく、それらの牛から採取した内卵胞膜細胞および顆粒膜細胞のプロゲステロン産生を *in vitro* で分析した。同研究により、夏季の慢性的な暑熱ストレスの状態では、特に黄体化された内卵胞膜細胞においてプロゲステロン産生が顕著に減少することを示した。さらに、牛の夏季の血漿プロゲステロン濃度が冬季と比較して25%減少することを示した。同著者らは、暑熱ストレスに誘発された卵胞機能障害は、その後の黄体に持ち越されると主張している。最近発表された研究で Kornmatitsuk et al. (2008)は、暑熱期での異常な黄体活動の発生率増加を認めた。そのうち最も頻繁に報告されたのは、黄体活動の遅延と無排卵であった。

胚の質と発育に及ぼす暑熱ストレスの影響

配偶子の形成と初期胚の発育は、非常に温度感受性が高いことが示されている。

暑熱ストレスは、陰囊と精巣が異常な高温に曝される状態を引き起こし、この状態は精子の形態的・機能的な質の低下につながる場合がある。Hansen (1997)は、夏季の暑熱ストレスに起因した雄牛の繁殖力低下を報告している。ゼブー牛 (*Bos Indicus*) の精子に対する暑熱ストレスの影響は、ヨーロッパ品種の雄牛の精子に対するものよりも軽度で、この現象はゼブー牛で観察される、一般的により効率的な熱調節だけでなく、精巣に流入する血液の局所冷却を高める特殊な適応性とも関連している (Brito et al. 2004)。

暑熱ストレスによる排卵遅延と卵胞遺残は、老化した低品質な卵母細胞の排卵につながる可能性があり、これは低受精率および高い胚死亡率に関連している (Sartori et al. 2002b; Al-Katanani et al. 2002; Roth et al. 2001b)。Aroyo et al. (2007)は、暑熱期に採取した牛卵母細胞において、化学的活性化による2細胞期胚、4細胞期胚への卵割が、冷涼期に採取した卵母細胞の卵割と比較して遅延することを実証した。第1卵割のタイミングは、その後の胚の発育能力に重大かつ長期的な影響を与えると考えられているので、これが高温環境に曝露した牛の胚の発育能力が低い原因と考えられる。

高温は着床前胚に負的作用をもたらすが (Ealy et al., 1993; Ryan et al. 1993)、高温に対する胚の抵抗力は発育に伴い増大する (Ealy et al. 1993; Hansen et al. 2001; Sartori et al. 2002a)。

Garcia-Ispuerto et al.(2006)は最近の研究で、暑熱ストレスは着床周辺期での妊娠の成功を妨げ、妊娠21～30日目の温湿度指数の上昇は早期胎子死滅のリスク要因と考えられることを示した。

高温がゼブ牛(*bos indicus*)とヨーロッパ系牛(*bos taurus*)の卵母細胞および胚の発育能力および品質に与える影響の程度が顕著に異なることが注目されている。*bos indicus*種から採取した胚は、暑熱ストレスへの抵抗力がより高いことが、Paula-Lopes et al.(2003)およびHernandez-Geron et al.(2004)により実証され、Hansen(2004)により取りまとめられている。

暑熱ストレスは、子宮への血流の減少と子宮温度の増加により子宮環境を損ない、これは着床障害と胚死滅の原因となり得る。これらの影響は、ストレスが多い時期に子宮内膜が産生するヒートショックプロテインと、受胎産物由来のインターフェロン- τ (IFN- τ)の産生減少に関連するものと考えられている。また、暑熱ストレスは子宮内膜のPGF_{2 α} 分泌に影響し、早期黄体退行および胚死滅につながる。またMalayer and Hansen(1990)は、ブラーマン牛とホルスタイン牛では、高温で培養された子宮内膜の反応が明らかに異なることを明らかにした。

しかし、*bos indicus*種は高気温の影響に対する抵抗力が、*bos taurus*種と比較して高いものの、これには限度があることを認識すべきである。de S Torres-Junior et al.(2008)は最近の研究において、*bos indicus*種を暑熱ストレスに長期間曝露した場合、卵胞動態と卵母細胞の能力に、遅延型の有害作用が及ぶことを示している。

栄養状態とエネルギーバランスに対する負の効果

暑熱ストレスが繁殖に及ぼす負の効果は、繁殖機能と胚発育の両者に対する直接作用だけでなく、エネルギーバランスの変化を介した間接的影響によっても生じることは明らかである。暑熱ストレスを受けた乳牛では、乾物摂取量の減少が観察されることが多く、これは負のエネルギーバランスの期間を延長し、血漿中のインシュリン、IGF-1およびブドウ糖濃度に負の効果及ぼす(Jonsson et al. 1997; Ronchi et al. 2001)。こういった状態は卵胞の発育不良、発情の発現低下、および卵母細胞の質の低下につながる。

さらに、Kornmatitsuk et al.(2008)の最近の研究では、分娩後5週間目の牛で暑熱期のボディコンディションスコアの平均値の減少が記録され、これは暑熱ストレスを受けた個体の飼料摂取量の減少と明らかに関連していた。同じ実験において、暑熱期において、牛の異常な黄体活動の頻度が増加す

ることが観察され、卵巢機能の非定型的特徴として黄体周期の遅延と無排卵が最も多く見られた。

2.3.4. 人工授精時および人工授精後の受胎率改善

泌乳牛の繁殖成績改善に取り組むためには、繁殖と泌乳を制御する生化学的および生理学的原則を理解する必要がある。そして牛群の繁殖性を最適化するために、その理解を栄養、生産および繁殖管理システムと統合しなければならない。

これまで、人工授精牛の繁殖性改善を目的とする薬剤療法の取り組みは、次の3つの分野に集中してきた。

- 排卵のタイムリーな誘起
- 全身循環プロゲステロン濃度増加による早期胚死滅の予防、あるいは早期黄体退行の予防(早期胚死滅についての章を参照)
- 繁殖に対する暑熱ストレスの影響の最小化

排卵遅延の予防—繁殖供用との関連でタイムリーな排卵を確実にするため

十分な受胎率を得るための方法の一つは、排卵を人工授精後7~18時間以内に起こさせることを保証することである。可能な方法の一つとして、繁殖供用時前後のGnRH投与がある。主席卵胞の大きさと成熟度にもよるが、通常GnRH注射後24時間以内に排卵前LHサージと排卵が起こる。これは、発情開始と排卵との間隔と同様である(図17)。

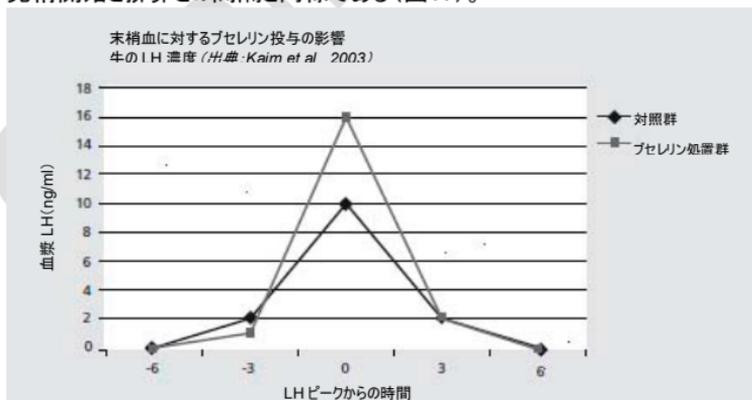


図17 牛の末梢血中LH濃度及ばずGnRH(ペセリン、Receptal®)投与の影響 (出典: Kaim et al. 2003)

人工授精時のGnRH類縁体の投与は、排卵前卵胞の機能または特性、および発育中の黄体の分泌能力を修飾する可能性があると考えられている (Mee et al., 1993)。さらに同研究は、GnRHが、排卵前または排卵後の卵胞または発育中の黄体において、内卵胞膜ルテイン(カロテノイドの一種)または顆粒膜ルテインの分化を促進または変化させるように働くとともに、GnRHは発育中の黄体に作用し、プロゲステロン分泌を増加させるために小型黄体細胞を大型黄体細胞に変換するようにも機能する可能性を示している。

GnRH処置のタイミング

精子と卵母細胞の生存時間だけではなく、内因性LHのサージ状放出、発情の持続時間と排卵の時間的關係を考慮すると、GnRHは人工授精時またはその6時間前に投与するのが最適である (Rosenberg et al. 1991)。発情の早い段階でのGnRH注射後、5～10時間以内に人工授精を行うことが、排卵の時期と受胎率向上双方の観点から、最良な結果をもたらすことが、多数の試験により示されている。しかし実際は、GnRHはたいいてい人工授精と同時に投与され、非常に良好な結果をもたらしている。

処置の結果

Rosenberg et al. (1991) は、発情時のGnRH注射 (10 μ g Receptal[®], Intervet; /250mcg Fertagyl[®], Intervet) の血漿LH濃度および受胎への影響を、この処置と人工授精のタイミングとの関連で評価した。分娩後の初回人工授精で受胎率が低かった群では、GnRH処置により人工授精の結果が改善された。これにより、GnRH処置が排卵時期のバラツキを少なくし、あるいは排卵障害を予防し得ることが示唆された。それ以前の複数の研究では、リピーターに対する人工授精時のGnRH処置により、受胎率が改善することが実証されている (Lee et al. 1983; Phatak et al. 1986; Stevenson et al. 1988; Stevenson et al. 1989; Khariche and Srivastava 2007)。

Morgan and Lean (1993) は、牛の受胎率に対し人工授精時のGnRH処置が及ぼし得る影響について詳細な分析を発表している。その論文では、GnRHまたはGnRH類縁体を人工授精時に使用した過去の多数の研究結果が比較され、メタ分析が行われた。

分娩後の初回授精時、および分娩後の2回目の繁殖供用時にGnRH類縁体による処置を受けた牛、そして人工授精時に処置を受けたリピーターでは、受胎可能性が有意に増加した。リピーターは他の群と比較して処置への反応が良好であった。これは、一部のリピーターは、発情時の

GnRH、LHまたはFSHサージのタイミングあるいはその大きさが原因で、受胎することができないという仮説を裏付けるものである。

Heuwieser et al.(1994)は、2,437頭の乳牛を対象とする大規模な研究で、GnRH投与、ボディコンディションスコアおよび繁殖性の関係を分析した。分娩後の初回人工授精においてボディコンディションスコアが3.0未満の牛にGnRHを投与した場合、産次数に拘わらず、受胎率が改善された

Ullah et al.(1996)は、暑熱ストレスに曝露したホルスタイン種泌乳牛へのGnRH投与の影響を評価し、発情時にGnRH処置を行った場合、無処置群と比較して繁殖結果が改善することを明らかにしている。Kaim et al.(2003)が報告した研究では、プセレリン(Receptal[®])の投与により、GnRHの使用は発情開始後早めあるいは遅めに人工授精した牛の受胎率の差を解消し、分娩後に繁殖障害に罹患した牛の人工授精の効率を向上させることが示された。また、同著者らは、発情開始時のGnRH投与はLHサージを増加させ、排卵遅延を予防し、また、その後のプロゲステロン濃度を増加させる可能性があると推論している。同研究でのプセレリン処置は、夏季の初産牛、およびボディコンディションスコアが低い牛での受胎率を増加させた。

黄体機能の支援と早発する黄体退行の予防

高泌乳牛、特に暑熱ストレスに曝露した牛や胚移植におけるレシピエントでの早期胚死滅を予防する試みが幾度となくなされている。

黄体期の血漿プロゲステロン濃度を増加させ、受胎率を増加させるいくつかの方法が試みられている。これは人工授精後、平均して4～6日後にhCG投与して副黄体の形成を誘起することで達成できる(Binelli et al. 2001)。この処置は、副黄体を誘起する以外に、主席卵胞の排卵に続いて形成される真黄体をさらに支援するLHの分泌を起こすと信じられている。

Santos et al.(2001)は、人工授精後5日目の高泌乳牛にhCGを投与する処置は、特に人工授精後1ヶ月以内にボディコンディションが低下し続けている牛において副黄体の形成を誘起し、血漿プロゲステロン濃度を増加させ、28、45および90日目に診断した結果、受胎率をも改善したことに注目した。同様に Breuel et al.(1989)、Sianangama and Rajamahendran (1992)および Rajamahendran and Sianangama (1992)も、人工授精後7日目のhCG投与による受胎率の有意な増加を報告した。Kaneda et al.(1981) および Kerbler et al.(1997) は、人工授精後、hCG1500 i.u.の投与により受胎率改善を達成した。

胚移植の低成功率の原因となっている早期胚死滅は、特に胚移植の処置費用が比較的高いことから、とりわけ注目を浴びている。

胚移植後の胚死滅に寄与する要因として以下が示唆されている。

- 形態的に不良な品質の胚の移植
- ドナー牛とレシピエント牛の間の不十分な発情期同期化
- 暑熱ストレス
- 潜在性子宮内膜炎
- レシピエント牛の栄養状態不良
- レシピエント牛の黄体形成不全

プロゲステロン、hCGおよびGnRHの投与は、黄体形成不全による移植胚の早期死滅の予防、および全般的な胚移植後の受胎率増加を目的として行われてきた。

発情周期の5日目には、主席卵胞の顆粒膜細胞はLH受容体を含むので、hCG投与は排卵と副黄体の形成を誘起することができる。そのため、人工授精後5日目のhCG投与は、妊娠初期のプロゲステロン分泌を増加する可能性がある。hCGが受胎率に肯定的な効果を及ぼす理由として、早期胚死滅の減少が関係している。さらに、hCG処置の有効性が観察されたのは、ほとんどの場合繁殖期にボディコンディションが低下し続けていた泌乳牛においてであった。高泌乳牛はプロゲステロンの代謝率がより高いので(Wiltbank et al. 2006)、hCG処置に対する反応がより高くなったためと考えられる。

hCGは、通常胚移植当日に、1500 i.u.の用量が投与される。このタイミングでのhCG投与は排卵の結果生じる黄体の発育と機能を直接サポートするだけでなく、その後の卵胞発育のための第1次卵胞波での受容可能卵胞の排卵と黄体形成を誘起することが示された。これにより、副黄体の誘発形成、プロゲステロン濃度の増加、およびエストラジオール濃度の減少が生じる。Small et al. 2001)は、肉牛において胚移植のレシピエントと人工授精牛での、発情周期7日目のhCG(Chorulon[®]、Intervet、2500 i.u./頭)投与の影響を調査した。その結果、胚移植時にhCG処置を実施した場合あるいは人工授精後7日目に処置を実施した場合、双子に授乳している牛と初産若雌牛において、定時人工授精による受胎率が上昇することを確認した。同著者らは人工授精後7日目のhCG処置は、代謝的なストレスを受けた牛および初産若雌牛での受胎率改善を達成するために活用できると主張している。

Nishigai et al.(2002)は、胚移植のレシピエント牛の発情後6日目にhCGを投与した。試験結果は、発情後6日目のhCG(1500 i.u./頭)投与は、黄

体機能を促進し、エストラジオール分泌を抑制することにより、発情後7日目に凍結融解胚を非外科的に移植した牛の受胎率を改善することを示した。Chagas e Silva et al.(2008)が最近報告した研究では、非常に特殊な設定(切断二分離胚の移植)下で、胚移植当日の高泌乳牛へのhCG投与による影響を評価した。1500iu hCGの処置により、生存能力が低い胚(半切胚)の生存率向上と、副黄体の形成に由来するプロゲステロン濃度の増加が達成された。

胚移植当日にGnRHまたはhCGを投与することの根拠は両薬剤に関して同一であるが、GnRH処置したレシピエントにおいて、受胎率改善の観点から肯定的な結果を示す研究報告はほとんど見当たらない。Ellington et al.(1991)は、胚移植時および移植後4～7日の間におけるブセレリン投与の効果进行调查したが、無処置の対照群と比較して受胎率の有意な改善は認められなかった。

早発性の黄体退行の予防

発情周期中盤(通常、人工授精後11～14日目)のGnRH処置が胚生存率および受胎率に及ぼす効果を分析する研究が、近年数多く実施されている。GnRH処置は、母体が妊娠を認識しない場合に起こる黄体退行メカニズムを抑制することにより、胚の生存性を向上させることを目的としている。卵胞の発育ステージ次第で、黄体期でのGnRH類縁体による処置は、前周期の主席卵胞の排卵後に発育し続けている既存の応答性黄体期卵胞の黄体形成または排卵を引き起こす。したがって、プロゲステロン分泌が増加するだけでなく、卵胞のターンオーバー(再始動)がエストラジオール産生を減少させることにより、エストラジオール濃度の減少も見られる。これにより、オキシトシン受容体の上方調節が無効になり、PGF_{2α}の分泌が遮断される。この説は、Matsui et al.(2008)の研究報告において実証された。同著者らは、人工授精後の第1卵胞波の主席卵胞によるエストラジオール分泌が受胎率に悪影響をもたらすことを示した。

Mann et al.(1995)は、GnRHは黄体退行シグナルを弱め、黄体退行に対抗する能力を発達させるための時間を胚に与えると推論している。黄体期のGnRH類縁体による処置は、卵胞の発育ステージ次第で、進行性の卵胞閉鎖、黄体形成、または排卵およびそれに続く反応性の卵胞の黄体形成につながる。繁殖供用後11～13日の間にGnRH投与すると、受胎率の顕著な増加を引き起こした(Macmillan et al. 1986; Mee et al. 1990; Stevenson et al. 1990; Peters et al. 1992; Ryan et al. 1993)。Peters et al. (2000)

は、発情周期の11～13日目のGnRH注射が牛の受胎率に及ぼす効果を分析するさまざまな研究結果をまとめて、実験デザインと得られた受胎率改善の程度いずれの面においても、研究間で大きな開きがあることを指摘している。この分析では、特定の状況では、人工授精後のGnRH処置が顕著な有益性をもたらす可能性があることを示唆した。

Sterry et al.(2006)の研究報告はこの説をさらに裏付け、定時人工授精後5日目のGnRH処置は、人工授精1回当たりの受胎率を、発情周期を示さない牛では改善し、発情周期を示す牛では改善しないことを確認するものであった。Lopez-Gatius et al.(2006)は、人工授精時および12日後のGnRH処置は、温暖期の高泌乳牛の受胎率を増加させることを実証した。2回投与と比較して効果は劣るものの、人工授精時のGnRH単回投与は疑いようのない有益性が得られている。

Bech-Sabat et al.(2009)も、人工授精後のGnRH処置による同様の有益な効果を実験の牛群に認めた。

これに対し、Franco et al.(2006a)およびFranco et al.(2006b)は、人工授精または胚移植後にGnRH処置を受けた牛において、受胎率の有意な改善が全く見られなかった実験例を2件報告した。これらの結果は、人工授精後のGnRH処置は特定の牛群では大きな価値を提供し得るものの、牛における胚死滅の原因は複雑であるため、必ずしも受胎率の一貫した改善をもたらすものではないことを明らかにするものである。

乳牛の人工授精後におけるフルニキシメグルミン等の非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)の使用について、最近いくつかの報告が発表されている。この方法は、NSAIDsがPGF_{2α}を含むアラキドン酸からの各種炎症性促進分子の合成を抑制する能力を有する機能に基づいている。よって、胚発育の遅延があったり、胚によるIFN- τ の産生量が不十分である牛でのPGF_{2α}の早期合成が抑制され得る。Guzeloglu et al.(2007)は、人工授精後15～16日目にフルニキシメグルミンの処置を受けた若雌牛の、無処置牛と比較した受胎率増加を報告した。同様に、Merrill et al.(2007)は、人工授精牛へのフルニキシメグルミン処置が、輸送によるストレスを受けているか否かに拘わらず、受胎率を増加させることを見出した。これに対し、肉牛での人工授精後11～16日目のフルニキシメグルミン投与は受胎率の改善につながることはなかった(Lucaci 2008)。Guzeloglu et al.(2008)が同様の実験デザインにおいて使用したケトプロフェン(NSAIDs)は、無処置対照群と比較しその投与による受胎率の有意な改善は全く認められなかった。

さらなる試験で同様の結果が確認されれば、この方法は早期黄体退行が早期胚死滅の主要な要因と考えられる状況において、特に魅力的なものとなるかも知れない。しかし現時点で、このような処置の有望性は高いものの、既存の比較対照研究は限定的であり、NSAIDsを含む製品の適応症には一般的に繁殖性向上を目的とする人工授精後の乳牛に対する処置を含まないので、その導入については慎重な検討が必要である。

乳牛の繁殖に及ぼす暑熱ストレスの負の影響を低減するための戦略

乳牛群の繁殖に及ぼす暑熱ストレスの負の影響を低減するための対策には、繁殖性の改善を直接目的とする生物工学的または薬剤療法だけでなく、常に牛の暑熱への曝露の低減を考えることも必要である。

その方法として以下の選択肢が考えられる：

- 生産システムの変更
- 暑熱に対する抵抗力を有する種の選定 (*bos indicus* やその混合種)
- 胚移植
- ホルモン療法

生産システムの変更

最も直接的でかつ最も頻繁に導入されている手段として、スプリンクラーによる散水、扇風機、日除け、または畜舎天井に取り付ける噴霧装置による温湿度制御などが挙げられる。Younas et al. (1993)は、冷却および送風は、排卵前のLHサージの大きさと発情応答率の増加傾向をもたらすが、それによる繁殖性の有意な改善のためには繁殖予定日の数週間前からの開始が必要であることを示した。この研究結果は、Bucklin et al. (1991) および Armstrong (1994)により裏付けられている。Morton et al. (2007)の研究では、牛が繁殖供用日から供用後6日目、そして繁殖前の1週間高温に曝露された場合の受胎率の顕著な減少が観察されている。また、人工授精前の3~5週間の高温への曝露と受胎率の減少との関連性も認められた。したがって、受胎率への暑熱の影響を軽減することを目的として管理が介入するとすれば、繁殖供用予定日の少なくとも5週間前から導入し、供用後1週間以上継続することが必要である。

Roth et al. (2001b)は別の研究で、卵胞の暑熱によるダメージからの回復と有望な卵母細胞の発現が見られるまでは、発情周期2~3周期分の期間が必要であるとの結果を得た。

また、特に牛に対する冷却と送風、および薬剤療法による発情管理とを組み合わせる場合に、ミネラル、ビタミンE、およびβ-カロチンの飼料への添加の

有益性もみられた。Arechiga et al.(1998)は β -カロチン補給と組み合わせた定時人工授精は、暑熱ストレスの発生期間中に乳牛の受胎率を高めることを報告した。Arechiga et al.(1998)は、セレンウムとビタミンEの補給が暑熱環境下の牛の繁殖性に好影響をもたらすことを認めた。一方、Ealy et al.(1994)は、暑熱ストレスを受けた牛の受胎率は冷却により若干改善したものの、ビタミンE補給については受胎率に対する明確な効果は認められなかったと報告している。

暑熱に対する抵抗力を有する品種の選定

*bos indicus*種が、乳生産と繁殖に及ぼす暑熱ストレスの間接的な有害作用に対し強い抵抗力を有することは、現在広く立証されている。

通常、暑熱ストレスの状況下で、ゼブー牛は飼料摂取量、発育率、乳生産量の顕著な減少を示さない。そのため、暑い地域での大規模な肉牛・乳生産オペレーション用には、その乳生産量の低さと成長率の遅さにも拘わらず、*bos indicus*種が粗放的な食肉生産と乳生産のための最良の選択肢となっている。しかし、集中生産型の酪農オペレーションでは当然その限りではない。

胚移植

体外受精由来の胚、または高気温に曝露されていないドナー由来の胚を使用した胚移植の採用は、繁殖性に及ぼす暑熱ストレスの悪影響を減少させる手段として有望な結果をもたらしている(Drost et al. 1999; Rutledge 2001; Al-Katanani et al. 2002)。

しかし、品質的に問題のない胚の移植であっても、暑熱ストレスを受けたレシピエントの内分泌のバランスと子宮環境に及ぼす負的作用を回避させるものではないので、このような有望な手段も慎重に検討する必要がある。さらに、胚移植は高温地帯の国では、しばしば経済的にも技術的にも実行可能性に欠ける選択肢である。

ホルモン療法

ホルモン療法は暑熱ストレスによる有害作用の原因に対処するものではないが、暑熱ストレスの内分泌バランスへの直接作用をある程度軽減し、それにより夏から初秋にかけての牛の繁殖成績への悪影響を減少させる。

暑熱ストレスの対策として、ホルモン療法のみには依存することは、いかなる場合も避けるべきである。また明らかに飼養管理対策の実施が必要で、薬剤療法の前に実施することが望まれる。

暑熱ストレスの期間中の繁殖成績を改善するために導入可能な戦略は以下を含む：

- 定時人工授精のための発情同期化
- 発情時のGnRH投与
- 人工授精後のGnRHまたはhCG投与

定時人工授精のための発情同期化

暑熱ストレスによる乳牛の繁殖パターンに対する負の影響は、発情徴候の発現不良や、夜間のみ発情行動が現れる傾向を含んでいる。このことは発情発見の効率を著しく減少させ、人工授精回数の減少、そして不適切な時期の人工授精により妊娠に至らない人工授精の割合増加につながる。定時授精に向けた薬剤療法による発情管理は、発情発見の必要性をなくし、人工授精率を改善し、その結果全体的な受胎率を改善する。しかし、発情を誘起し同期化するための各種システムは、高気温の直接的な影響を軽減するため、必ず冷却や散水など他の対策と組み合わせることが必要である。

暑熱ストレスに曝された乳牛の発情管理においてより好まれる方法として、いわゆるオブシンク型プロトコルがある。オブシンクのシステムでは、まず、GnRHまたはhCGの注射、そしてその7日後のPGF_{2α}の黄体退行用量の投与により、反応する卵胞の排卵が起こり、その48時間後の2回目のGnRHまたはhCGの投与により新たな主席卵胞の排卵が誘起される。最近の研究結果は、オブシンク法の優れている点は、排卵が誘起され、夏期の発情発見が不要となる点であることを示唆している。ある研究者は、発情時のGnRHまたはhCG処置は良好な繁殖性につながる、正常で十分に機能的な黄体の形成に寄与すると示唆している (De Rensis and Scaramuzzi 2003; De Rensis et al. 2008)。

de la Sota et al. (1998) は、泌乳牛において、夏季の暑熱ストレス時のオブシンクによる同期化と定時授精の効果を調査した結果、オブシンクプログラムによる処置群での繁殖成績の改善を認めた。

受胎率は、定時授精を実施した牛ではより高く(オブシンク群13.9%±2.6 vs 対照群4.8%±2.5)、分娩後120日後までの全体の受胎率も増加した(オブシンク群27%±3.6 vs 対照群16.5%±3.5)。また同著者らは、処置群において分娩後120日目までに受胎した牛の空胎日数の減少(オブシンク群77.6日±3.8 vs 対照群90.0日±4.2)と、分娩後初回繁殖供用までの間隔の減少(オブシンク群58.7日±2.1 vs 対照群91.0日±1.9)を報告した。

さらに、夏季の初回繁殖供用に応用されたオブシンクプログラムの経済的評価により、牛一頭当りの純利益の増加が明らかになった。

De Rensis et al. (2008)は最近発表した報告で、温暖な季節に乳牛に対し、古典的オブシンク法の2回目のGnRH注射の代わりにhCGを用いた場合、血漿プロゲステロン濃度が上昇し、繁殖性が改善されたことを報告している。

発情管理のための薬剤療法は、ビタミンやミネラル補給など他の対策と組み合わせた場合、一層有効な結果をもたらす。Arechiga et al.(1998)は、定時授精と β -カロチン補給が暑熱ストレス下の乳牛の繁殖成績と乳生産量に及ぼす効果を調査した。同研究グループはオブシンク法を用い、処置群と無処置群の初回人工授精時の受胎率が、暑熱期および冷涼期のいずれでも同様であったとの結果を得た。しかし、暑熱期では、定時授精を伴うオブシンク法による処置を受けた牛の分娩後90日目までの受胎率は、発情発見に基づく人工授精を実施した牛と比較してより高率であった(実験1; 16.6% vs 9.8% および 実験2; 34.3% vs 14.3%)。同著者らは、夏季の牛について、定時人工授精は暑熱ストレス期間中の受胎率改善が可能であり、さらに β -カロチンの補給は受胎率改善と乳量増加につながる可能性があるとの結論に至った。

De Rensis et al. (2002)は、分娩後の乳牛にGPG (GnRH+PGF_{2 α} +GnRH)またはCPC (hCG+PGF_{2 α} +hCG)法による発情同期化後の冬季および夏季の繁殖性を検証した。これらのシステムによる発情管理はいずれも受胎率を改善し、その受胎率は冬季に無処置群で得られる結果と近似していた。さらに発情同期化は、分娩から受胎までの間隔を夏季および冬季のいずれにおいても短縮させた。

オブシンク型プロトコルによる発情管理が暑熱ストレスに曝露された乳牛にもたらす有益性は、Alnimer et al.(2002) およびCartmil et al.(1999)によっても確認された。

人工授精時のGnRH投与

発情の早期段階でのGnRH投与は、増強されたLHサージを誘発するとともに、発情、LHサージ、排卵、および授精の同期化を改善すると考えられている。さらに、発情時のGnRH投与による排卵誘起により、暑熱ストレスの影響による排卵遅延や卵胞優勢の長期化の発生低減が可能となる。

夏季の終わり頃、発情発見時にGnRHを泌乳牛群に投与することにより、その受胎率は18%から29%に増加した(Ullah et al. 1996)。

多くの研究者が示唆する通り、人工授精時のGnRHまたはhCG処置後の繁殖性改善は、より良質な卵母細胞の適時排卵が確実となることに加えて、黄体機能の改善、そしてこれによる人工授精後30日間のプロゲステロン濃度上昇に起因する可能性がある。Ullah et al.(1996)の研究報告によると、プロゲステロン濃度の平均値は、対照群と比較して発情時にGnRH処置を受けた牛の方が高い値を示した。さらに45日後の2回目の妊娠診断において、対照群では早期診断結果と比較して受胎率の有意な減少がみられたが、GnRHの投与を発情時に受けた牛についてはその例外だったことから、GnRH処置を受けた牛での胚の生存率がより高かったことが示唆された。そのため同著者らは、暑熱ストレスを受けた牛では、人工授精時のGnRH処置が黄体プロゲステロンの分泌を促進し、胚の生存率を改善するという結論に至った(Ullah et al. 1996)。

この説は、Kaim et al.(2003)によりさらに裏付けられた。Kaim et al. (2003)はイスラエルにおいて、夏季および秋季のスタンディング発情の最初の徴候確認時にGnRH類縁体(プセリン、Receptal[®])注射を受けた泌乳牛の受胎率が、対照群と比較して約16.6%増加することを見出した。さらに、Kaim et al.(2003)が報告した試験では、発情時のGnRH処置により、人工授精時にボディコンディションスコアの低い牛、および夏季にボディコンディションスコアが高い牛の受胎率が有意に改善された。特にボディコンディションスコアが低い牛では発情時のGnRH処置により、夏季と冬季の受胎率がともに有意に改善されたため、処置の効果が明らかであった。興味深いことに、同著者らは発情時のGnRH処置が分娩後に繁殖障害を経験した牛の受胎率を2倍以上に引き上げたことを見出した。

人工授精後のGnRHまたはhCG投与

暑熱ストレス下の牛の胚発育と受胎産物の生存に結びつく最適な内分泌環境を得ることを目的として、黄体刺激ホルモンの使用を目指した研究はほとんどない。

人工授精後のGnRHまたはhCGによる処置は、黄体期の第1卵胞波の主席卵胞を除去することにより、エストラジオール濃度を減少させ、黄体退行カスケードの開始を防ぐと信じられている。

また、早期黄体期の卵胞の排卵は、副黄体の形成につながり、結果としてプロゲステロン濃度の上昇をもたらし、このことが受胎率向上に結びつく

2 牛の繁殖

(Lamming et al. 1989; Mann et al. 1995; Butler et al. 1996; Mann et al. 2001; Lopez-Gatiús et al. 2006)。

人工授精後のhCG(4～6日目)およびGnRH(11～12日目)両者の投与は、乳牛の受胎率を改善する方法として定着しているが、暑熱ストレス下の牛における人工授精後のhCGおよびGnRH補給に関する研究は限られている。

Willard et al.(2003)は、軽度の暑熱ストレスに曝露された乳牛を用いて、人工授精後のGnRH投与が血清プロゲステロン濃度および受胎率に及ぼす影響を調査した。同著者らは、授精後5日目または11日目いずれかでのGnRH処置は、無処置牛と比較して、いずれの場合もプロゲステロン濃度のより大きな上昇をもたらし、8日後および15日後にはさらに高い値に達したことを報告した。無処置の対照群では、GnRH処置牛(人工授精後5日目または11日目)と比較して低受胎率傾向が認められ、最も改善がみられたのは人工授精後11日目での処置後であった。

人工授精後4～6日目のhCG投与および胚移植レシipientへのhCG投与(Kaneda et al. 1981; Greve and Lehn-Jensen 1982; Lewis et al. 1990; Sianangama and Rajamahendran 1992; Santos et al. 2001; Nishigai et al. 2001; Nishigai et al. 2002)、および人工授精後11～12日目のGnRH注射(Peters et al. 2000)の肯定的効果を考慮すると、乳牛の繁殖性に対する暑熱ストレスの悪影響を低減するためにこのような処置を実施する可能性について、さらなる検討が必要であろう。

2.4 繁殖障害

とりわけ高泌乳牛では、不受胎は深刻な問題となる場合がある。分娩後は、迅速で円滑な子宮修復と、正常な卵巢活動の早期再開、またその後、高受胎率を約束する正確な発情発見がなければならない。しかし一方で、分娩後早期の負のエネルギーバランス状態で、牛は大量の泌乳を要求される。不受胎問題が頻繁に見られるのは、驚くべきことではない。牛群での良好な繁殖力を達成し維持するためには、繁殖障害の早期診断と治療が必要である。

牛個体での繁殖問題は、次のグループに分類できる：

- 胎盤停滞

- 子宮感染症
- 無発情
- 卵巣嚢腫(COD)
- 胚死滅
- リピートブリーダー
- 流産

これらすべては以下の章で解説するが、初めに分娩後の生理的側面を説明する。

2.4.1 分娩後の生理的側面

子宮修復

子宮が平常の非妊娠時の大きさに戻るには、通常3週間ほどかかる。生理学的修復の完了まで(子宮内膜上皮の再生を含む)に必要な時間は35～50日である。

内因性PGF_{2α}代謝産物濃度は、分娩後最初の7～23日の間に上昇することにより、迅速な子宮修復をサポートする。

子宮修復では、物理的な収縮、宮阜の壊死と脱落、および子宮内膜の再生が起こる。尿漿膜の喪失後、宮阜の壊死が生じ、通常は分娩後12日目までにその分離と脱落が起こる。宮阜の分離は、分娩後修復する子宮の急速な重量減少に大きく寄与し、分娩時に13kgであった子宮の重量は3週間後には約1kgにまで減少する。悪露は、宮阜および断裂した臍帯からの胎水と血液の残存物から成り、分娩後最初の7～10日間で体液と組織残屑の顕著な喪失につながる。その容量は、初産牛の500 mlから経産牛の1000～2000 mlまでの範囲で変動する。

分娩後早期の子宮修復と卵巣活動再開の相関はいまだ完全には解明されていないが、そのような相関が存在し、その後の繁殖性に影響し得ることを示唆する有力な根拠がある。正常な卵巣活動の早期再開は子宮修復を早めることが知られている。また、正常な牛で分娩後10～14日目に見られる子宮の顕著な緊張性増加とサイズの縮小は、通常初回の発情とエストロゲン産生と同時期に見られる。同時に、エストロゲンは子宮の感染防御メカニズムと子宮平滑筋繊維の収縮に有益な効果を発揮することが知られている(Hussain 1989)。これに対し、卵巣活動に及ぼす子宮修復の影響は、主に分娩後の子宮内膜からの大量のPGF_{2α}の放出に基づくものである(Kindahl

et al., 1992)。正常な産褥期を経過した牛、および分娩後のPGF_{2α}放出期間が延長した牛では、子宮修復がより迅速に完了し、初回排卵（正常な期間の黄体期が後に続く）がより早期に起こると推論されている。子宮修復の長期化を特徴とする異常な産褥期を経た牛では、卵巢活動の再開が顕著に遅延した。

卵巢活動

大半の牛では、分娩後の無排卵期間に卵胞活動の特徴的パターンを観察できることが明らかに示されている。この期間の卵巢は、数個の小型から中型の卵胞を特徴とし、分娩後非常に短期間で最初の主席卵胞の動員が生じる (Opsomer et al. 1996)。しかし、コマーシャル牛群での分娩から初回排卵までの間隔は、品種、栄養、泌乳量、季節および哺乳子牛の存在に大きく左右される。

搾乳牛では、中型卵胞が分娩後5日目までに検知可能となり、最初の主席卵胞は分娩後15～27日目に排卵される。大半の乳牛は分娩後40日目までに発情周期活動を再開する。しかし酪農の現場では、それらの牛の半数で発情が認められない。

哺乳している肉牛では、初回排卵の時期がより遅く、同一群内および群間のいずれでもかなり変動する。産褥期には短い周期（10日未満の黄体期）が頻繁に認められる。哺乳している肉牛では、分娩後5～7日までに中型卵胞の発現があり、主席卵胞は分娩後10～21日目までに検知可能である。しかし、適切なLHパルスが不在であるため、これらの主席卵胞は最終的な成熟と排卵に至らず、卵胞閉鎖に至る。産褥期早期でのLHパルスの不在は、下垂体前葉のLH貯蔵量の枯渇に関連しており、哺乳には影響を受けない (Yavas and Walton 2000b)。分娩後15～30日目にLH貯蔵量が補充された後、LHパルスの不在は哺乳に依存するようになる。哺乳により生じる刺激は、視床下部からのGnRH分泌を阻害することにより、LHのパルス状放出を抑制する。この抑制作用は卵巢のエストロゲンにより調節される。哺乳は、卵巢エストロゲンの負のフィードバック作用に対する視床下部の感受性を高め、下垂体からのLH放出を抑制する (Yavas and Walton 2000a)。LHのパルス状放出は分娩後25～32日目前後に回復し、牛の発情周期は分娩後29～67日の間に再開する。

産褥期の繁殖性とその後の繁殖管理プログラム

産褥期における繁殖性の回復が緩慢である場合、その後の繁殖管理プログラムの成功にとって大きな障害となる。

2.4.2 胎盤停滞

分娩後の胎膜(胎盤)排出は、胎子と母体の密着性の喪失と子宮筋層の収縮を含む生理的プロセスである。胎膜の分離は、複雑な免疫学的プロセスに基づいている。胎子の栄養膜細胞が発現するMHC(主要組織適合遺伝子複合体)クラス I タンパク質を母体が免疫学的に認識することが引き金になり、免疫/炎症反応が誘発され、これが分娩時の胎盤分離に寄与する(Davies et al. 2004)。

通常、胎盤は分娩後6~8時間以内に排出される。分娩後24時間以内に脱落しない胎盤は、停滞胎盤または遺残胎膜と呼ばれる。胎盤停滞の発生率は4.0~16.1%であるが、問題のある牛群でははるかに高率な場合もある。

胎盤の分離不全は、妊娠終了時の免疫システムに胎盤節を脱落させる能力が欠如していることに大きく起因していると考えられる。Davies et al. (2004) は、牛において、免疫プロセスの機能障害により、胎膜のタイムリーな分離が損なわれるとする根拠を、さまざまな文献より提示している。正常な胎盤分離を経た牛の胎盤節(placentomes; cotyledon[胎子胎盤]とcaruncle[子宮小丘または宮阜; 母体胎盤]の総称)は、白血球走化因子を含有するが、停滞胎盤を有する牛の胎盤節にはこれが欠如している。停滞胎盤を有する牛の白血球と好中球は、胎盤分離が正常な牛と比較して、走化性刺激への反応が劣る。

胎盤停滞の発生における胎盤排出のための子宮収縮性不足の関与は、わずかであるか、または皆無であることを理解することは重要である(Eiler 1997); 停滞胎盤を有する牛の分娩後数日間の子宮活動は、正常であるか、または亢進している(Frazer 2005)。

牛の代謝状態と胎膜を排出する能力には、明らかに関連性がある。牛の分娩前の負のエネルギーバランスがより重度である場合、胎盤停滞を起こす確率は80%高くなる。また、血中ビタミンEが低濃度である場合も、胎盤停滞のリスクが高くなる(LeBlanc et al. 2004; LeBlanc 2008)。

胎膜遺残は、牛の繁殖効率に悪影響を及ぼす一般的な障害で、産褥期後期に子宮感染症に罹患しやすくなるとともに、分娩後の卵巣活動の再開にも影響する。

そのような影響を受けた牛の受胎率は、そうでない牛と比較して約15%減少すると推定されるが、繁殖成績の低下は、胎盤停滞が子宮炎または子宮内膜炎の発現につながる場合にのみ生じると考えられる。

牛胎盤の分離は、遺伝的、栄養的、免疫学的、および病学的ないくつかの因子に影響されることはすでに認められているが、胎盤停滞の病因は十分に解明されているわけではない。

胎盤の用手剥離は、子宮に損傷を与え、正常な繁殖状態への回復を遅延させる場合がある (Bolinder et al. 1988)。胎盤が自然に分離するのを待つか、分娩後7～10日目に、子宮から優しく引き出す方法が望ましいと考えられる。

処置の目的は、分娩後の子宮内膜炎による有害作用の予防であるべきである。さまざまな剤型の子宮内抗生物質による局所的処置が十分に定着しているが、その有益性は限られているのが現状である。また、一部の試験結果は、子宮内の操作および処置を伴わない、抗生物質の静脈投与による胎膜遺残治療は、分離と局所的抗生物質治療を含む従来の治療と同様の効果を得ることが可能であることを示している (Drillich et al. 2001)。複数の研究で、未治療の停滞胎盤を有する牛の約50～80%が、分娩後10日以内に最低でも1日、39.5°Cを超える発熱を呈することが示されている (Drillich et al. 2003; Drillich et al. 2006)。しかし、これらすべてに、全身性の抗生物質治療が必要か否かは明らかではない。これはその後、発熱を伴う牛を用いた研究 (Drillich et al. 2006) で、子宮内抗生物質投与または胎膜除去術を単独または併用で行った場合にも、全身性抗生物質治療の単独実施と比較して、治療を要する牛の割合は減少せず、あるいはその泌乳期間の繁殖成績を改善しなかったことにより確認された。全身的治疗のみで直腸温度上昇の評価によりその有効性が認められ、子宮内に抗生物質投与を行う治療と比較して、抗生物質の使用が減少した。

遺残胎膜の予防と治療の薬剤療法の一つは、分娩直後のPGF_{2α}投与である (Stevens et al. 1995)。対照試験が不足しているため、この方法の有効性は評価が困難である。子宮運動性を高める薬剤である、オキシトシン、麦角誘導体、カルシウムでは、わずかに限定的な有効性が示されているに過ぎない。

ビタミンEとセレンウムの単独または併用投与による胎盤停滞発生率の減少は、酸化ストレスがこの障害の病因の一部であることを示唆している (Campbell and Miller 1998; Gupta et al. 2005)。そのため現時点での予防対策は依然として、分娩時の衛生に関する一般的助言、十分な栄養補給 (カルシウム, セレン, ビタミンE等) および感染症のコントロールに限られている。

どの療法を選択するにしても、停滞胎盤を経験した牛の25～50%が子宮炎を発症するため、これらの牛の体温と臨床的知見を経時観察する必要がある。

2.4.3 子宮の感染症

子宮の細菌感染症を重要視しなければならないのは、それは子宮機能のみでなく、卵巣機能や、視床下部および下垂体といったより高位の中枢にも支障をもたらすためである。子宮の細菌感染症そのものに加え、関連する免疫反応を通じて、牛の健康と繁殖性は損なわれる。したがって、臨床獣医師にとって、子宮疾患の正確な診断と適切な治療は、すべての繁殖管理プログラムにおいて鍵を握る要素となる。

一般的に、牛の25～40%が分娩後2週間以内に臨床型子宮炎を経験し、この疾患は牛の20%が臨床型子宮内膜炎として持続する。牛を子宮感染症に罹患させやすくするさまざまな要因として、牛の生殖器官機能もしくは全体的な健康に直接関連する因子、または飼養管理条件に間接的に関連する因子が知られている (表10)。

表10 牛における子宮細菌性疾患発症に関するリスク因子

出典: Sheldon and Dobson (2004b)

牛における子宮細菌性疾患発症に関するリスク因子	
子宮の損傷	<ul style="list-style-type: none"> - 死産、双子、難産、帝王切開術 - 停滞胎盤 - 子宮修復の遅延
代謝状態	<ul style="list-style-type: none"> - 乳熱、ケトosisおよび第四胃左方変位
病原性と免疫のバランス	<ul style="list-style-type: none"> - 好中球機能障害 - 子宮腔の細菌叢の種類 - プロゲステロンまたはグルココルチコイド投与。黄体の早期形成 - 環境、牛、分娩時の衛生レベルの重要性は上記と比較して低いと考えられる

定義

子宮のさまざまな状態を描写するための明確な定義の必要性は、研究者と臨床獣医師の双方により、長年認識されてきた。最も広く受け入れられている分類のひとつは、分娩後14日までに発症する急性子宮内膜炎(腔分泌物、子宮拡大、臨床症状)と、14日経過後に発症する亜急性・慢性子宮内膜炎(限定的な腔分泌物、臨床徴候の不在)とに区分される。

最近、Sheldon et al.(2006)およびSheldon et al.(2008)は、明確な臨床的定義を提案し、最も重要な子宮の問題を描写し、識別できるようにした。

産褥性子宮炎

通常分娩後10日以内に発症する、子宮細菌感染症による急性全身性疾患で、その臨床徴候には、悪臭を放つ、褐色の水様性子宮分泌物が含まれ、通常は発熱を伴う。重度の症例では、泌乳量の低下、動作緩慢、食欲不振、心拍上昇、および明らかな脱水症状が認められる場合もある。

産褥性子宮炎は、しばしば停滞胎盤、難産、死産または双胎妊娠に併発する。分娩後21日目までに、異常に拡大した子宮および子宮の化膿性分泌物が腔において検知可能な牛は、臨床症状が欠如していても、臨床型子宮内膜炎として分類するべきであると提案されている。

臨床型子宮内膜炎

子宮内膜炎は、分娩後21日以上、全身性の徴候を伴わない、腔内の化膿性(膿が50%超)または粘液膿性(約50%が膿、50%が粘液)滲出液の存在を特徴とする。

潜在性子宮内膜炎

通常、細胞診で診断される子宮内膜の炎症で、腔内の化膿性物質を伴わない。牛の潜在性子宮内膜炎は、臨床型子宮内膜炎が認められない場合で、分娩後21～33日目に採取された子宮細胞診試料において、18%を超える好中球の存在、または34～47日目に10%を超える好中球の存在により定義することが提案されている。

さまざまな研究において報告される潜在性子宮内膜炎の有病率は、診断方法と分娩後検査の時期に左右されるので、19～90%と幅がある。罹患した牛では、繁殖成績の有意な低下が見られる(Lincke et al. 2007)。

牛における子宮疾患の免疫学的側面

環境からの細菌は、大抵の分娩後の牛の子宮腔を汚染する。こういった汚染の除去は、子宮修復、子宮内膜の再生、および子宮の防御機構に依存する。

妊娠中、牛の子宮の免疫系は活発で、妊娠の維持、胎子の成長、および感染症の予防に重要な役割を果たす。

生来の防御機構は、さまざまな解剖学的、生理学的、食作用および炎症性の各機序により、子宮の細菌汚染に対抗するための中心的役割を果たす。好中球は、細菌感染が生じた際に、最も早期に末梢循環血液から動員され子宮腔に送り込まれる最も重要な貪食細胞である。

周産期でのホルモン変化と免疫応答性の変化は、子宮、乳房、その他の組織の感染症への感受性増加に関連があると考えられてきた。正常な分娩後、末梢循環血液中の牛好中球の貪食能力は周産期を通じて高く維持されるが、好中球の殺菌能力および酸化的破壊活性は分娩中に若干衰える (Singh et al. 2008)。好中球が有するこれらの活動は、分娩後1週間の間亢進し、子宮感染症の自然回復に有利に作用する。

分娩前の期間には、コルチゾール濃度の上昇が見られ、これに続いて末梢血中の白血球増加症が起こる。続いて、分娩後1週間は末梢血中の白血球減少症が起こる。これは、分娩直後に好中球が子宮腔へ移動することによるものと考えられている。

現在では、子宮炎と子宮内膜炎の両者は、飼料摂取量の減少、より顕著な負のエネルギーバランス、および免疫機能の低下との関連性を示す有力な根拠があり、これらの違いは分娩の2週間前、すなわち症状が診断される3~7週間前から検知可能である (LeBlanc 2008)。

Zerbe et al. (2000) は、代謝性疾患、とりわけ肝トリアシルグリセロールの血中濃度の上昇は全身循環および子宮壁の両者から採取した好中球内の細胞毒性の減少を起こすことが突き止められ、おそらくこれにより牛が子宮疾患にかかりやすくなっていることを実証した。

プロゲステロン、エストラジオール、およびプロスタグランジンの役割

分娩後の内分泌環境は、子宮の免疫応答性に重大な影響をもたらす。プロゲステロンが高濃度な環境下では、子宮頸管の粘液産生、子宮筋収縮性、子宮腺分泌、および子宮腔の好中球の貪食活動が抑制されることが一般的に認められている。Lewis (2004)は、プロゲステロンの黄体期濃度が免疫応答性を抑制するために、子宮の細菌感染感受性が亢進することを示すとともに過去の研究を総括している。Lewis (2004)がさまざまな試験報告から結論づけた通り、子宮感染感受性の亢進は、プロゲステロン濃度の

上昇、PGF_{2α}産生低下、およびin vitro試験でのリンパ球増殖の減少に関連している。

子宮の免疫機能は、エストロゲンの影響下で改善すると考えられている。しかし、エストラジオールが子宮内膜の免疫細胞の貪食および殺菌活性の絶対的増加を引き起こすのか、または観察される活性の亢進は、単にプロゲステロン優位な状況下で生じる状態に関連するものなのかは明らかではない (LeBlanc 2008)。Sheldon et al.(2004c)は、過去に妊娠した子宮角の内腔にエストラジオールを投与したが、分娩後の子宮細菌感染症の排除を促進しなかったことを見出した。

分娩後1ヶ月目でのPGF_{2α}の生理的な役割は明らかになっていないが、子宮収縮性の促進に役立つことにより、子宮修復に寄与する可能性がある。免疫学的観点では、PGF_{2α}は食作用とリンパ球機能を亢進するサイトカイン産生を炎症促進性に刺激する。PGF_{2α}は、高濃度で産生された場合、プロゲステロンの免疫抑制作用を軽減することにより、子宮の免疫防御を促進することが可能である。

子宮感染症の細菌学

急性子宮内膜炎は大腸菌、グラム陰性嫌気性菌、*アルカノバクテリウム・ピオゲネス* (*Arcanobacterium pyogenes*)、およびその他の細菌 [ペプトストレプトコッカス (*Peptostreptococci*) を含む] の存在を特徴とし、各細菌の感染頻度は同等である。大腸菌が産生・排出するエンドトキシン類とリポ多糖類は、牛の難産と遺残胎盤の合併症をもたらす最も重要な病原性因子の1つである。これらのエンドトキシン類は直接的な細胞毒性作用を有し、おそらく *A. pyogenes* 菌による感染の発症に有利に作用すると考えられる。Zerbe et al.(2001) は、大腸菌および *A. pyogenes* のフラグメントまたは溶解物と牛好中球とを持続的に接触させると、好中球の機能低下につながることを示した。 *A.pyogenes* および大腸菌に感染させた牛の子宮分泌物に曝露した好中球でも、同様の影響が認められた (Zerbe et al. 2002)。したがって、分娩後まもない子宮内膜の大腸菌による高濃度汚染は、子宮内膜の免疫防御機構に負の影響をもたらす、子宮感染症の持続を容易にすると結論づけられる。

亜急性/慢性の子宮内膜炎に罹患している牛の子宮から最も多く分離される細菌は、*A. pyogenes* およびグラム陰性嫌気性菌である。この日和見性グラム陽性通性嫌気性菌は、混合培養において多様な有機体とともに一般的に存在するが、多くの場合、*Fusobacterium necrophorum* および

Prevotella melaninogenicus, *E. coli*、またはレンサ球菌 (*Streptococcus spp*)とともに存在する。

A. pyogenes とグラム陰性嫌気性菌との間には相乗効果があると考えられている。*Bacteroides melanogenicus* と *B. fragilis* は、免疫細胞による細菌の貪食を障害し得る特定の成分を産生および放出する。*F. necrophorum* は、貪食性免疫細胞に細胞毒性を発揮するロイコトキシンを産生することが示されている。*A. pyogenes* は、*F. necrophorum* の増殖を刺激する成長因子様物質を放出する能力を有する。

最近の *in vitro* の研究では (Donofrio et al. 2007)、子宮内膜炎に牛ヘルペスウイルス4型が関与している可能性が示唆されている。

子宮の健康状態が繁殖性に及ぼす影響

子宮の細菌感染症による悪影響は、細菌とその毒素の存在、また感染症への反応から生じる炎症プロセスによる障害のいずれとも関連している。*A. pyogenes* または嫌気性菌の存在は、繁殖性の低下につながる。子宮内膜炎は、感染していると不受胎を引き起こすことは当然として、当該疾患の治療に成功した後であっても、低受胎の原因となると認識することが非常に重要である。推定によると、子宮内膜炎を有する牛の受胎率は約20%低下し、分娩間隔は30日間延長するため、結果として繁殖障害により淘汰処分される牛が3%増加する (LeBlanc et al. 2002a)。

子宮感染症が原因の低受胎には、卵巣機能障害も伴う。Opsomer et al. (2000) は、子宮の損傷が黄体退行機序を妨げ、黄体期の延長を引き起こすことを示唆した。この疫学的研究により、子宮感染症が排卵遅延につながることも示された。さらに、Sheldon et al. (2002) は、分娩後、より重度の細菌汚染を受けた牛では、卵巣機能が阻害され、それにより分娩後最初の主席卵胞の成長速度およびエストラジオール産生が低下することを示した。

子宮感染症は、繁殖性に影響を及ぼすだけでなく、特に遺残胎盤を伴う場合には、泌乳量の低下を引き起こす (Esslemont and Kossaihati 2002; Sheldon et al. 2004a)。

乳牛群での子宮内膜炎の有病率に関するデータは、7.5%~8.5%から40%超までと幅が見られる (Gilbert et al. 2005)。しかし、同著者らのその後の研究において、細胞学的に診断された子宮内膜炎の有病率は、分娩後40~60日目において37%~74%であることが判明した。子宮感染症により引き起こされる低受胎の根底にあるメカニズムに拘わらず、臨床獣医師にとっては、子宮疾患の診断と治療を迅速かつ効果的に行うことが大切である。

子宮感染症の診断

一般的に、牛の子宮の健康状態を評価するための診断方法では、綿密な診察と、この過程で採取した試料の補足的臨床検査による裏付けを行う(表11)。牛の繁殖歴に関するデータからは確定診断を得られないが、治療の選択肢を決定するだけでなく、原因となる可能性のある因子および疾患プロセスの期間を評価する(例えば、適切な治療を選択するにあたっての、発情周期を示す牛と示さない牛の鑑別など)際には非常に重要となる。

表11 牛の子宮の健康状態を評価する際の診断手順

診断プロセスの段階	取得情報
繁殖歴	分娩後の経過時間 分娩後の繁殖供用歴 最近の処置(全身および/または生殖器中心)
全身診察	牛の全体的外観 : 姿勢、覚醒状態、および運動性 腔分泌物の存在、会陰部および脚部の乾いた滲出液の存在 尾の位置(尾根部の上昇、片側で保持) 体温
生殖器の詳細な診察	腔壁の触診と腔分泌物の目視検査 : 腔分泌物の存在、腔壁病変の存在。腔分泌物の特徴: 色、臭い、粘度 直腸検査 : 子宮頸部と子宮の位置と大きさ、子宮緊張度、子宮腔内の液の存在、黄体およびその他の卵巢構造物の存在 腔鏡検査 : 外子宮口: 閉鎖度、分泌物の存在、特徴および容量、ならびに腔粘液。 生殖器の経直腸的超音波検査 : 子宮: 子宮の位置、大きさ、子宮壁の厚さ、子宮腔内の液の存在 卵巢: 黄体の存在、その他の卵巢構造物
試験室内検査	細胞診 : 子宮内膜スミアによる細胞の存在および種類の評価(多型核好中球の比率) 子宮分泌物の微生物培養 : 細菌の種類と抗生物質に対する感受性 子宮内膜の生検 : 子宮内膜生検試料の組織学的評価: 炎症の存在と程度、子宮内膜の形態変化の度合い

分娩後10日目までの子宮炎の診断は比較的容易である。これには発熱、子宮腔内と腔内の悪臭を放つ膿、外陰部の分泌物、および子宮修復の遅延が伴う。子宮炎の早期診断のために生殖器を評価する際は、子宮修復

の生理的プロセスを考慮し、慎重を期す必要がある。分娩後最初の2週間では、赤褐色の悪露の存在は正常である。加えて、分娩後最初の1週間では、1～2日間の発熱が続くのは普通であり、子宮感染症との十分な相関は認められていない(Sheldon et al. 2004a)。

子宮内膜炎は、特に無症状の場合、診断がより困難となる。インターバット社の調査によれば、亜急性／慢性子宮内膜炎を罹患した牛のうち外部から何らかの腔分泌物が目視可能だった症例は51%のみであった。

直腸検査は、子宮のサイズ、内容物、および位置のおおよその推定を可能にする。子宮腔に大量の滲出液が蓄積している場合には、直腸検査で貯留液の検知は可能であるが、その液の特性または子宮壁の状態に関する情報は得られない。

経直腸的超音波断層法を応用することにより、子宮角および子宮頸部の直径をより客観的に測定でき、子宮腔内の粘液および膿の存在を把握できる。

腔鏡検査は、オートクレーブ処理の可能なプラスチック製、金属製、または、使い捨てのホイル張りボール紙製腔鏡を用いて行い、これにより腔内容物の検査が可能となる。迅速で簡易な技術であるが、子宮頸管滲出液の存在に基づき陽性を診断するため、子宮病変を有する牛の割合が過少評価される傾向があることに注意が必要である。腔鏡検査は、子宮内膜炎の検知に関し、経直腸的子宮触診よりもはるかに優れた診断技術であるが、臨床獣医師がこれを十分に活用しないのは、主に必要な時間、労力および設備費用を過大評価しているためだと考えられる。

子宮内膜炎の確定診断は、子宮内膜の生検検体の組織学的検査に基づいて行われ、これはその後の繁殖性評価でも役立つ(Bonnet et al., 1993)。しかし、この技術には費用と時間がかかり、現場の状況下での利用は容易ではない。さらに、生検検体の採取が繁殖性に悪影響をもたらす得ることを示す知見もある。

子宮内容物の細胞診により、非常に重要な情報が得られ、潜在性症例の診断が可能となる(Gilbert et al. 2005; Kasimanickam et al. 2004, Sheldon and Dobson 2004b; Sheldon et al. 2006; Sheldon et al. 2008)。

多型核好中球 (PMNs) は、子宮内貯留液で主に見られる炎症性の細胞種で、PMNsの相対的比率の特定により、分娩後の牛の繁殖成績を予測できることが示されている。

試料採取は、検査用綿棒を子宮に挿入するか、診断的子宮洗浄を行うか、サイトブラシ (cytobrush) という小型の器具を用いて行う。

Barlund et al. (2008) は、最近の研究で、腔鏡検査、超音波検査による子宮液容量の評価、超音波検査による子宮内膜厚の評価、サイトブラシを用いて採取した子宮内膜の細胞診、および診断的子宮洗浄後の子宮内膜細胞診による子宮内膜炎の診断精度を比較した。その結果、牛での子宮内膜炎の診断方法として最も信頼性が高い方法は、サイトブラシにより採取した試料の細胞診検査であることが明らかになった。

しかし、これらのうちのいずれの方法も現場では広く使用されておらず、子宮疾患の診断は多くの場合完全に臨床症状による診断に依存している。

臨床症状で子宮内膜炎を診断するための最も精度の高い方法は、腔検査により膿の有無を調べることである。そのため、腔鏡検査の採用が強く推奨されるが、代替法として、腔を触診し、子宮頸管の粘液を採取して検査することも可能である。後者の方法の利点は、安価かつ迅速であり、腔裂傷と腔分泌物臭の検知が可能なことである (Sheldon et al. 2006)。手順としては、乾燥したペーパータオルを用いて外陰部をぬぐい、潤滑剤を塗布した清潔なグローブを装着した手を外陰部から腔に挿入し、腔の粘液内容物を検査用に採取する。触診による腔検査は、子宮の細菌汚染を引き起こしたり、急性期蛋白の反応を誘発したり、あるいは子宮角の直径に影響を与えたりすることはない。

ステンレス製の棒とゴム製の半球からなる内容物採取用の新たな検査器具、メトリチェック (Metricheck[®], Simcro社、ニュージーランド) を用いることもできる。

この簡易かつ非常に効果的な検査器具を利用する際には、考慮すべき重要な点がいくつかある：

- このツールは各個体での使用前に洗浄および消毒することが必要である (すなわち大きな牛群の分娩後定期検査の際は、十分な数のメトリチェックが必要である)
- 糞便が腔内に入らないよう、会陰部の汚れを取ることが必要である。
- 牛と検査者双方の安全と安心のため、牛を保定する必要がある。

子宮内膜炎は、子宮の状態と腔粘液の特徴に基づき評価する。炎症プロセスの程度の指標として、粘液スコアシステムが広く適用されている(表12)。

表12 臨床子宮内膜炎スコア(Sheldon and Dobson 2004b)。

腔粘液の特徴と臭いについて採点する。2つのスコアの合計が子宮内膜炎スコアとなる。

説明	スコア
粘液の特徴	
透明または半透明の粘液	0
白色膿の薄片を含む、透明または半透明の粘液	1
50ml未満の滲出液で、50%未満の白色またはクリーム状膿を含有する	2
50ml超の滲出液で、50%超の白色、クリーム状、または血膿を含有する	3
粘液臭	
不快臭なし	0
悪臭あり	3

現在承認されている牛の子宮感染症治療の一般ガイドライン

急性産褥性子宮炎の治療には、対処する3つの主要目的がある。細菌感染の除去、妊娠中毒症の一般臨床所見の治療、および牛の恒常性を維持し、炎症プロセスと妊娠中毒症による損傷を最小限に抑えるための補助的処置である。抗菌性薬剤による治療では、広範囲な抗菌スペクトラムを有する抗生物質を使用することが必要である(特に大腸菌に対し)。子宮内製剤の使用は可能であるが、罹患牛の多くは発熱しているため、臨床獣医師は経静脈非経口抗生物質を選択する。さらに、罹患した牛は中等度または重度の病態を呈するため、一般的に、子宮炎を有する牛が全身的な抗生物質治療が必要であることに異論の余地はほぼない。セフトロキソン等のセファロスポリン系抗生物質の注射用製剤は、現在一般的に使用されている(Sheldon et al. 2004d; Drillich et al. 2006)。

アニマルウェルフェアおよび子宮内膜に対する抗炎症を目的として、多くの獣医師は、急性子宮炎の標準治療に、非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)を併用している。これまでのところ、この方法が繁殖効率に対し何らかの有益な効果をもたらすという所見はほとんどないものの、体温の低下と臨床所見の

改善は認められている (Drillich et al., 2007)。子宮炎治療にNSAIDsを含めることを決定する際には常に、この種の薬剤がアラキドン酸からの内因性プロスタグランジン産生を抑制し、子宮修復に影響を及ぼすことに留意すべきである。このような場合は、必ず外因性PGF_{2α}を投与すべきである。

産褥期早期の子宮感染症の標準的治療にプロスタグランジンを含めることの有益性については、依然として議論されている。分娩後3週間以内の早期にPGF_{2α}使用を支持するデータはほとんどないものの (LeBlanc 2008)、多くの臨床獣医師が十分に満足できる結果を報告している。

子宮内膜炎治療のために選択する抗生物質は、細菌感染を除去する一方、子宮の嫌気性環境でその活性を持続できなければならない。その上に、これにより生じる乳または肉の残留薬剤は、最小であるべきである。

Metricure[®] は特に本疾患を適応症として開発され、これらの条件を満たし、投与を受けた牛では、細菌感染の除去による繁殖成績の改善が示されている (McDougall et al. 2001; LeBlanc et al. 2002b; Kasimanickam et al. 2005)。

ニュージーランドにおいてMcDougall et al. (2001)が行った研究では、Metricure[®]の子宮内投与により、乳牛、特に過去に遺残胎盤、死産、または外陰部分泌物のあった牛で、繁殖成績が改善したと報告されている。

この製剤の重要な特徴の一つは、子宮腔だけでなく子宮内膜においても、活性状態のセファピリンが十分な濃度で得られる点である (表13)。これにより、子宮内膜陰窩からの細菌の効果的な除去が見込まれる。

表13 Metricure 投与後4、8、24、および72時間後の子宮内膜内
および血漿中セファピリン濃度
(データ出典元: インターベット社製品ファイル)

Metricure投与後経過時間	4時間	8時間	24時間	72時間
子宮内膜内のセファピリン濃度 (mcg/g)	9.62 (>38 MIC)	23.08 (>92 MIC)	4.9 (>19 MIC)	0.8 (>3MIC)
血漿セファピリン濃度 (mcg/g)	0.06	0.02	< 0.01	< 0.01

*A. pyogenes*菌に対するMIC₉₀ = 0.25 μg/ml
検出限界 - 0.01 μg/ml

*A. pyogenes*菌による子宮感染症の急速かつ効果的な除去につながる抗生物質治療は、処置牛の繁殖成績の改善をもたらしてきた。セファピリンは、牛の子宮内膜炎に関与する子宮内の主要病原体に対し、非常に効果的であることが明らかになっている (Sheldon et al. 2004d)。

子宮感染症治療に用いる子宮内治療薬は、刺激作用がなく、子宮内膜の防御機構の機能を損なわないものとするのが非常に重要である。この点について、比較対照試験によって検討された抗生物質はほとんど存在しない。セファピリンは、臨床用の用量では、好中球の機能または細菌除去能力に悪影響をもたらさないことが実証されている (Dosogne et al. 1998)。

膿の小片が腔粘液または人工授精用注入器の先端で発見されたときに、たまに慢性／亜急性の病態が認知される場合がある。このような小片は、人工授精後約2～3時間で腔粘液から確認されることも稀ではなく、これは腔と子宮頸部の触診により、子宮腔から少量の滲出液が排出されるためである。こういった場合でも人工授精を実施し、人工授精の翌日に子宮内治療薬を投与することは可能である (例: Metricure[®]の単回投与)。胚は卵管内で保護され、5日目前後によく治療された子宮に到達する。

産褥期後期 (分娩後21日目以降)に子宮感染症を治療する際は、臨床兆候の重症度と卵巢活動に基づく治療戦略が必要である (図18)。



図18 牛の子宮内膜炎治療方針の決定木の例

黄体の存在を伴う子宮内膜炎の場合は、PGF_{2α}注射と子宮内抗生物質の併用が最良の選択肢とされている。黄体退行が誘起されることにより、プロゲステロンの免疫抑制効果が消失し、子宮の緊張度が改善される。広範な抗菌スペクトラムを有する抗生物質を子宮内投与することにより、炎症プロセスを引き起こす細菌感染が除去されるだけでなく、細菌が子宮腔に一部残存し次の黄体期に増殖することにより生じる子宮内膜炎の再発が回避され、結果として子宮内膜が再生される(Lewis 2004)。

子宮疾患の治療と予防にPGF_{2α}を標準的に使用すること

PGF_{2α}は、分娩後の標準的投与では予防薬のひとつとして用いられてきただけでなく、子宮炎と子宮内膜炎両者の治療に数十年間にわたって使用されてきた。周知の通り、外因性PGF_{2α}が誘起する黄体退行により血中プロゲステロン濃度は減少し、その免疫抑制効果の消失とともに子宮自体による感染除去が可能となる(Murray et al. 1990; Lewis 1997; Heuwieser et al. 2000)。活性黄体不在下の臨床型子宮内膜炎治療を目的とするPGF_{2α}の治験では、一致する結果は得られていない(Sheldon and Noakes 1998; LeBlanc et al. 2002b; Mejia and Lacau-Mengido 2005)。しかし Lewis (2004) は、子宮内膜炎に対するPGF_{2α}投与は、活性黄体が存在しない場合にも、PGF_{2α}が子宮免疫防御の機能に直接有益作用をもたらすことにより、ある一定の利益が得られることを示唆している。

上述の通り、PGF_{2α}と子宮内抗生物質の併用は、感染除去とその後の黄体期中の再発を予防する上で、最良の解決策であると考えられる(Lewis 2004; Kasimanickam et al. 2005; Sheldon et al. 2006; LeBlanc 2008)。

しかし、主張されている産褥期早期の機能的黄体不在下でPGF_{2α}を標準的に使用することの価値については、これまで多くの議論が交わされてきた。子宮修復速度の亢進、子宮からの細菌と残屑の排出、そしてその結果得られる受胎率改善を得る上での、外因性PGF_{2α}の有効性については相反する結果が報告されている。PGF_{2α}を黄体存在下で投与した場合には、より一貫した効果が得られるはずである。たいていの牛では、その時期は分娩後約17～24日である。多くの臨床獣医師は、分娩後の特定時期にPGF_{2α}投与することで黄体退行が起こる結果、子宮環境が正常濃度のプロゲステロンに曝露される期間が短縮し、子宮の細菌感染への感受性が低下すると信じている。これまで発表された研究の多くでは、そのような治療の明確に目に見える効果の実証されていない(Burton and Lean 1995 (メタ分析); Hendricks et al. 2006) 反面、他の研究では子宮の問題の減少と繁殖性の

改善が示されている (Etherington et al. 1994; Nakao et al. 1997; Fernandes et al. 2008a; Fernandes et al. 2008b)。

子宮蓄膿症は、慢性子宮内膜炎の特定の形態と見なすことができ、黄体遺残と子宮頸管閉鎖を特徴とする。子宮の感染症への抵抗力は、プロゲステロン優位期に低下する：

- pHの低下により、一般的な子宮病原体にとってより好適な状態となる
- 白血球活性が遅延し減少する
- 子宮分泌液に解毒作用はない

子宮蓄膿症の症例では、子宮からのPGF_{2α}放出が不十分なため、黄体退行は誘発されない。そこでこの病態の治療に、PGF_{2α}注射が用いられる。黄体が退行し、続いて新たな卵胞が成熟する。子宮の収縮性が増し、子宮頸部が弛緩し、膿様物質は排出される。ホルモンバランスの変化(エストロゲン増加/プロゲステロン減少)は子宮の自己防御機構を刺激する。しかし、この治療の結果はその実施時期に大きく依存し、再発が頻繁に見られるため、治療牛の厳密なモニタリングが必要な点に注意すべきである。そのため、初回投与の12～14日後に2回目のPGF_{2α}注射を実施することが強く推奨される。子宮内膜が回復すれば、授精を開始できる。それまでには、通常4～8週間かかる。子宮内抗生物質療法(Metricure[®])を加えることもできる。

子宮蓄膿症の破壊的特性の観点から、子宮内注入を行う場合は、子宮内膜のさらなる破壊を防ぐため、刺激性のない方法で行うことが必要である。

膣炎

若雌牛において、膣炎は自然交配後に非常によく見られ、通常は治療を必要としない。成牛での膣炎は環境感染に起因したものであると考えられ、容易に子宮内膜炎に発展し得る。この2つの病態は、区別が困難な場合が多い。非妊娠牛である場合は、子宮内膜炎として治療するのが最良の選択である。予防は、衛生状態を改善することに基づいていなければならない。多くの特定の感染症は、膣炎および/または子宮内膜炎を伴う。流産の項を参照のこと(2.4.8)。

2 牛の繁殖

2.4.4 無発情

乳牛の発情が分娩後60日目までに観察されない場合、実際に発情の周期性の有無を問わず、その状態は分娩後無発情(PPA; post partum anestrus)と定義される。

誤解を避けるために、発情に関する定義をいくつか紹介する:

無発情	発情を開始していないため(発情周期を示していない)、または発情が発見されていないため(発情周期を示している)、牛の発情が観察されていない。
真の無発情	卵巣が活動していないことにより発情しない。
鈍性発情	正常な周期活動が認められるが、発情行動が微弱であるか存在しない、または観察が不十分であるため発情が観察されない。

発情周期を示している牛

鈍性発情 subestrus

分娩後の無発情の報告例は、多くの場合鈍性発情、または発情の見落としによるものである。牛の正常または微弱な発情行動が発現している場合、または発情行動が全く見られない場合を含んでいる。これらを区別することは、実際には不可能である。対策は第一に、発情発見の改善に基づく必要がある。観察すべき徴候の理解、十分な観察時間、十分な観察頻度、個体の明確な識別、適切な繁殖記録、そして可能であれば生乳中プロゲステロン濃度測定キットの使用について検討すべきである。発情発見の項を参照のこと(2.2.4)。

PGF_{2α}、GnRH、または合成黄体ホルモンの使用による発情と排卵制御により、管理者が発情発見を期待する時期が限定され、発情発見の問題が一部改善できる場合がある。発情コントロールの項を参照のこと(2.3)。

発情周期を示さない牛

真の無発情 true anestrus

分娩後の発情周期活動の再開は、栄養、牛体のボディコンディション、哺乳、泌乳、難産、種、年齢、季節、子宮病理、および併発疾病により影響を受ける。管理が行き届いた乳牛群の大半では、分娩後40日目まで排卵が起こらないのは10%以下である。肉牛群では、哺乳、栄養、季節等の抑制効果により同割合が60%に上ることがある。分娩後無発情の持続期間は、

卵胞波の発現ではなく、むしろ卵胞の逸脱および/または主席卵胞の運命により決定される。

超音波検査の使用と牛の卵胞動態について深まりつつある知識を利用して、Wiltbank et al. (2002)は無排卵状態について次の分類を提案した:

1. *卵胞の発現段階まで卵胞発育がある無排卵*

この形態の無発情では、非常に小さい卵胞が認められ、発現段階までは発育を続けるが、その後は発育が停止する。同著者らは、この形態の無発情は、FSH放出が相対的に不足した状態に関連していると推測している。

2. *逸脱が起こる段階まで卵胞発育がある無排卵*

この形態の無発情では、卵胞発育は発現と逸脱の過程を経るが、排卵までは継続しない。この形態の無発情は頻繁に報告されている。春機発動前のすべての牛において発生すると考えられる。また、一般的に産褥期の泌乳牛と授乳肉牛で発生する。特徴的な所見は、卵胞は逸脱の段階まで活動的な卵胞波パターンで発育を続けるにも拘わらず、黄体も、排卵の大きさに至る卵胞もない小さな卵巣である。根底にある生理学的な問題は、エストロジオールのGnRH/LHパルスに対する抑制作用が、卵胞の最終段階までの成長や、逸脱後の主席卵胞によるエストロジオール産生を不可能にすることである。

3. *卵胞の逸脱、発育、および主席卵胞の確立を伴い、排卵には至らないものの、持続的な卵胞構造が達成される無排卵*

持続的な卵胞構造は、卵胞囊腫になる可能性、または排卵せずに黄体を形成(黄体囊腫)する可能性がある。

詳細は、2.4.5を参照のこと。

2.4.4.1. 牛における無発情治療

牛におけるさまざまな無発情病態の生理学的背景に対する理解を深めることが、根底にある内分泌障害に対処することになり、より満足の行く適切な治療へのアプローチを可能にする。

移行期(分娩前の3週間)と泌乳初期に最適な栄養を供給し、乳牛のエネルギー状態を改善することにより、LHパルスの不足を伴う無発情期間を短縮することができる。肉牛では、エネルギー状態の改善および/または子牛の哺乳頻度を低減することにより、LHパルスを増加させ、初回排卵までの間隔

2 牛の繁殖

を短縮することができる。ホルモン療法は、無排卵状態の牛に用いることができ、特に、乳牛ではエネルギー補給と、肉牛ではエネルギー補給および/または哺乳頻度低減と組み合わせた場合に効果的である。

卵胞発育が発現段階から先に進行しない無排卵状態(タイプ1)では、薬剤療法の可能性はかなり限られる。この状況は、放牧牛、特に熱帯で飼養される*bos indicus*種で頻繁に認められる。このような牛は多くの場合粗悪な飼料を摂取し、非常に過酷な気候条件に曝露されている。現場での経験から、GnRH類縁体を用いた療法は通常効果がないものの、FSHを用いた療法は卵胞成長を促進し得ることが示されている。卵母細胞/胚を得るためのドナー牛に複数排卵を誘起するために常用される、FSHを主成分とする製剤は比較的高価である。この種の無発情状態にある牛では、卵胞のさらなる成長を刺激するため、PMSG/eCG(Folligon®等)で様子を観察しながら投与する場合もある。処置牛の栄養状態が抜本的に改善されない場合、成功の可能性はかなり低いことは間違いがない。

卵胞発育が逸脱段階まで至る無排卵状態(タイプ2)は、高泌乳牛や、ボディコンディションが比較的良好な授乳肉牛で特に多く見られる。いかなる薬剤療法を実施した場合にも、LHパルスの欠如に起因する無排卵期間を短縮するための基本的手段は、移行(クローズアップ)期間中および泌乳初期に、最適な栄養供給によりエネルギー状態を改善することであると考えられる。加えて、疾病状態は最小限に抑えるべきである。無排卵状態の泌乳牛の多くは、薬剤療法刺激によるLHサージに反応できる、十分な大きさの卵胞と排卵能力を有しているため、通常のオブシンク法により効果的に治療できる。一方、肉牛の場合は、子牛の一時的な離乳と組み合わせた黄体ホルモン投与が好んで用いられる。Vasconcelos et al.(2009)は、無発情の*bos indicus/bos taurus*混血種で、一時的な離乳とプロゲステロン放出装置の使用による結果を比較した試験を報告した。同報告では、一時的な離乳を単独で実施した場合には発情行動の発生が増加するだけであったのに対し、プロゲステロン放出装置の単独使用は受胎率の向上に有益であることを示した。その両者を併用したことにより、発情行動と受胎率に直接効果がもたらされ、受胎率が改善した。

遺残主席卵胞または卵胞囊腫の形成につながる無排卵状態の治療については、2.4.5で説明する。

無発情牛に対する黄体ホルモンの使用

黄体ホルモン/プロゲステロンによる治療は、今や無発情牛に対する発情周期の誘発と発情管理、特に肉牛での発情管理において、より好まれる選択肢とされている(総説: Yavas et al. 2000a,b; Peter et al. 2009)。無発情を治療するためのプロゲステロンまたは黄体ホルモンの使用が有益であるのは、排卵により発情周期を開始させ、その後、正常期間の黄体期を促進するからである。これまでの最良の結果は、プロゲステロンまたはノルジェストメット(Crestar[®])のような黄体ホルモンによる治療開始時に、エストラジオール注射を併用した場合に得られている。

PMSG/eCG (Folligon[®])注射は、プロゲステロン治療期間後に使用できるが、これは無排卵および無発情牛での発情および排卵を誘起するためのCrestar[®]システムに不可欠な部分である。

経直腸的超音波断層法を連日使用したRhodes et al. (2002)は、少量のプロゲステロン処置を受けた無発情牛では、発情周期の開始後に処置を受けた牛で見られるような遺残卵胞の発現が認められなかったと報告した。したがってこのような牛群で、プロゲステロンまたは黄体ホルモンの単独処置により満足のいく結果を得ることは可能であるはずである。

また、プロゲステロン治療の開始時にGnRH類縁体を用い、主席卵胞の退行を誘発し、新たなコホート(選択可能卵胞群)の発現を同期化することもできる。この療法は、大半の牛において排卵の誘発と黄体形成をもたらす付加作用を有し、GnRH非処置牛と比較して、血漿中プロゲステロン濃度を上昇させる(Xu et al. 2000)。この療法では、プロゲステロン放出装置の除去後に黄体組織の不在状態を確実にするため、通常PGF_{2α}を投与する。エストラジオールは、プロゲステロン処置後に排卵を刺激し発情を発現させるため、特にニュージーランドで使用されていたが、近年このクラスのホルモン使用が禁止されたことにより、その実施は禁止にされるに至った。

重度の無発情状態の授乳牛では、プロゲステロン/黄体ホルモン除去時の一時的な離乳(子牛を母牛から48時間離す)により、さらなる卵巣刺激が得られる。

GnRH類縁体とプロスタグランジンの併用

LHによる刺激に反応する卵胞が卵巣に存在する場合には、分娩後の無排卵・無発情期間中に排卵を誘発するGnRH誘導体の能力により、オブシーク等のプログラムによる牛の無発情治療が可能となる。この療法と母牛からの子牛分離の併用が、無発情の肉牛および発情周期を再開した牛でのノルジェストメットインプラントおよび吉草酸エストラジオール注射と比較された。過去に無発情だった牛では、いずれの治療でも受胎率に差は認められず、オ

ブシンク法による治療前に発情周期を再開した牛で得られた受胎率と同等であった(Geary et al. 1998)。

無発情の放牧乳牛では、オブシンク法を利用した場合の初回授精による受胎率と受胎までの期間中央値が、CIDR® 装置および安息香酸エストラジオールによる治療を受け発情観察時に人工授精を行った牛と同等であった(McDougall et al. 2001)。しかしながら、オブシンク法により得られる受胎率は、発情周期を再開した牛と比較して低いものの、これらの結果はオブシンク法が、発情発見が困難な状況での無発情牛の治療に有益である可能性を示唆している(Cartmill et al. 2001)。

ホルモン療法により、さまざまな生理的状态を超えて、初回排卵までの間隔を効果的に短縮し、発情を同期化することができる。しかし、治療に対する反応は群間および群内で一様ではなく、年齢、ボディコンディション、および分娩からの経過期間など、無発情の発生率に影響を及ぼす要因に依存していると考えられる。ボディコンディションが低下した分娩後の無発情牛では、用いた療法に拘わらず、多くの場合、発情応答率と受胎率のいずれとも期待に反したものとなる。

子宮感染症が卵巢活動の再開遅延に関連することが示されたことから考えると(Opsomer et al. 2000; Sheldon et al. 2004a; Sheldon and Dobson 2004)、無発情牛では、子宮内膜炎の徴候の有無を常に確認する必要がある。

黄体遺残と子宮蓄膿症

黄体遺残には、一般的に子宮疾患が伴い、黄体退行に必要な十分量のPGF_{2α}放出が阻まれる。上述の通り、しばしば子宮感染症を伴う異常な黄体活動は、一般に高泌乳牛群内で(Shrestha et al. 2004)、特に一年のうち温暖期に多く認められる(Kornmatitsuk et al. 2008)。治療は、主に外因性PGF_{2α}を投与し、遺残黄体の退行を誘起する。これにGnRH投与を併用して、新たな卵胞波からの主席卵胞の排卵を誘起した後人工授精を行うことも可能である。

卵巢囊腫

無発情は卵巢囊腫の症状である可能性がある。詳細は、卵巢囊腫に関する項を参照のこと(2.4.5 卵巢囊腫)。

2.4.5 卵巣嚢腫

従来から卵巣嚢腫は、機能的黄体が不在で10日以上遺残する無排卵の卵胞構造(直径25mm超)と定義され、異常な発情行動(不定期な発情間隔、思牡狂あるいは無発情)を伴い、超音波検査を使用した最近のデータは、通常卵胞の直径が17mmとなった時に排卵が起こることを示しているため、その直径を超えて遺残する卵胞は「嚢腫」と見なし得る(Vanholder et al. 2006a)。「卵巣嚢腫」よりもむしろ、「卵胞嚢腫」が一般的に使用されるのはこのためである。

卵胞嚢腫は、乳牛に最も多く見られる繁殖障害で、乳牛の約6~19%で発症する(Garverick 1997)。初回排卵前に「卵巣嚢腫」を発現する牛の約60%で、卵巣周期が自然に再開するため、産褥期早期での発生率はおそらくはるかに高率であると考えられる(Ijaz et al. 1987)。卵巣嚢腫の経済的影響は、空胎日数への影響とその他のコストの関数である。卵胞嚢腫発生1件当たり、空胎日数が22~64日延長し、乳生産量減少と獣医療費増大により137米ドルのコストが増加すると推定されている(Silvia et al. 2002)。

卵巣嚢腫の発生を単一な原因のせいにすることはできないが、高泌乳、季節、ストレス、および負のエネルギーバランスはすべて要因であると考えられる。胎盤停滞、乳熱、および子宮内膜炎などの分娩後に起こり得る問題は、すべて卵巣嚢腫発生リスクの増加に関連している。卵巣嚢腫に遺伝的背景があることを示す根拠も存在する。また、卵胞嚢腫の遺伝的素因の存在に加え、嚢腫と泌乳特性との遺伝相関も確立されており、これは生産パラメータに基づく牛の選定を継続することにより、卵胞嚢腫の発生率が増加することを示している。栄養的な因子には、 β -カロチンの不足とフィトエストロゲン(植物性エストロゲン)がある。

栄養欠乏(負のエネルギーバランス、NEB)は、産褥期早期での嚢胞性卵胞の形成に寄与する最も重要な因子の1つと考えられている。さらに、卵胞嚢腫の発生率と、NEBの重症度や持続期間の間にも関連があると考えられている(Vanholder et al. 2006a)。分娩後の乳牛では、血清ケトン体濃度の上昇により嚢胞性卵胞形成のリスクが増加するが、*in vitro* でケトン体は牛卵胞細胞への悪影響は認められなかった(Vanholder et al., 2006b)。したがって、分娩後の乳牛でのケトン体濃度は、NEBによる悪影響を卵巣レベルで繁殖に与える因子というよりも、NEBの重症度の指標であると考えられる。

卵胞囊腫の形成は、卵巣/卵胞レベルおよび視床下部/下垂体レベルの両者の機能障害に起因するようである。嚢胞性卵胞形成の原因として、最も広く受け入れられている仮説は、視床下部-下垂体からのLH放出の異常である。つまり、排卵前LHサージの不在、振幅不足、あるいは主席卵胞の成熟段階の不適切な時期に生じたことに起因するという考えである。

視床下部-下垂体に対するエストロゲンの正のフィードバック機構の異常により、GnRH/LH放出の異常、排卵障害、および嚢胞形成が生じ得ると考えられている。卵胞の発育中、すなわち未成熟な段階でGnRH/LHサージが発生(すなわち卵巣に排卵可能な卵胞が存在しない時点で発生)することにより、視床下部をエストロジオールのフィードバック作用に対し無反応にし得ることから、嚢胞性卵胞が形成されることになる。

フィードバック機構とGnRH/LH放出の異常は、視床下部-下垂体レベルでの因子の介入に起因すると考えられる。

この知見に基づいて、Silvia et al.(2002)は、牛での卵胞囊腫の原因について新たなモデルを提案した。卵胞囊腫は、エストロジオール濃度の排卵前上昇に反応して発生するはずの排卵前LHサージの欠如により発生する。その主な原因は視床下部にあり、同器官がエストロジオールによる刺激への応答として放出すべきGnRHサージを放出しないことにある。視床下部のエストロジオールに対する非感受性は、循環プロゲステロン濃度が中等度(黄体形成に満たない)であることにより誘発される可能性がある。プロゲステロンを中等度(0.5~2 ng/ml)レベルで投与した場合、LHサージが遮断されるとともに排卵が阻害され、正常な主席卵胞よりも直径が大きく、より持続性の高い卵胞形成につながる(Hatler et al. 2003)。この概念は、発情同期化に使用されるさまざまなプロゲステロン放出装置により得られるような、低用量プロゲステロン治療により、遺残主席卵胞が形成されるという発見により実証された。

卵胞レベルでの原発性機能障害が、視床下部・下垂体・性腺軸を破壊し、これにより卵胞囊腫が形成される可能性がある。LH受容体の発現と含量の異常が、卵胞の無排卵を引き起こす可能性も考えられる。その他、主席卵胞によるステロイド産生の異常もまた嚢胞変性に関与すると考えられている。

囊腫は、肉眼的には卵胞または黄体のように見えるが、これらは異なる形態の同一の障害と考えられる。黄体囊腫は、排卵の誘発には不十分であるが、卵胞壁の黄体形成を誘発できるLH濃度の存在下で発生すると考えられている。黄体囊腫は無発情に結びつくが、牛の行動のみに基づいて卵胞囊腫と黄体囊腫を区別するのは不可能である。黄体囊腫の壁はやや厚み

があるが、直腸検査によりその差異を検知できるのは、少数の熟練した臨床獣医師のみとみられる。生乳中または血漿中の高プロゲステロン濃度は、黄体囊腫の存在を示唆する。黄体囊腫と、まったく病理学的異常のない空洞を持つ囊腫様黄体 (hollow corpora lutea) とを混同しないよう注意が必要である。

卵巢囊腫に伴う臨床徴候は、かなりのばらつきがある。無発情は最も一般的な臨床兆候であり、特に産褥期に見られる。エストロゲン活性を有する卵胞囊腫の存在を示す他の徴候としては、不定期な発情間隔、思牡狂、広範囲の骨盤靱帯の弛緩、および雄性の身体特徴の発現が挙げられ、泌乳後期に認められることが多い。黄体囊腫では、ほぼ常に無発情である。

牛での囊胞性卵胞治療

比較的高い自己治癒率にも拘わらず、卵巢囊腫の発症は、診断されながら治療をしない場合、分娩から受胎までの間隔を最大で64日間延長し、泌乳期当りの経済損失は、55ドル～160米ドルに上ると推測されている (Bartolome et al. 2005d)。

GnRH (Receptal[®], Fertagyl[®]; 5.0ml) の投与は、治療の選択肢である。これは、下垂体を刺激し、LHおよびFSHを放出させる。これにより誘発されるLHサージは、囊腫性卵胞の黄体形成を誘導する。囊腫の種類により、またおそらくはGnRHの用量によって、一部の囊胞性卵胞の排卵が誘起される可能性がある。さらに、GnRHにより誘発されるFSH濃度の上昇は、多くの場合正常な周期を回復させる卵胞波の動員を引き起こす。治療後、牛の60～80%は注射後18～23日目に発情を示す。望ましい結果が得られるのは、囊胞性卵胞の物理的な除去によってではなく、新たな卵胞波による卵胞の正常な入れ替わりと排卵の誘起によってであることを認識することが重要である。この理由から、用手による囊胞破裂は、多くの場合周期性の回復につながらない。さらに、囊胞の経直腸による用手破裂は、繊細な卵巢組織に損傷を与え、癒着を誘発するリスクが非常に高いものである。

卵胞と黄体の囊胞はいずれも、この種の治療に同様な反応を示すため、両者を区別する必要はなく、同著者らは総じて、GnRH投与がいまもって、大半の卵巢囊腫牛に最適な初期治療であることに同感である。hCG (Chorulon[®]; 3000 IU) の静脈内投与も、考え得るもう1つの選択肢である。hCGは、強力なLH活性を有するゴナドトロピンである。牛でのhCGの半減期

はほぼ2日であるため、長時間にわたり直接嚢胞に黄体刺激作用を及ぼし、しばしば再発症例に用いられる。

さまざまな研究で、卵胞のエフェクター細胞が十分な量のプロゲステロンに事前に曝露されることが、さらなるゴナドトロピンの刺激への感受性確保のために不可欠であることが示されている。したがって、プロゲステロンまたは黄体ホルモンの使用は、卵胞嚢腫の合理的な治療法であり、単独投与においても、GnRHとの併用投与においても、非常に有望な結果をもたらしている (Calder et al. 1999; Todoroki et al. 2001; Ambrose et al. 2004)。

空胎日数を減少させ、卵巣嚢腫の発生率を低減するために、GnRH/プロスタグランジンをベースにするシステムが White et al. (1996)により提案され、さらにLopez-Gatius and Lopes-Bejar (2002)により検証された。この療法では、分娩後30～90日目で使用でき、嚢腫検出時にGnRH (Receptal[®], Fertagyl[®])を投与し、9日後にPGF_{2α} (Estrumate[®])を投与する。

GnRHにより嚢胞の黄体形成が一度誘発されると、黄体組織が治療9日目までに発現する。その結果形成される黄体は、その後のPGF_{2α}処置に反応し、新たな発情周期が開始される。

Bartolome et al. (2000)が実証した通り、この方法に替えて、古典的オブシンク法により泌乳牛の卵巣嚢腫を治療することも可能である。同著者らは、オブシンク法による排卵の同期化と定時授精により、発情同期化と処置後7日以内に誘起された発情時に授精を実施した場合と同様の受胎率が得られたことを報告した。Bartolome et al. (2005b)、De Vries et al. (2006) および De Rensis et al. (2008)がさらに調査した結果、オブシンク型の療法が乳牛の卵胞嚢腫の治療に適していることが確認された。

GnRHまたはhCG処置後23日以内に発情しない牛については、検査およびその結果に応じた治療が必要である。14日以内に発情徴候を示す牛についても、これは初回注射に反応できなかったことを意味するので、同様に処置する。

卵巣嚢腫の予防には、この病態に寄与する要因(周産期のストレス、栄養不足、および子宮感染症)を特定し除去することによってアプローチできる。また、分娩後14日目のGnRH投与は、卵巣嚢腫の発生を減少させることが示されている (Britt et al. 1977)。下垂体は、分娩後12～14日まではGnRHにตอบสนองしてLHを放出する能力がないため、それ以前の投与に効力は期待できない。

PGF_{2α}療法は、黄体嚢腫を有する牛の治療にも用いられる。しかし、その反応と治癒率は、黄体組織の存在と、嚢腫が実際に黄体由来であるという診断の精度に依存する。直腸からの触診は黄体嚢腫と卵胞嚢腫の識別手段として不正確であると報告されていることから、診断はプロゲステロンの血漿濃度もしくは生乳中濃度、または超音波画像診断装置の使用に基づいて行うことが望ましい。

2.4.6 胚死滅

受胎から妊娠45日までの期間は胚形成期として知られている。その後は胎子期と呼ばれ、分娩まで持続する。胚死滅は、牛の繁殖障害の主要な原因のひとつと見なされており、受胎率低下、遺伝的改良の減速、および乳牛および肉牛生産での相当な財政損失につながっている。

最近の推定値は、米国における高能力牛群の妊娠の平均価値は278米ドルであるのに対し、妊娠損失によるコストはその額を大幅に上回ることを示している(De Vries 2006)

牛の受精成功率はおよそ90%で、胚死滅は受精後の損失の29～39%を占めており、そのほとんど(推定70～80%)は受精後8～16日目に発生することが一般的に認められている(Roche et al. 1981; Dunne et al. 2000; Diskin and Morris 2008)。

超音波画像診断装置が出現したことにより、牛では人工授精後25日目からの正確な妊娠診断が可能となり、これにより妊娠の母体認識後の胚死滅に関する研究が促進された。この後期胚死滅の頻度は約7%と推定されている。後期胚死滅の発生頻度は早期死滅に比べ大幅に低いものの、深刻な経済損失を招く重要な原因であることに変わりない。これらの胚死滅が特に深刻なのは、季節的に繁殖される群で、繁殖期後期に胚を失った牛は再授精されずに、繁殖障害を理由に淘汰処分されることになるためである。

胚死滅 embryonic mortality という用語は、受精から約42日目の分化段階完了までの期間に発生する損失に適用される。

早期胚死滅、すなわち15日目以前の胚死滅は、発情周期の長さに影響しない。この時点以降に胚が死滅した場合、黄体退行時に牛が発情を示すため、周期が延長することになる。後期胚形成期(34～45日目)の胚死滅は診断可能な場合がある。場合によっては、胚と胎膜は体外に排出され、その残余物は高い頻度で再吸収される。長期にわたる黄体遺残により、発情

の回帰が遅延することがある。通常、この状態を示す唯一の明確な徴候は、人工授精後35～40日までの発情行動の再開が遅延することである。

胚死滅に影響を与える因子として、以下が挙げられる：

- 種雄牛と雌牛両者の生来の繁殖性
- 胚の染色体異常
- 牛の年齢
- 子宮の異常(例：子宮内膜炎)
- 直腸検査による胚への損傷(例：妊娠診断時)
- 発熱を伴う疾病
- 暑熱ストレス
- 人工授精の遅延(卵子の生殖力低下)
- 黄体機能の不足

牛体内の妊娠認識機序

正常な発情期間中には、オキシトシンとPGF_{2α} が関与する効率的なメカニズムにより、迅速な黄体退行と新たな発情周期の開始が確実に起こる。黄体により産生されるオキシトシンは、子宮内膜内の特定のオキシトシン受容体と結合し、子宮内膜細胞からのPGF_{2α} の放出を刺激する(Silvia et al. 1991; Wathes and Lamming 1995; Mann et al. 2001)。そしてPGF_{2α}が血流に放出され、卵巣に到達し、黄体退行を引き起こす。発育している卵胞により産生されるエストロゲン濃度は高くなり、オキシトシン受容体の発現を刺激する。

黄体を継続させ、妊娠を維持するためには、効果的な妊娠認識機序の進行が必要である。すなわち、発育中の胚から、黄体退行を防ぐための特定のシグナル発信が必要となり、これがない場合、発情周期の終盤に黄体退行が誘発される。牛および羊の胚は、特有の妊娠蛋白質であるインターフェロン- τ (IFN- τ) を産生し、放出することが実証された(Farin et al. 1989; Mann et al., 1999)。IFN- τ による黄体退行の抑制メカニズムは、今日では十分に確立されており、子宮内腔上皮でのオキシトシン受容体の抑制(Robinson et al. 1999)とPGF_{2α}合成抑制因子の誘発(Thatcher et al. 1995)が関与している。牛では、IFN- τ のmRNAが、約12日目にその主要産生部位である栄養外胚葉で検知され、15～16日目に最高濃度に達する(Farin et al. 1990)。まず14～16日目の子宮洗浄液において、有意な量のIFN- τ が検出可能であり、これは胚の伸長開始の時期と一致する(Mann et al. 1998)。

胚発育の遅延が発生した場合、または胚の成長と母体の発情周期の進行が同期的でない場合(例: 排卵遅延または遅すぎる人工授精)、IFN- τ の産生量不足または産生の遅延が生じ、黄体退行抑制が妨げられ、胚が死滅する。遅延した排卵により放出された卵母細胞の受精に起因する、胚のIFN- τ 分泌障害の主要な理由は、卵胞優位性の長期化に伴う卵母細胞の老化プロセスであるとされている。この長期化および排卵の遅延により、卵母細胞内で早期成熟による変化が発生し、これにより受精率および発育能力が低下すると議論されている。一方、胚の発育不良は、IFN- τ の産生量の低下、黄体退行の抑制不全、および胚損耗に結びつく(Mann et al. 1996, Mann et al. 1998)。2.3.3で述べた通り、授精後早期のプロゲステロン濃度上昇、胚発育、および胚によるIFN- τ 産生は、密接に関連している(Kerbler et al. 1997; Mann et al., 1999; Mann et al. 2001)。

図19は早期胚形成期での胚と牛との相互作用と妊娠認識の図解である。

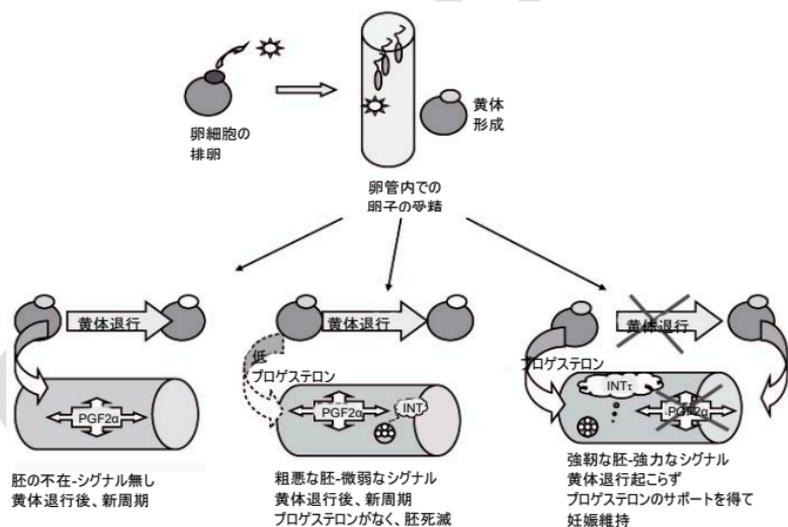


図19 牛体内における妊娠認識に先立つ母体と胚との相互作用

2 牛の繁殖

早期胚死滅を防ぐための薬剤療法

牛の受胎率改善を目的とする戦略や薬剤療法のうち、現在最も広く用いられているものは、次の2つのグループに分類できる：

1. 排卵遅延の予防
2. 早期黄体機能の支援と早期黄体退行の予防

早期胚死滅の発生を減少させるための薬剤療法については、2.3.4.を参照のこと。

2.4.7 リポートブリーダー牛

リポートブリーダー牛は、正常な発情周期を示し、臨床的異常が認められず、かつ少なくとも2回(わが国では、3回と定義されている)連続して人工授精後不受胎だった牛と定義されている。実際には、これらの牛の中には、不適切な時期に授精を受けていた牛もいると考えられる。また、触診が困難な嚢腫または卵管に病変を持っていたり、未診断の子宮感染症に罹患している場合もある。

交配を繰り返しても受胎しない、低受胎の病因には他に以下の3つが考えられる：

- 潜在性子宮内膜炎
- 排卵遅延
- 黄体機能不全

詳細については、2.4.3と2.3.4を参照のこと。

2.4.8 流産

牛流産は、妊娠45～265日目までの胎子死亡とその排出と定義されている。

流産は、繁殖に関する損失のなかでも重大な原因のひとつであり、牛群で大規模な流産が生じた場合、経済的な影響は甚大である。さらに、牛での流産の原因となる感染性疾患のいくつかは、人獣共通感染症としてヒトに対する脅威ともなる。

年間の流産率が5%までであれば、正常範囲と考えられる。この数値には、妊娠2～3カ月の間に発生し、しばしば検知されないまま経過する流産は含まれていない。流産率が10%を超えれば、当該農場で流産が蔓延していると

考えなければならない。流産の原因の診断は困難である場合が多く、残念ながら原因が特定できるのは全体の20～30%程度である。原因特定がうまく行かないのは、診断に適した検体試料が欠如しているか、検体試料の質が粗悪であるためである。牛の場合、重大な原因の一つは、しばしば胎子死滅が起こってから排出されるまでの期間が長引く点である。排出に至る前に自己融解が速やかに進行するが、これが診断用検体の質に大きく影響することがある。血清学的診断は、多くの場合不適切である。感染性および非感染性、あらゆるカテゴリーが原因となる流産が報告されている。

非感染性の流産原因としては、外傷、妊娠牛への誤った授精、高体温（発熱を呈している）といった身体要因がある。牛では、稀に栄養学的要因が流産の原因となり得る。重篤なビタミンA欠乏症の牛群で、流産率の上昇が認められる場合もある。複数種の植物毒、カビ毒に加え、硝酸塩/亜硝酸塩や鉛、カドミウムなどの無機毒も流産の原因となり得る。医原性の流産は多くはないが、特に個体の識別が杜撰で治療記録の不適切な群で、また非妊娠牛と誤診された際に、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ や糖質コルチコイド投与により流産が起こったとの報告もある。

牛における感染性の流産原因としては、さまざまな細菌性、ウイルス性、および原生微生物が挙げられる（Anderson 2007）。

中には、遺伝的異常や発育異常が胎子死亡や流産の原因となり得ることも留意する必要がある。これには、いわゆる牛複合脊椎形成不全症（CVM）や軟骨形成異常症（ブルドック子牛）、その他さまざまな染色体異常が含まれる。

表14に、牛のさまざまな流産原因をまとめた。これらは最低限のものであり、すべてではない。

2 牛の繁殖

表 14 牛流産の鑑別診断

非感染性	感染性
遺伝子異常: 染色体異常 催奇形性植物: ルピンを含む植物(キバナハウチワマメ)、キク科セネキオ属	ウイルス: 牛ヘルペスウイルス 1 型 (BHV1) 牛ヘルペスウイルス 4 型 (BHV4) 牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV) パラインフルエンザ 3 ウイルス(PI-3) バルボウイルス
栄養学的問題: 毒性植物 硝酸塩中毒 植物エストロゲン ヨード欠乏 ビタミンA 欠乏 セレン欠乏 鉛中毒 カドミウム中毒	細菌: <i>Brucella abortus</i> <i>Campylobacter foetus</i> <i>Chlamydia psittaci</i> <i>Leptospira hardjo/pomona</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococci</i> <i>Streptococci</i> <i>Salmonella dublin/typhimurium</i> <i>Pasteurella</i> 属、 <i>E. coli</i> 等
ストレス: 動物の粗暴な取扱い 高気温 外傷 手術 乾乳処置 不安 ワクチン接種	原生動物: トキソプラズマ原虫 <i>Sarcocystis</i> <i>Neospora caninum</i> <i>Trichomonas foetus</i>
その他: 多胎妊娠 授精操作 副腎皮質ホルモン投与 PGF _{2α} 投与 アレルギー 脱水状態	真菌: <i>Aspergillus</i> 属 <i>Mycoplasma</i> 属

牛の流産の診断検査に関する基本的情報

考えられる流産原因を詳細に調査するとともに、原因物質(特に感染性)を特定できる可能性を最大限得るためには、適切な検体および補足データの収集が不可欠である。理想としては、胎子および胎盤全体を検査室に提

供し、解剖学的、病理組織学的、および細菌学的評価を行うとともに、母牛の血清検体について血清検査を行うべきである。胎盤組織でしばしば特定の感染性病原菌が発見されるため、農場スタッフおよび臨床獣医師は胎盤を採取するよう最善の努力をすべきである。

病理組織学的検討に用いるホルマリン固定組織には、胎子の脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、胸腺、リンパ節、骨格筋、第四胃、小腸、眼瞼および胎盤が含まれる。

感染物質への曝露があったが、通常ではワクチン接種と自然曝露との判別が不能な場合（マーカーワクチンを使用した場合を除く）や、最近の感染と過去の感染との判別が不能な場合、流産牛のペア血清（同一牛からの急性期血清と回復期血清）検体が診断に役立つことがある。ワクチン未接種の牛の血清を検査する際、群内の複数の牛を検査する際、また各牛の既往歴を把握している場合に、血清学的検討が最も役立つ。

補足情報として、以下が必要である：

- 流産牛：年齢、生産ステージ、流産が起こった妊娠ステージ、流産前の臨床徴候、収容施設および管理状態の詳細（畜舎飼育または放牧）、ワクチン接種状況、流産後1～2週間以内に行った医療処置（特に薬物投与）
- 群：平均流産率、最近の流産増加の有無、これまでの流産数、群のワクチン接種スケジュール、最近の群全体に対する投薬、給餌内容と飼料変更、最近の群への牛導入

ブルセラ症、レプトスピラ症、リステリア症、サルモネラ感染症等、牛の流産を招く病原体に関連した、人獣共通感染症についても留意する必要がある。検体試料の採取および発送に際しては、適切な注意を払うがある。

表15に、最も重要な感染性原因による流産の主症状と、最も妥当と考えられる試料とするべき検体を列挙した。

表 15 主な感染症が原因の流産の症状

病原体、一般名称	流産率	流産の時期	流産再発の可能性	胎子の病変	検体
細菌					
Brucella abortus ブルセラ症 バング熱 人獣共通感染症	第1三半期または第2三半期に感染したウチン未接種牛の80%	妊娠6~9カ月 感染後2週間から5カ月で流産または死産	大半の流産は単回発生	胎盤: 停滞、胎子胎盤は壊死状で赤黄色、胎子胎盤領域は肥厚 胎子: 正常または自己融解状、気管支肺炎を伴う	胎盤、胎子、または子宮からの滲出液 診断: 母牛の血清学的検査、間接蛍光抗体法 (IFAT) による胎盤の抗体検出、細菌の分離
Campylobacter fetus venerealis ヒブリア症	> 10%	妊娠5~8カ月	稀に再発 感染耐過牛は感染に抵抗性を獲得	胎盤: 軽度胎盤炎、胎子胎盤は出血性、胎子胎盤領域は浮腫状、 胎子: 外観は新鮮または自己融解、軽度の繊維索性胸膜炎、腹膜炎、気管支肺炎	胎盤、胎子第四胃内容物、腔洗浄液 診断: 鏡検による検出、菌分離
C. fetus fetus C. jejuni	散発的	妊娠4~9カ月	稀に再発、感染耐過牛は感染に抵抗性を獲得	直上と同じ	胎盤、胎子第四胃内容物、腔洗浄液 診断: 鏡検による検出、菌分離
Leptospira interrogans 血清型は grippotyphosa、 pomona、hardjo、 canicola、および icterohaemorrhagiae 人獣共通感染症	5~40%	第3三半期、感染後2~5週間で流産	流産の原因となる血清型に対し免疫を有するが、他の血清型に対し感受性を有する	胎盤: 無血管性、薄黄褐色の胎子胎盤を伴うびまん性胎盤炎、胎子胎盤間領域は浮腫状で黄色調 胎子: 自己融解	胎盤、胎子 診断: IFAT により抗体を検出、またはPCR検査によりレプトスピラを検出
Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes	散発的	すべてのステージ	不明	胎盤: 内膜炎、びまん性胎盤炎、赤褐色から茶色を呈する 胎子: 自己融解、繊維索性心膜炎、胸膜炎、腹膜炎	胎盤、胎子 胎盤および第四胃内容物からの細菌培養により特定
Listeria monocytogenes 人獣共通感染症	通常散発性だが、50%に上ることもある	第3三半期	再発し得る	母牛: 発熱、食欲低下 胎盤: 停滞 胎子: 自己融解、繊維素付着を伴う多発漿膜炎、肝臓および/または胎子胎盤の白色壊死巣	胎盤、胎子 胎盤および第四胃内容物からの細菌培養により特定

病原体、一般名称	流産率	流産の時期	流産再発の可能性	胎子の病変	検体
真菌					
アスペルギルス属(60~80%)、ムコール属、アシディア属、リゾプス属	通常散発性だが5~10%に上ることもある	妊娠末期の4カ月、冬季に多い	再発し得る	胎盤:重度の壊死性胎盤炎 胎子胎盤は肥大して壊死、胎子胎盤間領域は肥厚し皮革様 胎子:自己融解、約30%で、主に頭部および肩部に灰色の輪瘡様皮膚病変	胎子、胎盤 診断:胃内容、胎盤、皮膚病変からの菌体の分離
原生動物					
Trichomonas (Trichomonas) foetus トリコモナス症	散発的	妊娠前半	感染後に免疫能を獲得するが、おそらく終生ではない	胎盤:停滞、軽度胎盤炎 出血性胎子胎盤、胎子胎盤間領域は肥厚し柔毛様滲出液で覆われる 胎子:特定病変なし	胎盤、胎子、腔/子宮分泌液 診断:第四胃内容物、胎盤液、子宮分泌液より検出
Neospora caninum ネオスポラ症	初回妊娠で、初回感染群の場合は高率 初回集団発生の場合 30%に上る 風土病: 5~10%	すべのステージ、特に妊娠5~6カ月目に高頻度	出産回数とともに減少するが、常に発症し得る	胎盤、胎子:特定の肉眼病変なし、自己融解 鏡検:限局性壊死性脳炎、非化膿性炎症、肝炎	胎盤、胎子(脳、心臓、肝臓、体液)、母牛の血清検体 診断:脳組織検体より抗原検出 組織検体の免疫化学的検査 抗体-PCR、ELISA
ウイルス					
牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV) 牛ウイルス性下痢・粘膜炎(BVD-MD)	通常低率	病態は複雑 通常4カ月までに流産	稀に再発 免疫が成立	胎盤:停滞、特定病変なし 胎子:特定病変なし、自己融解、ミイラ化	胎盤、胎子(脾臓が望ましい)、母牛および種雄牛の血清 診断:ウイルスの分離、胎子検体の免疫染色、PCR、または流産胎子の初乳未摂取抗体の検出

病原体、一般名称	流産率	流産の時期	流産再発の可能性	胎子の病変	検体
牛ヘルペスウイルス1型 (BHV 1) 牛伝染性鼻気管炎ウイルス (IBRV) 牛伝染性鼻気管炎 (IBR) 牛伝染性鼻気管炎 / 伝染性膿疱性陰門腔炎 (IBR-IPV)	ワクチン未接種牛で 5~60%	すべてのステージで起こり得るが、妊娠4カ月以降で最も高頻度	稀に再発 免疫が成立	大半の症例で、胎盤または胎子に肉眼病変を認めない 胎盤:壊死性血管炎 胎子:自己融解、肝壊死巣	胎盤、胎子、母牛の血清検体 診断:腎、副腎検体の免疫化学的検査、血清学的検査、PCR
ブルータンク・ウイルス ブルータンク	通常低率	不定	ほとんどなし	特定病変なし 胎子:自己融解	胎盤、胎子、母牛の血清検体 診断:ウイルスの分離
流行性牛流産 フットヒル流産の病原体は疫学的に明確に特定されていない。媒介動物—Ornithodoros coriaceusダニ	75%に上ることもある 主に米国カリフォルニア州で発生	通常第3三半期	ほとんどなし	胎盤:特定病変なし 胎子:肝腫大、脾腫大、全身リンパ節腫大、鏡検では脾臓およびリンパ節に著明なリンパ球過形成、臓器の大半で顆粒球による炎症を認める。	既往歴 診断:胎子のIgG増加
牛では非一般的な要因、または稀な発生					
Chlamydia abortus (Chlamydia psittaci血清型1) 流行性羊流産 人獣共通感染症	散発的	第3三半期終盤	ほとんどなし	胎盤:胎盤炎、胎子胎盤および胎子胎盤間領域は肥厚し黄褐色の滲出液が付着 胎子:新鮮、わずかに自己融解、肺炎、肝炎	胎盤、胎子 診断:胎盤、肺、および/または第四胃内容物からの分離
Ureaplasma diversum	通常散発的だが、集団発生の可能性あり	第3三半期	可能性あり	胎盤:停滞、胎子胎盤間領域は肥厚、非化膿性胎盤炎 胎子:肉眼病変なし、肺炎	胎盤、胎子 診断:胎盤、肺、および/または第四胃内容物からの分離
サルモネラ属	通常散発的だが、急な大発生の可能性あり	すべてのステージ	可能性あり	母牛:臨床的に病的 胎盤および胎子:自己融解、肺気腫	胎盤、胎子 診断:第四胃内容物および他の組織からの分離
他の感染性要因も牛流産の原因となる可能性がある。パラインフルエンザ 3 型ウイルス (PI3V)、マイコプラズマ属、Histophilus somni (Haemophilus somnus)、スタフィロコッカス属、ストレプトコッカス属、バクテリウム属、大腸菌、Toxoplasma gondii					

ネオスポラ症

Neospora caninum は、*Toxoplasma gondii* に近縁の寄生性原虫で、世界中で牛の繁殖障害の主要な原因のひとつであることが浮かび上がってきた (Dubey 2003; Hall et al. 2005; Dubey et al. 2007)。

現在までに、犬とコヨーテが *Neospora caninum* の終宿主として特定される一方 (Dijkstra et al. 2001; Gondim et al. 2004)、牛、山羊、羊、シカ、馬において、ネオスポラ症の臨床例が報告されている (Dubey 2003)。

この寄生虫の最も重要な中間宿主は、牛とみられる。多数の動物種で、ネオスポラ特異抗体の存在が示されているが、その大半で、血清反応陽性個体の予後ははっきりしない: 羊 (Dubey and Lindsay 1990)、山羊 (Dubey et al. 1992)、コヨーテ (Lindsay et al. 1996)、キツネ (Buxton et al. 1997)、ディンゴ (Barber et al. 1997)、パツファロー (Fujii et al. 2001)、アライグマ (Lindsay et al. 2001)、シカ (Tieman et al. 2005)、リヤマとアルパカ (Wolf et al. 2005)、ヨーロツパイソン (Gabaj et al. 2005) であった。最近の Sedlak and Bartova (2006) の発表によると、*N. caninum* の抗体が、動物園の動物 556 例中 31 例 (5.6%) で確認されている。これは、動物 114 種中 18 種に相当する: ヨーロッパオオカミ (*Canis lupus lupus*)、タテガミオオカミ、フェネック (イヌ科キツネ属)、チーター、ジャガー、ヨーロッパオオヤマネコ、インドライオン、フイッシャー (イタチ科テン属)、ブラックバック (牛科アンテロープ属)、ヨーロッパパイソン、リーチュエ (牛科ウオーターバック属)、アフリカパツファロー、エランド (牛科エランド属)、シタツンガ (牛科ブッシュバック属)、クチジロジカ、ヒガシエルク (シカ科ヘラジカ属)、ベトナムジカ、シフゾウ (シカ科シフゾウ属) であった。

妊娠牛での感染の予後は、感染時の胎子の月齢や母牛の免疫状態等の複数の要因に依存する。感染/寄生虫血症発生時の妊娠ステージが、疾患重症度の重要な決定因子である。妊娠第 1 三半期でのネオスポラ感染は、第 3 三半期での感染と比較して、胎子の予後が重篤となる場合がある (Innes 2007)。妊娠中の臨床的予後としては、胎子流産、時として神経学的異常を伴う虚弱な子牛の出産、臨床的に健常ではあるがネオスポラ感染の持続する子牛の出産が挙げられる (Innes et al. 2005)。

ネオスポラによる牛流産について、最も興味深く、しかしいまだ理解の不十分な側面の 1 つは、宿主、発育中の胎子、および寄生虫間の免疫学的関係である。各種サイトカインによって調節されている妊娠牛の免疫系は、妊娠中に重要な役割を果たし、これは、母牛が「半同種移植片」を維持する複雑なプロセスと見ることができる。妊娠状態を円滑に維持するため、胎盤内のサイトカイン環境では Th2 型サイトカインが優勢となり、このサイトカインは炎症誘発性の Th1 型免疫反応を抑制する役割を果たす。*N. caninum* に対

する防御免疫には、他の多くの細胞内寄生虫に対する反応と同様、Th1型の免疫反応が関与するが、これが妊娠中に感染を制御しようとする母牛にとって問題となることがある(Innes 2007)。Th1による過剰反応は、妊娠口を誘発する可能性があり、このため、ネオスポラに関連する流産プロセスのひとつの要素となり得る。

流産は妊娠中期、通常は4～6カ月の間に起こり、母牛に疾患の臨床兆候は認められない。流産胎子は多くの場合自己融解するが、肉眼病変は伴わず、胎盤の停滞も起こらない。診断には、脳、心臓、肝臓、胎盤、体液、血清が最も適している。複数の組織を検査した場合、診断率はより高くなるようである。ネオスポラの感染巣はさまざまな臓器で見られるが、最も一貫して見られるのは、胎子の脳である。最も特徴的なネオスポラ症の病変は、壊死および非化膿性炎症を特徴とする限局性脳炎である(Dubey 2003; Dubey et al. 2007)。

ネオスポラに感染した群は、流産が風土病と流行病の両方の様相を示す。最も重要な特徴は、この寄生虫が母牛の体内で慢性感染として生存し続け、これが妊娠中胎子に感染することである。群内での寄生虫感染経路について、2つの経路が考えられている。水平感染経路には、2つの宿主を有する寄生虫の生活環が関与する。牛はこの原虫のオーシストを摂食する事により感染し、そのオーシストは終宿主である犬から排泄される。胎子感染が流産に至らないことも多いため、生存した胎子は持続感染個体となるので、経胎盤性垂直感染も起こっている。そのような妊娠により生まれた若雌牛が妊娠した際に、流産することがある。羊のトキソプラズマ症と異なり、ネオスポラ感染胎子を流産した牛は、その後の妊娠において感染胎子を宿す可能性がある。

ネオスポラ感染による流産、死産、リポートブリーディング、繁殖障害が原因の淘汰率の上昇等は、施設全体の繁殖効率の低下を来し、大きな経済的損失を招くことになる。間接的コストには、診断検査に伴う獣医療費が含まれ、感染牛を淘汰する場合は代替牛導入の補充費も含まれる。

また、血清陽性群は陰性群と比較して乳生産量が低いとの証拠がある(Hernandez et al. 2001; Romero et al. 2005)。

診断は、流産胎子の病理組織検査および免疫組織化学検査、母牛または胎子の血清検査により行う[間接蛍光抗体法(IFAT)、酵素結合免疫吸着法(ELISA)、直接凝集検査(DAT)]。

これまでのところ、牛での *N. caninum* の性交感染の証拠はない。Serrano-Martinez et al. (2007) と Ferre et al. (2008) によって報告された研究は、実験的に *N. caninum* を感染させた雄牛の精液と血液中に *N. caninum* DNA が存在することを示した。彼らの観察は、感染の慢性期に少数の *N. caninum* が間欠的に精液中に存在していたことを示している。しかしながら、PCR陽性の精液を接種したマウスから原虫は分離されず、プールした精液を授精された若雌牛に特異抗体の陽転は認められなかった。感染伝播の面から、考え得る因果関係について今後充分な解明が必要である。

実験的に感染させたアカゲザルについては、*N. caninum* の垂直感染が可能であることが示されているが (Barr et al. 1994)、これまでのところ、*N. caninum* がヒトに感染し疾患を引き起こすという決定的根拠はない。

ネオスポラ関連流産を制御する方法には、ワクチン接種 (Romero et al. 2004) および/または検査と淘汰が考えられる。これは感染牛を群から排除する事を目的としている (Hall et al. 2005)。これらの方法はいずれも、その利用に制限がある。検査と淘汰は、群内での感染数が比較的少数の場合にのみ適用できる。しかし、あらゆるネオスポラ制御プログラムでは常に、繁殖牛の感染寄生虫への曝露を低減するための対策を必ず講じるべきである。これには、流産胎子や後産の迅速な検知と除去に加え、飼い犬や野犬を飼料倉庫や放牧地に侵入するのを制限することが含まれる。

詳細情報は、www.neosporosis.com より入手可能である。

授精時近傍のBVDウイルス感染がその後の受胎率に及ぼす影響

牛の出生前、出生後のBVDウイルス感染は、免疫抑制、先天性欠損、流産、粘膜疾患などさまざまな症候群に関連している。複数の調査によると、BVDは牛の流産例で最も頻繁に診断されるウイルス感染症であった。発育中の胎子におけるBVD感染の病理は複雑である。妊娠125日以前の胎子感染は、胎子死滅と流産、再吸収、ミラ化、発育異常、または胎子の免疫寛容と持続感染を引き起こすことがある。妊娠125日以降のBVD感染では流産が生じるか、胎子の免疫反応によりウイルスが除去される。繁殖成績に対するBVDウイルス感染の影響は、胎子死滅の誘発とその後の流産に限られるわけではないという所見が増加している。

急性BVDウイルス感染牛での受胎率低下が報告されており、これはしばしば、BVDが認められた群での主要な訴えである (Houe et al. 1993; McGowan et al. 1993)。実験的に卵胞期にウイルス血症を誘発させた結果、

受胎率は50%低下し、過剰排卵処置で回収された胚の質および数の悪化も報告されている (McGowan et al. 1993; Kafi et al. 1997)。

急性感染した牛の卵巣でのBVDウイルスの誘発による形態変化

Ssentongo et al. (1980)、Grooms et al. (1998)、およびMcGowan et al. (2003)は、急性BVDウイルス感染およびウイルス血症に関連して、卵巣組織中に炎症性変化(リンパ球性卵巣炎)が認められたことを報告した。前述の炎症病変は、感染牛の卵胞および形成中の黄体の両方で認められ、これは卵胞および黄体が十分な機能を果たせなくなる機能不全と、結果として生じる繁殖障害に明らかに寄与していた。

BVDウイルスがもたらす卵巣の形態変化の機能的重要性

1. 卵胞の発育不全

Grooms et al. (1998)は、血清陰性牛を非細胞病原性の牛ペストウイルス(BVDウイルス)分離株により感染させた後、主席無排卵卵胞および排卵卵胞の最長径と成長速度は2回の発情周期中に有意に減少したと報告した。Fray et al.(1999; 2000)およびFray et al. (2002)は、これを確認している。同著者らは、非感染牛と比較して、BVDウイルス感染牛では卵巣の発育パターンが明らかに障害され、排卵前卵胞の卵胞径は減少し、排卵卵胞の最大径も減少することを示した。

Kafi et al. (1997)は、過剰排卵処置後の若雌牛において、人工授精の9日前に非細胞病原性の牛ペストウイルスを接種した場合、排卵率が有意に低下したと報告した。

2. 不十分なエストラジオール産生

Fray et al.(1999; 2000)およびFray et al. (2002)の研究では、人工授精前後での無細胞ウイルス血症は、経産牛と未経産牛の両者の生殖内分泌機能に深刻な悪影響があることが明瞭に示された。感染牛での卵胞発育の違いは、エストラジオール濃度の常時低下を伴うエストラジオール分泌パターンの阻害と、特に排卵前のエストラジオールピークの遅延に関連していた (Fray et al., 1999; 2002)。

3. エストラジオール産生障害による発情発現の遅延および遅延するLHピーク

エストラジオール産生パターンの変化が、BVDウイルスに感染した若雌牛でKafi et al. (1997)、McGowan et al. (2003)が観察した発情行動開始の遅延、発情兆候の発現不良の原因であったと考えられる。さらに、同様の一連の実験において、McGowan et al.(2003)は、感染牛での異常なLHパターンを観察し、ほんの少数の個体が正常の排卵前サージを

示したに過ぎず、その他の感染個体では、排卵前LH ピークの遅延または低下が認められた。この研究において、感染若雌牛の内分泌プロファイルを検討したところ、大多数(83%)でエストラジオールおよびLHの排卵前ピークが正常でないことが明らかになった(McGowan et al. 2003)。この結果の直接の原因は、卵胞発育とエストラジオール分泌が不十分であったために、適切なLH分泌を促すことができなかったことであると解釈できる。排卵前LHサージの遅延と濃度低下は、排卵の遅延につながり、これにより卵母細胞の質に加えて胚の発育にも悪影響が及ぶと考えられる。

4. 不十分なプロゲステロン産生による早期胚死滅

Fray et al.(1999; 2000)およびFray et al. (2002)とMcGowan et al. (2003)が報告した実験では、人工授精前後に無細胞ウイルス血症を発症した経産牛および未経産牛では、排卵後のプロゲステロン上昇が遅延するとともに、排卵後3～11日のプロゲステロン濃度が総じて低下した。

BVDウイルス感染牛で観察される血中プロゲステロン濃度の低下が胚の発育遅延をもたらし、これにより受胎率が低下する可能性がある。BVDウイルスによるウイルス血症を有する経産牛や未経産牛で観察される排卵前LH ピークの遅延と低下は、胚発育の遅延をもたらし、胚の質に悪影響を及ぼす可能性もある。これは、同様に胚のIFN- τ の産生能や黄体退行の抑制能も低下させ得る。これは、フランスのブルターニュ地方の乳牛群を対象とした、繁殖性へのBVDウイルス感染の影響に関する大規模統計解析の結果が裏付けていると考えられる。この解析によると、BVDウイルス持続感染に曝露された群の雌牛は、長期間または最近感染が無かったと推定される群の雌牛と比較して、交配後発情の回帰が遅れる(21日より遅れる)リスクが有意に増大した(Robert et al. 2004)。

BVDウイルス感染による牛の繁殖ロスを低減するための基本的アプローチの一つは、厳密な農場バイオセキュリティ措置を実行し、牛がウイルスに曝露されるのを制限し、ワクチン接種を行って無細胞ウイルス血症と経胎盤感染を予防することである。

2.4.9 望まない妊娠

総じて回避するのが望ましいものの、若雌牛の不慮の交配は、妊娠中絶の一般的な理由である。施設管理者にも、妊娠若雌牛を中絶させる理由がある。妊娠中に淘汰した場合、若雌牛の売値は低下する。いずれにせよ、

若雌牛が子牛を宿していない場合は飼育効率が高く、難産時の分娩介護の手間も回避される。妊娠150日までは、黄体は妊娠牛の唯一のプロゲステロン供給源であるので、PGF_{2α}投与による黄体退行は、流産を引き起こす。交配が観察された場合、10～16日後にPGF_{2α}を注射する方法がある。また別の方法として、間違っ交配され発情が再開しない牛には、3週間後に注射することもできる。

妊娠100～150日で、PGF_{2α}の有効率が90%未満に低下するのは、一部の妊娠牛の黄体への依存度が低下するためである。この場合、PGF_{2α}の注射は、妊娠中絶を確実に保証するものではない。妊娠の判断は、PGF_{2α}を使用してから少なくとも10日間経過してから下し、妊娠牛すべてが流産するまで注射を反復することが賢明である。

妊娠150日以降、胎盤は妊娠を維持するのに十分なプロゲステロンを胎盤自体で分泌するようになる。妊娠の総てのステージで、デキサメタゾン25mgとPGF_{2α}の組み合わせにより流産を誘導することができる。しかしながら、Thomas(1991)は、このデキサメタゾン、PGF_{2α}の併用によって、フィードロットで飼養されている未経産牛において致死率が上昇することを報告している。

2.5 分娩の誘起

分娩誘起を選択する理由には以下のものがある：

- 分娩を早めて、分娩間隔の短縮もしくは分娩パターンの効率化を図る
- 過大胎子による異常分娩の発生頻度を低減する
- 異常分娩の終結を図る
- 特に季節繁殖を採用している地域(New Zealand)で遅い時期に妊娠した牛の分娩を早める

牛では、妊娠を維持するためプロゲステロンが必須である。前述のように、妊娠150日までと、分娩直前の数日間は黄体がプロゲステロンの主な産生源となっている。それ以外の期間は、胎盤が妊娠を維持するためのプロゲステロンを産生している。分娩は、胎子のコルチゾール産生により誘発される。これが胎盤のエストロゲンの上昇とPGF_{2α}の増加を起動させることになり、黄体が退行し、血中プロゲステロン濃度は急激に低下する。このことから、分娩を誘起させる目的でのPGF_{2α}、副腎皮質ホルモン、または両者の併用に着目した研究が進められてきた。

副腎皮質ホルモン

短時間作用型のデキサメタゾン(Dexadreson[®]; 15 ml)の分娩前あるいは分娩時の投与は、胎子由来のコルチゾールの上昇を模倣することになり、分娩を誘起する作用がある。大半の牛で投与後72時間以内に分娩がみられる。

分娩予定日の7～10日前に分娩誘起を試みる場合、処置に対する反応が一定せず、誘起に失敗する頻度が高くなる。この場合、中間型副腎皮質ホルモン製剤(Dexafort[®]; 10 ml)を前投与し、1週後に短時間型製剤(Dexadreson[®]; 10-15 ml)を用いることにより克服できる可能性がある。特筆すべきは、10～30%の妊娠牛は、この前投与に反応して1週以内に分娩に至ることである。

PGF_{2α}

通常量のPGF_{2α}を分娩予定日前1週間以内に注射することによっても分娩が誘起され、ほとんどの牛で注射後48時間以内に分娩がみられる。副腎皮質ホルモンは胎子の成熟に必要であるため、PGF_{2α}との併用が望ましいと考えられる。

文献および野外実践からのデータでは、胎盤停滞の発生率の増加は、使用する誘導体の型に拘わらず、PGF_{2α}による分娩誘起と関連している。胎子が未熟な状態で分娩誘起をすることがないようにするには、正確な授精日を把握しておくことが重要であり、そのような未熟分娩は、子牛の生存能力を有意に低下させる。したがって、正確な交配記録は、分娩環境衛生に対し細心の注意を払っているという意味で重要となる。

2.6 種雄牛

一般的に、人工授精センターは精液の品質について高い基準を設定しているものである。生産者が最適な種牛を選定するのに役立つように、種雄牛の生殖能力指標またはこれと同様の指標が提供されている。自然交配を実施する農場では、群全体の繁殖性にとって雄牛の生殖能力がとりわけ重要となる。雄牛が原因の低繁殖性は受胎遅延、分娩間隔の延長、子牛生産数の減少、さらには繁殖障害による淘汰にもつながる。年1回、各種雄牛の繁殖適合性の評価を行うことが強く推奨される。

2.6.1 繁殖適合性の評価

雄牛の繁殖適合性の評価基準は、Society for Theriogenology（家畜繁殖学会）が提供している（www.therio.org）。

次の事柄に注意するべきである。現時点では、雄牛の生殖能力を正確に予想できる単一の測定法または検査は存在しない。そのため繁殖適合性に関しては、通常は種雄牛の一般検査の中で、複数の基準を並べて評価することになる（Kastelic and Thundathil 2008）。最終的には、身体的評価と基本的な精液評価に基づいて査定する。

種雄牛の生殖能力に関する検査は4項目からなる：

- 一般検査
- 生殖器官の検査
- 精液評価
- 性欲の評価

一般検査

雄牛の年齢と個体識別表示を確認後、堅い床の上で立位や歩行状態等、運動器官系について注意深く観察する。種雄牛がさまざまな条件下で維持されることを考慮すると、視力も重要である。

生殖器官の検査

完全を期すには、陰茎と陰囊の検査に加え、直腸検査も行う必要がある。陰茎については、視診と触診を行う。陰茎の螺旋状湾曲または勃起不全等の障害は交尾時でなければ検知できない。

陰囊については、鼠径ヘルニア、脂肪過多、睪丸の肉眼的左右差、大きさ、および硬さ（通常弾力がある）等の異常の有無を、視診と触診により診断する。触診により、副睪丸（精巢上体）が正常で、尾部が柔軟であることを確認する。陰囊も十分に発育している必要がある。4～6歳牛で最大に達する陰囊径は、精液産生量に直接関連する。

直腸検査により評価可能な構造物には、尿道、前立腺、精囊腺、精管膨大部、精管や内鼠径輪がある。最もよく見られる異常は精囊炎であるが、その病因と病理は十分に解明されているわけではない。A. pyogenes、B. abortus、大腸菌、ストレプトコッカス属等が分離されている。治療が長期間にわたっても、その効果は一定せず、治癒はあまり期待できない。

精液評価

大半の種雄牛は、電気射精装置を用いて射精させることができ、これは精液採取を可能にする簡易かつ安全な方法である。牛によっては射精に至ら

ないか、水様の尿道球腺液の排出のみが見られることもあるが、その場合は人工腔を用いた監視下での採精がより有効と考えられる。全般的な精子運動能は、精液を事前に温めたスライドグラスに大きなドロップになるように1滴垂らし、低倍率、37°Cで観察することにより評価する。全体の運動能は以下のグレードに分類する：1)鞭毛運動が高速で活発、2)鞭毛運動がやや遅い、3)鞭毛運動がなく通常の屈曲運動のみ、4)時折屈曲するのみ。全体の精子運動能は精液濃度にも依存するため、より正確な推定値は、位相差顕微鏡を用いて評価するのが望ましい。

光学顕微鏡による精液の評価では、顕著な異常は検知できるが、雄牛の生殖能力に影響し得る運動能のわずかな変化を検知するのは困難である。コンピューター精子自動分析検査(CASA)は、精子の機能状態に関連する特徴的な運動特性を解析できる、はるかに客観的な観察法である。

形態に関しては、新鮮な精液をエオジン・ニグロシン染色して1000倍の顕微鏡観察で調べることができる。

満足の行く能力を持った種雄牛にとっての閾値は、直進運動率が30%以上、正常形態率が70%以上である。

性欲

性欲の簡易検査としては、発情した雌牛や若雌牛を囲いに入れ、そこに雄牛を10～15分間同居させる方法がある。この時に、1回以上の乗駕が見られた場合、雄牛の性欲は問題ないと評価することができる。乗駕が見られなければ、再度検査する必要がある。2回の検査で乗駕が見られなければ、雄牛の性欲に深刻な問題があると考えられる。

現在、分子生物学と生殖細胞相互作用に基づく、いくつかの新しい方法が研究されており、種雄牛の生殖能力検査への将来的な利用を目指している(Petrunkina et al. 2007; Kastelic and Thundathil 2008)。

2.6.2 雄牛の繁殖障害

種雄牛の繁殖障害の原因としては、乗駕不全、陰茎の挿入不全、精子の受精失宜が考えられる。一般的にこの診断は、上記のガイドラインに沿い、慎重な検査によって下す必要がある。低繁殖能の診断ははるかに困難である。精巣感染がある場合、通常予後は不良である。精巣の変性は、ストレス、毒素、暑熱、および栄養障害が原因となり得る。診断は、多くの場合、

精液検査に基づいて行われるが、精液が回復するかどうかは一定していない。8週間以内に通常の精液に回復する雄牛もいる一方、回復に6カ月までかかる場合もある。しかし、繰り返すが精液検査は不可欠である。

繁殖不能の雄牛のホルモンによる治療効果は限られている。PMSGはFSHと同様に作用し、精子生産を刺激する。hCGは、そのLH活性によりテストステロン産生を刺激する。GnRHは、FSH、LH濃度を短期的に増加させる。正確な管理記録と臨床検査は、正確な診断を得るために役立つ。これを踏まえて初めて、特別な治療もしくは管理方法の変更(休息も含む)を決定することができる。

いくつかの病原体は、雄牛の繁殖不能の原因となり、精液を介して伝播する (Givens 2006; Givens and Marley 2008a; Givens and Marley 2008b)。これらのいくつかは、生殖器疾患を引き起こすことにより、あるいは精子が原因で起こる受精の阻害に関連することにより、直接雄牛の繁殖能に影響することがある。精子の質を低下させ、または雄牛の生殖器官に影響する病原ウイルスには、牛ヘルペスウイルス I 型(牛伝染性鼻気管炎の原因となる BHV-1)、牛ウイルス性下痢症ウイルス(BVDV)がある。精液を介して伝染するウイルスには、他に口蹄疫ウイルス、水疱性口炎ウイルス、牛疫ウイルス、ランプースキン病ウイルスがある。牛免疫不全ウイルスや牛白血病ウイルスが精液を介して感染する危険性は殆どない。ブルータングウイルス(BTV)は、ウイルス血症を来した雄牛の精液中に散発的に認められるため、性交感染が生じる可能性がある。

Tritrichomonas foetus (トリコモナス症)と *Campylobacter fetus venerealis*(カンピロバクター症) は、性交感染する;これらは雄牛自身には発症しないが、凍結精液中で生存可能である。定期的にこれら二つの病原体の有無について、特に自然交配に用いる場合には、繁殖雄牛を検査する必要がある。精液を介して伝染し、繁殖障害または感染伝播と関連する他の微生物には、*Brucella abortus* (ブルセラ病)、レプトスピラ属、*Histophilus somnus* (ヒストフィルス・ソムニ感染症)、*Ureaplasma diversum* (マイコプラズマ肺炎)、*Mycobacterium avium* 亜属(トリ結核菌)、パラ結核菌、クラミジア、*Mycobacterium bovis*(牛結核菌)、*Coxiella burnetii* (Q熱リケッチア)、*Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides*(牛肺疫菌)がある。

国際獣疫局(OIE)は精液生産に関連する疾患についての管理基準を設定している。人工授精・精液採取センターに繋養される種雄牛については、

ブルセラ病、結核、BVDV、*T. foetus*(トリコモナス症)、*C. foetus*(カンピロバクター症)、BHV-1の検査を年1回実施する必要がある。事前検疫、検疫時の検査により、農場の牛群または人工授精センターにBHV-1感染がないと考えられる場合は、雄牛がBHV-1だけでなく、雄牛がブルセラ病、結核、BVDV、に感染していないことを確認する必要がある。加えて、米国の精液証明所(CSS)は、レプトスピラ症の検査も推奨している。

※CSS: 米国ミズーリー州コロンビアに本拠を置く米国動物血統協会により運営されており、CSSが発行する「人工授精センターへの精液生産疾病管理最低条件」は人工授精による精液感染症になる恐れが大きいこれらの疾病に対する包括的な基準を示している(監訳者追加)。

2.7 胚移植 (Embryo Transfer, ET)

人工授精は、最上質の種雄牛を効率的に利用することにより、牛群の速やかな遺伝形質改善に役立っている。牛の最大繁殖能は、1年当たり子牛1頭である。過剰排卵・胚移植 (MOETまたはET) 法により、母牛の繁殖能を最大限利用することが可能となり、これにより牛繁殖における雌の影響力を高めることができる。

ET を行う理由としては、以下が挙げられる：

- 上質な価値の高い雌牛からより多くの子牛を得るため
- 牛群全体での遺伝的形質の改善速度を加速するため
- 家畜の国際搬送を促進するため
- 家畜を熱帯諸国へ輸出する際の、馴化の問題を回避するため
- (国際的)雄牛繁殖計画の一環として
- 双胎を誘起するため
- 低質の乳牛群より純血種の肉牛の子牛を得るため
- 受胎能に問題のある雌牛由来の子孫を得るため

従来のETの技術は比較的安定した成績をもたらし、多くの技術者が20年以上もの間、この成熟した産業界で経験を積んできた (Scherzer et al. 2008)。ET産業の正確な規模を把握するのは幾分困難であるが、2003年には50万個以上もの牛の胚が移植された事が報告され、そのうちの40%は凍結・融解後に移植され、18%は *in vitro* で生産された胚である (Betteridge 2006)。2003年の時点で、北米がその活動の中心になっており (全移植数の45%)、次いでヨーロッパ、南米がともに20%を占めている。近年、ブラジルや中国での牛胚の生産が顕著に増加している。*in vitro*での牛胚の生産は、今や十分に確立した、かなり有効な技術となっている。2003年には、この方法により生産された10万個以上の胚が移植され、そのうちほぼ60%が南米で行われている。

2005年には最新のデータが出ているが、胚移植数は *in vivo*、IVP (体外胚生産)とも増加が続いている。しかし、*in vivo*での胚移植が世界で60万個を超えた時点で、約半数は新鮮胚、半数は凍結胚であった。これに対し、同年に約 26万個のIVP胚が移植され、その大半(約70%)は新鮮胚移植であった。

牛での胚生産と移植についての詳細な総説が Mapletoft and Hasler (2005)、Sirard and Coenen (2006)によりまとめられている。

牛での移植で用いられる胚には、基本的に2つの供給源がある：

- **ドナー牛の生殖器官を灌流して得られる生体内由来胚 (*in vivo*胚)**
これらの胚は、両親である牛の遺伝的背景と健康状態が充分把握されたうえで生産されている。これにより群全体の遺伝形質を速やかに改善する最大の可能性が確保される。それにも拘わらず、この方法の有効性は、薬剤療法により誘起された過剰排卵後の排卵率、受精率、胚回収率等の要因によってある程度制限される。これらの胚は同期化されたレシピエント牛(受胚牛)に直接移植されるか、凍結後に液体窒素中に保存され、将来の使用に備えられる。
- **卵母細胞の体外成熟培養 (IVM) および体外受精 (IVF) によって得られる胚 (IVP胚)**
これらの胚は、選抜された能力が既知のドナー牛の排卵前卵胞からの吸引 (OPU) によって回収された卵母細胞、または食肉処理場で採取した卵巣の未成熟卵母細胞に体外成熟 (IVM) 処置を行ったものに由来する。後者の方法は効率的ではあるが、(通常)ドナー牛の遺伝的背景不明の問題と、多くの健康上の考慮すべき問題を抱えていることも事実である。

in vivo で得られた牛胚が、IVM後に体外受精させて培養した胚よりも品質が優れていることは十分認識されている。核成熟の達成率は高率であるが、IVM後の牛卵母細胞の発育能は一定していない。この不安定性の大きな理由として、卵巣から回収された卵母細胞の内因性の品質にあることが考えられる。さらにもう一つ、体外胚生産 (IVP) や体細胞核移植 (SCNT; somatic cell nuclear transfer) の負の結果として、牛でも他の動物種でも、胚、胎子、胎盤、産子は、形態的にも発育能の面でも、*in vivo* で生産された胚とはその性質が大きく異なることである (Farin et al. 2004; Farin et al. 2006; Lonergan and Fair 2008)。それらの異常をまとめて、「過大子症候群」、または「過大子牛症候群」と呼ばれている。*in vitro* での技術で得られた胚で出現し得る異常を検出できる診断技術は現時点では限られているため、今後は生理学的背景を調査すること、将来的に過大子牛症候群を予防する戦略を明確にすることの両面からの研究が必要である。

IVMと胚培養技術は、クローニングに必須の技術であり、この技術を生かすことにより、乳中にさまざまな薬剤性タンパク質を分泌する遺伝子改変牛の繁殖が促進される。核移植による成牛のクローニング、およびクローン化されたトランスジェニック牛の生産は、技術的にはすでに達成されている。しかし、現在のところ、この技術はコストが嵩み非効率的であるので、その使用は製

薬業界や研究機関レベルに留まっている (Mapletoft and Hasler 2005; Galli and Lazzari 2008)。細胞質内精子注入 (ICSI) による体外受精は、ヒトの生殖にも役立つ先進技術であり、牛では凍結精子を用いた場合でも実行可能だが、まだ広く用いられるに至っていない。少数の研究機関が、子牛から得た卵母細胞を用いて体外受精させた胚で妊娠に成功した例を報告している。この技術を用いれば、世代間隔を短縮させて遺伝形質を改良できる可能性が増すことを示唆している。

国際胚移植学会 (The International Embryo Transfer Society, IETS) は、特に胚生産と移植における動物衛生と疫学の面から、一連の詳細な手順を公表している。BVDやIBR等の病原体は、胚を介して感染する可能性が確認されている。これらの病原体に関して、胚移植の安全性を保証するための特別な対策が講じられている。Givens and Marley (2008b) の総説では、牛胚移植時に推奨される現行の健康管理についてまとめる一方、バイオセキュリティの新しい取り組み法を開発し、その有効性を検討する最近の研究に力点を置いている。大半のコマーシャルベースで運営されている胚生産システムでは、動物由来のさまざまな栄養素を添加した培地を用いている。多くの予防手段が採用されているが (原料のスクリーニング、高温による熱処理、抗生物質の添加など)、このようなシステムでは特にIVP胚に対して健康リスクが高くなる (Givens and Marley 2008a)。健康の確保と品質管理の観点から、組成の明らかで、細胞成分や血液由来の栄養素を含まない培養システムが理想とされる。血清や血清タンパク質を含まず、化学的な組成が明らかであれば、どのような培地でも、発育への効果や胚に有効に作用する因子の効果が正確に観察できると考えられる。

化学的組成が一部、またはすべて明確にされた培地の使用についての報告が入手可能である (Feugang et al. 2009)。

2.7.1 ドナー牛の管理

自然な状態で雌牛は、1回の発情周期に1個の排卵が起こるのみである。卵巣にゴナドトロピンを作用させることにより、多数の排卵が誘起される (過剰排卵)。胚移植は世界中で広く行われている技術だが、過剰排卵処置に対する反応性が一定しないことが依然として大きな律速因子となっている。卵巣の反応が一定しないことは、過剰排卵処理法の相違にも関係する。ゴナドトロピンの投与方法や1回使用量、総使用量、投与期間、投与時期、併用ホルモン剤などの他、個体間の差異も無視できない。

最近、卵胞波出現と排卵をコントロールできるプロトコルが開発されているが、過剰排卵の不安定性をまだ十分に排除できていないわけではない。それにも拘わらず、これらのプロトコルは、事前に定めた時刻での処置の開始を可能としたことにより、コマーシャルベースで行われる農場内胚移植システムの応用に好影響を及ぼした。さらに排卵時期を厳密に同期化するプロトコルでは、ドナー牛の定時授精が可能となった。そのおかげで過剰排卵処置中の発情検知も不要となった。

卵巣の超音波画像検査から生まれる情報により、1発情周期で卵胞波周期の数が2回か3回の牛では、発情後約8～12日（排卵後7～11日）で第2の卵胞波が出現することが確認されている。したがって、発育中の卵胞群は、この時点で過剰排卵の刺激を受ける準備ができています。しかし、過剰排卵処置に対する反応は、ゴナドトロピン処置を、卵胞波出現後よりも、出現時ちょうどに行った方が良好であることが示されている。

牛では、過剰排卵を誘起するために、以下の異なる3種類のゴナドトロピンが用いられる。それらは、豚や他の家畜の下垂体から抽出されたゴナドトロピン（抽出FSH）、馬の絨毛性ゴナドトロピン（eCG）/妊娠雌馬血清中のゴナドトロピン（PMSG）、ヒト閉経期ゴナドトロピン（hMG）である。現在、過剰排卵を得るために胚移植産業で最も用いられるゴナドトロピンは、卵胞刺激ホルモン（FSH）である。このホルモンは、通常は同期化された発情周期の黄体期半ばに投与される。前述のように、ゴナドトロピンを卵胞波の出現と同時に投与した方が、卵胞波出現後に投与するよりも過剰排卵処置に対する反応が高くなる傾向にある。このため、正常発情周期を示す牛では、通常卵胞波のタイミングをコントロールする処置を行うことになる。

FSH

豚および羊の脳下垂体由来の天然FSH製剤が入手可能である。FSHは比較的半減期が短いために、通常1日2回投与される。

通常の投与プロトコルでは、400 mgの抽出精製FSH（Folltropin[®]-V など）を1日2回、4～5日間投与する。PGF_{2α}は黄体退行を誘起するために、FSH処置開始後48～72時間で注射する。PGF_{2α}注射後36～48時間後で発情が開始し、排卵は発情開始後24～36時間で起こると想定されている。

Chebel et al. (2008)は、乳牛群における胚採取と移植の成功率に影響を及ぼす要因について検討した。

動物関連

- 発情周期のステージ。最良の結果は、過剰排卵処置を黄体期半ばに開始した場合に得られる（第9～13日）
- 過剰排卵時の卵胞の状態。過剰排卵時に大きな主席卵胞が存在した場合、反応は抑制される
- 一般健康状態と栄養状態
- 泌乳のステージ

管理および環境関連

- ドナー牛の一般管理（ストレスの回避、適切な畜舎管理）
- 外気温と湿度

処置関連

- 同期化および誘起システム（使用システムのタイプと投薬遵守状況）
- 精液/授精。高品質の精液を使用し、スタンディング発情開始後12～24時間で人工授精を行う。授精を反復しても、受精率は上昇しないようである。雄牛間の差異も報告されている。
- 胚の回収手技と体外での取扱い技術

Crestar[®]などの黄体ホルモンの使用は、胚や卵母細胞のドナー牛において発情を厳密に同期化できる効果的な方法である。また黄体ホルモンの使用は、回収した卵母細胞/胚の質を保証し、授精を定時に実施できる利点も伴う。基本的なCrestar[®]同期化プログラムでは、FSH（Folltropin V[®]）の連続注射と組み合わせられる。これにより過剰排卵誘起の達成が図られる。

2.7.2 レシピエント牛の管理

胚回収成績のばらつきが大きいため、しばしば準備したレシピエント牛が過剰であったり、または不足する。余分な胚は凍結して液体窒素中に保存することになるが、その際、状態の良い胚だけを選択して凍結すべきである。それらは正常な自然発情周期中に移植できるし、コントロールされた発情周期中にさらに実用的な目的でも使用できる。レシピエント牛の受胎率は、自然発情周期中の移植と、コントロールされた発情周期中の移植を比較しても差は認められない。

発情開始とともにGnRH類縁体（Receptal[®], Fertagyl[®]; 2.5 ml）を投与し、PGF_{2α}類縁体の使用により同期化された発情状態のレシピエント牛の排卵を開始し完了させることができる：適切なレシピエント牛が十分に準備されて

いる場合、排卵がぴったりとしたタイミングで起こり、かつ黄体の発育が改善されていけば、さらに良好な結果が見込まれる。

レシピエントにおける胚移植の成功に影響する因子の中では(受胎率や分娩率として評価)、以下が最も関連性がある(Peterson and Lee 2003; Looney et al. 2006; Vasconcelos et al. 2006) :

- 胚の品質と適切な移植技術
- レシピエント牛の発情周期に合わせた適切なタイミングでの移植
- 移植時のレシピエント牛の適切な血液循環中プロゲステロン濃度(しばしば乳産生と相関する)
- 暑熱ストレスやその他のストレスの管理(処置、栄養、畜舎など)

高品質な胚が移植されても、レシピエント牛の間で受胎率はかなり変動する。McMillan(1998)は、妊娠60日までの期間で、移植胚の生存率に対する胚とレシピエント牛の影響を別々に評価するモデルを開発した。そのモデルによると、レシピエント牛が妊娠を分娩予定日まで維持する能力(レシピエント牛の質)は、胚が生存、発育する能力よりも変動が大きく、これが胚移植後の受胎率が変動することにつながっていることが示された。かなり興味深いことは、レシピエント牛の質は、妊娠60日以降の胎子喪失には、あまり寄与していないことであった。McMillanが提示したこのモデルは、以下のような事象を示唆していると認識することが重要であるとしている。それは、農場に上質のレシピエント牛が存在しているという前提で、フィールドでは多くの胚移植専門の獣医師がそのような牛を懸命に特定しようと努力し、また望む遺伝形質を群に導入するために繰り返し移植を行っているということである。

2.8 牛の繁殖における性選別された精液の利用

性選別された精液の利用により、酪農家は農場内の優秀な母牛を群から選抜して、後継の若雌牛を遺伝的に優秀な雌牛のみから生産することができるようになった。

現在の技術で、X染色体、Y染色体を有する精子集団を分別するには、個々の精子の識別と高速フロー・サイトメーターによる精子の選別が必要である(Seidel 2007(総説); Garner and Seidel 2008)。雌子牛の需要は急速に拡大しており、このことは、優秀な遺伝形質を持った雄牛の精液の性選別の需要を促す結果となっている。この技術の成功は、主に性選別した精

子の受精能に依存しており、これが決定的な要因であるため、最も経済的な関わりが深い。

現在のところ受胎率は一定せず、性選別後の処理に依存している。性選別後の新たな処理技術は研究開発中であり、性選別された精液の受精率は改善されることが期待される。これを成功させるためには、最も性選別に適した種雄牛を選別し、性選別したサンプルをルーチンで試験するようになることが非常に重要である。

選別中に精子のDNAが損傷を受け、その損傷により胚や胎子で異常が起こる可能性は、牛での性選別精液の広範な使用を図る上で大きな課題である。しかし、今までのところ、精子の選別操作は、精子の遺伝物質に対して安全なものであることが証明されている。さらに性選別精液を用いた人工授精による大規模研究において、性選別した精液では、選別していない対照精液と比較して、流産率の増加ならびに妊娠期間、新生子死亡、難産、出産時体重、離乳時体重および正常子娩出に相違は認められなかった。そのため、性選別操作中に精子が受ける遺伝的損傷は、最小限あるいは皆無であると推定されている。

市販の性選別精液は、若雌牛に用いられることが多い。これは、若雌牛の受胎率が本質的に高く、一方、性選別精液の供給量は限られているためでもある。乳牛群での受胎率は30～70%と報告されている(Garner and Seidel 2008)。その報告では、実施農場の受胎性の平均レベルと飼養管理要因が人工授精による受胎率に大きく影響するとされている。

2.9 双胎妊娠

乳牛では、双子は子牛死亡率の上昇、胎盤停滞、分娩から受胎までの期間の延長、および産乳量の低下につながる。これらの問題が、入念な管理によって制御できる場合には、双胎妊娠の誘起には経済的利点が生じると考えられる。泌乳が主な収入源とならない肉牛では、双子生産に興味深い利点があることが示されている。

ゴナドトロピンの使用により、「軽度の過剰排卵」を誘起することで双子の頻度が増加するだけでなく、三胎または四胎妊娠が誘起される可能性もある。

胚を2つ移植するか、人工授精した牛に胚を1つ移植することにより、双胎妊娠の比率が増加し(40～60%)、子牛の総出生数が増加することになる。この場合の経済的な効果は、子牛の価格と関連した胚の操作にかかったコストによって決まる。

Confidential

2.10 参考文献

- Al-Katanani YM, Paula-Lopes FF, Hansesn PJ.** Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J Dairy Sci* 2002; 85: 390-396.
- Alnimer M, De Rosa G, Grasso F, Napolitano F, Bordi A.** Effect of climate on the response of three oestrus synchronisation techniques in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2002; 71: 157-168.
- Ambrose DJ, Radke B, Pitney PA, Goonewardene LA.** Evaluation of early conception factor lateral flow test to determine nonpregnancy in dairy cattle. *Can Vet J* 2007; 48: 831-835.
- Ambrose JD, Schmitt EJP, Lopes FL, Mattos RC, Thatcher WW.** Ovarian and endocrine responses associated with the treatment of cystic ovarian follicles in dairy cows with gonadotropin releasing hormone and prostaglandin $F_{2\alpha}$, with or without exogenous progesterone. *Can Vet J*. 2004 ; 45: 931-937.
- Ambrose JD, Kastelic JP, Rajamahendran R, Aali M, Dinn N.** Progesterone (CIDR)-based timed AI protocols using GnRH, porcine LH or estradiol cypionate for dairy heifers: Ovarian and endocrine responses and pregnancy rates. *Theriogenology* 2005; 64: 1457-1474.
- Anderson ML.** Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. *Theriogenology* 2007; 68: 474-486.
- Arbel R, Bigun Y, Ezra E, Sturman H, Hojman D.** The effect of extended calving intervals in high-yielding lactating cows on milk production and profitability. *J Dairy Sci* 2001; 84: 600-608.
- Arechiga CF, Staples CR, McDowell LR, Hansen PJ.** Effects of timed insemination and supplemental beta-carotene on reproduction and milk yield of dairy cows under heat stress. *J Dairy Sci* 1998; 81: 390-402.
- Armstrong DV.** Heat stress interaction with shade and cooling. *J Dairy Sci* 1994; 77: 2044-2050.
- Aroyo A, Yavin S, Roth A, Arav A.** Hindering of cleavage timing in bovine parthenotes during the hot season. *Reprod Fertil Dev* 2007; 19: 203, Abstract 173.
- Ayad A, Sousa NM, Sulon J, Hornick JL, Iguer-Ouada M, Beckers JF.** Correlation of five radioimmunoassay systems for measurement of bovine plasma pregnancy-associated glycoprotein concentrations at early pregnancy period. *Res Vet Sci* 2009; 86: 377-382.
- Barber JS, Gasser RB, Ellis J, Reichel MP, MacMillan D, Trees AJ.** Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. *J Parasitol* 1997; 83: 1056-1058.
- Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW.** A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* 2008; 69: 714-723.
- Barr BC, Conrad PA, Sverlow KW, Tarantal AF, Hendrickx AG.** Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Lab. Invest.* 1994; 71: 236-242.
- Bartolome JA, Archbald LF, Morresey P, Hernandez J, Tran T, Kelbert D, Long K, Risco CA, Thatcher WW.** Comparison of synchronization of ovulation and induction of

estrus as therapeutic strategies for bovine ovarian cysts in the dairy cow. *Theriogenology* 2000; 53: 815–825.

Bartolome JA, Silvestre FT., Arteche AC., Kamimura S., Archbald LF., Thatcher WW. The use of Ovsynch and Heatsynch forre-synchronization of cows open at pregnancy diagnosis by ultrasonography. *J Dairy Sci* 2002; 85 (Suppl. 1): 99. (Abstr.)

Bartolome JA, Santos JE, Pancarci SM, Melendez P, Arteche AC, Hernandez O, Archbald LF, Trigg T, Thatcher WW. Induction of ovulation in nonlactating dairy cows and heifers using different doses of a desloreline implant. *Theriogenology* 2004; 61: 407–419.

Bartolome JA, Silvestre FT, Kamimura S, Arteche AC, Melendez P, Kelbert D, McHale J, Swift K, Archbald LF, Thatcher WW. Resynchronisation of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows I: use of Ovsynch and Heatsynch protocols after non-pregnancy diagnosis by ultrasonography. *Theriogenology* 2005a; 63: 1617–1627.

Bartolome JA, Sozzi A, McHale J, Melendez P., Arteche AC., Silvestre FT., Kelbert D., Swift K, Archbald LF., Thatcher WW. Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows, II: assigning protocols according to stages of the estrous cycle, or presence of ovarian cysts or anestrus. *Theriogenology* 2005b; 63: 1628–1642.

Bartolome JA, Sozzi A, McHale J, Swift K, Kelbert D., Archbald LF, Thatcher WW. Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows III. Administration of GnRH 23 days post AI and ultrasonography for nonpregnancy diagnosis on day 30. *Theriogenology* 2005c; 63: 1643–1658.

Bartolome JA, Thatcher WW., Melendez P., Risco CA, Archbald LF. Strategies for the diagnosis and treatment of ovarian cysts in dairy cattle. *JAVMA* 2005d; 227: 1409–1414.

Bech-Sabat G., Lopez-Gatius F., Garcia-Ispuerto I, Santolaria JP., Serrano B., Nogareda C., de Sousa NM., Beckers JF., Yaniz J. Pregnancy patterns during the early fetal period in high producing dairy cows treated with GnRH or progesterone. *Theriogenology* 2009; 71: 920–929.

Berisha B., Schams D. Ovarian function in ruminants. *Domest Anim Endocrinol* 2005; 29: 305–317.

Betteridge KJ. Farm animal embryo technologies: Achievements and perspectives. *Theriogenology* 2006; 65: 905–913.

Binelli M., Thatcher WW., Mattos R., Baruselli PS. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* 2001; 56: 1451–1463.

Bloch A., Folman Y., Kaim M., Roth Z., Braw-Tal R, Wolfenson D. Endocrine alterations associated with extended time Interval between estrus and ovulation in high-yield dairy cows. *J Dairy Sci* 2006; 89: 4694–4702.

Bonnet BN, Martin SW., Meek AH. Associations of clinical findings, bacteriological and histological results of endometrial biopsy with reproductive performance of postpartum dairy cows. *Prev Vet Med* 1993; 15: 205–220.

Bolinder A., Seguin B., Kindahl H., Bouley D., Otterby D. Retained fetal membranes in cows: Manual removal versus nonremoval and its effect on reproductive performance. *Theriogenology* 1988; 30: 45–56.

Breuel KF., Spitzer JC., Henricks DM. Systemic progesterone concentration following human chorionic gonadotroin administration at various times during the estrous cycle in beef heifers. *J Anim Sci* 1989; 67: 1564–1572.

- Bridges PJ., Brusie MA., Fortune JE.** Elevated temperature (heat stress) *in vitro* reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. *Domest Anim Endocrinol* 2005; 29: 508–522.
- Brito LF., Silva AE., Barbosa RT., Kastelic JP.** Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. *Theriogenology* 2004; 61: 511–528.
- Britt JH., Harrison DS., Morrow DA.** Frequency of ovarian follicular cysts, reasons for culling and fertility in Holstein–Friesian cows given gonadotropin-releasing hormone at two weeks after parturition. *Am J Vet Res* 1977; 50: 749–751.
- Bucklin RA., Turner LW., Beede DK., Bray DR., Hemken RW.** Methods to relieve heat stress for dairy cows in hot, humid climates. *Appl Eng Agric* 1991; 7: 241–247.
- Burton NR., Lean IJ.** Investigation by meta-analysis of the effect of prostaglandin F₂-alpha administered post partum on the reproductive performance of dairy cattle. *Vet Rec* 1995; 136: 90–94
- Butler J E., Hamilton WC., Sasser RG., Ruder CA., Hass GM, and R. J. Williams.** Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biol Reprod* 1982; 26: 925–933.
- Butler WR., Calaman JJ., Beam SW.** Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *J Anim Sci* 1996; 74: 858–865.
- Butler WR.** Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 2000; 60–61: 449–457.
- Buxton D., Maley SW., Pastoret PP., Brochier B., Innes EA.** Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Vet Rec* 1997; 141: 308–309.
- Cabaj W., Moskwa B., Pastusiak K., Gill J.** Antibodies to *Neospora caninum* in the blood of European bison (*Bison bonasus bonasus* L) living in Poland. *Vet Parasitol* 2005; 128: 163–168.
- Calder MD., Salfen BE., Bao B., Youngquist RS., Garverick HA.** Administration of progesterone to cows with ovarian follicular cysts results in a reduction in mean LH and LH pulse frequency and initiates ovulatory follicular growth. *J Anim Sci.* 1999; 77: 3037–3042.
- Campbell MH., Miller JK.** Effect of supplemental dietary Vitamin E and zinc on reproductive performance of dairy cows and heifers fed excess iron. *J Dairy Sci* 1998; 81: 2693–2699.
- Cartmil JA., Hensley BA., El-Zarkouny SZ., Rozell TG., Smith JF., Stevenson JS.** An alternative AI-breeding protocol during summer heat stress. *J Dairy Sci* 1999; 82: 48.
- Cartmill JA., El-Zarkouny SZ., Hensley BA., Lamb GC., Stevenson JS.** Stage of cycle, incidence, and timing of ovulation and pregnancy rates in dairy cattle after three timed breeding protocols. *J Dairy Sci* 2001; 84: 1051–1059.
- Cavalieri J., Hepworth G., Fitzpatrick LA., Shephard RW., Macmillan KL.** Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. *Theriogenology* 2006; 65: 45–64.
- Cavalieri J., Smart VM., Hepworth G., Ryan M., Macmillan KL.** Ovarian follicular development and hormone concentrations in inseminated dairy cows with resynchronized estrous cycles *Theriogenology* 2008; 70: 946–955.

- Cavanagh AC.** Identification of early pregnancy factor as chaperonin 10: implications for understanding its role. *Rev Reprod* 1996; 1: 28–32.
- Cerri RL, Rutigliano HM, Bruno RG, Santos JE.** Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts. *Anim Reprod Sci* 2009; 110: 56–70.
- Chagas e Silva J, Diniz P, Lopes da Costa L.** Accessory corpora lutea induced by hCG treatment enhance survival of half embryos in high yielding lactating dairy cows. Proceedings of the 16th ICAR, Budapest 2008.
- Chebel RC, Santos JE, Cerri RL, Galvao KN, Juchem SO, Thatcher WW.** Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2003; 60: 1389–1399.
- Chebel RC, Demetrio DG, Metzger J.** Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology* 2008 ;69: 98–106.
- Chenault JR, Kratzer DD, Rzepkowski RA, Goodwin MC.** LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. *Theriogenology* 1990; 34: 81–98.
- Colazo MG, Ree TO, Emmanuel DG, Abrose DJ.** Plasman luteinizing hormone concentrations in cows given repeated treatments or three different doses of gonadotropin releasing hormone. *Theriogenology* 2009; 71: 984–992.
- Coleman DA, Bartol FF, Spencer TE, Floyd JG, Wolfe DF, Brendemuehl JP.** Effects of a potent GnRH agonist and hormonal profiles, synchronization of estrus and fertility in beef cattle. *J Anim Sci* 1991; 69(Suppl. 1): 396.
- Cordoba MC, Fricke PM.** Evaluation of two hormonal protocol for synchronization of ovulation and timed artificial insemination in dairy cows managed in grazing-based dairies. *J Dairy Sci* 2001; 84: 2700–2708.
- Cordoba MC, Sartori R, Fricke PM.** Assessment of a commercially available early conception factor (ECF) test for determining pregnancy status of dairy cattle. *J Dairy Sci* 2001; 84: 1884–1889.
- Cordoba MC, Fricke PM.** Initiation of the breeding season in a grazing-based dairy by synchronization of ovulation. *J Dairy Sci* 2002; 85: 1752–1763.
- Curran S, Pierson RA, Ginther OJ.** Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 20 through 60. *J Am Vet Med Assoc* 1986; 189: 1295–1302.
- Davies CJ, Hill JR, Edwards JL, Schrick FN, Fisher PJ, Eldridge JA, Schlafer DH.** Major histocompatibility antigen expression on the bovine placenta: its relationship to abnormal pregnancies and retained placentas. *Anim Reprod Sci* 2004; 82–83: 267–280.
- Dejarnette JM, Day ML, House RB, Wallace RA, Marshall CE.** Effect of GnRH pretreatment on reproductive performance of postpartum suckled beef cows following synchronisation of oestrus using GnRH and PGF2alpha. *J Anim Sci* 2001a; 79: 1675–1682.
- DeJarnette JM, Salverson RR, Marshall CE.** Incidence of premature estrus in lactating dairy cows and conception rates to standing estrus or fixed-time inseminations after synchronization using GnRH and PGF(2alpha). *Anim Reprod Sci* 2001b; 67: 27–35.
- DeJarnette JM, Marshall CE.** Effects of pre-synchronization using combinations of PGF(2alpha) and (or) GnRH on pregnancy rates of Ovsynch- and Cosynch-treated lactating Holstein cows. *Anim Reprod Sci* 2003; 77: 51–60.
- de la Sota, R. L., Burke JM, Risco CA, Moreira F, DeLorenzo MA, Thatcher WW.** Evaluation of timed insemination during summer heat stress in lactating dairy cattle. *Theriogenology* 1998; 49: 761–770.

- De Renzis F., Marconi P., Capelli T., Gatti F., Facciolongo F., Franzini S., Scaramuzzi RJ.** Fertility in post partum dairy cows in winter or summer following estrus synchronization and fixed time AI after the induction of an LH surge with GnRH or hCG. *Theriogenology* 2002; 58: 1675–1687.
- De Renzis F., Scaramuzzi RJ.** Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review. *Theriogenology* 2003; 60: 1139–1151.
- De Renzis F., Valentini R., Gorrieri F., Bottarelli E., Lopez-Gatius F.** Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm season. *Theriogenology* 2008; 69: 1077–1082.
- de S Torres-Júnior JR., de FA Pires M., de Sá WF., de M Ferreira A., Viana JHM., Camargo LSA., Ramos AA., Folhadella IM., Polisseni J., de Freitas C., Clemente CAA., de Sá Filho MF., Paula-Lopes FF., Baruselli PS.** Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 2008; 69: 155–166.
- De Vries A.** Economic Value of Pregnancy in Dairy Cattle. *J Dairy Sci.* 2006; 89: 3876–3885.
- De Vries A., Crane MB., Bartolome JA., Melendez P., Risco CA., Archbald LF.** Economic comparison of timed artificial insemination and exogenous progesterone as treatments for ovarian cysts. *J Dairy Sci* 2006; 89: 3028–3037.
- Dijkhuizen AA., Huirne RB., Renkema JA.** Modelling animal health economics. Department of Farm Management, Wageningen Agricultural University. 1991.
- Dijkstra, T., Eysker, M., Schares, G., Conraths, FJ., Wouda, W., Barkema, HW.** Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* 2001; 31: 747–752.
- Diskin MG., Austin EJ., Roche JF.** Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 23: 211–228.
- Diskin MG., Morris DG.** Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domest Anim* 2008; 43(Suppl 2): 260–267.
- Donofrio G., Herath S., Sartori C., Cavarani S., Flammini CF., Sheldon IM.** Bovine herpesvirus 4 is tropic for bovine endometrial cells and modulates endocrine function. *Reproduction* 2007; 134: 183–197.
- Dosogne H., Hoeben D., Burvenich V., Lohuis JA.** Effect of cephapirin and mecillinam on the phagocytic and respiratory burst activity of neutrophil leukocytes isolated from bovine blood. *J Vet Pharmacol Ther* 1998; 21: 421–427.
- Drillich M., Beetz O., Pfützner A., Sabin M., Sabin HJ., Kutzer P., Nattermann H., Heuwieser W.** Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2001; 84: 2010–2017.
- Drillich M., Pfützner A., Sabin HJ., Sabin M., Heuwieser W.** Comparison of two protocols for the treatment of retained fetal membranes in dairy cattle. *Theriogenology* 2003; 59: 951–960.
- Drillich M., Mahlstedt M., Reichert U., Tenhagen BA., Heuwieser W.** Strategies to improve the therapy of retained fetal membranes in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2006; 89: 627–35.
- Drillich M., Voigt D., Forderung D., Heuwieser W.** Treatment of acute puerperal metritis with flunixin meglumine in addition to antibiotic treatment. *J Dairy Sci* 2007; 90: 3758–3763.

- Drost M., Ambrose JD., Thatcher MJ., Cantrell CK., Wolsdorf KE., Hasler JF., Thatcher WW.** Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology* 1999; 52: 1161-1167.
- Dubey JP., Lindsay DS.** Neospora caninum induced abortion in sheep. *J Vet Diagn Invest* 1990; 2: 230-233.
- Dubey JP., Acland HM., Hamir AN.** Neospora caninum (Apicomplexa) in stillborn goat. *J Parasitol* 1992; 78: 532-534.
- Dubey JP.** Review of Neospora caninum and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.* 2003; 41: 1-16.
- Dubey JP., Schares G., Ortega-Mora LM.** Epidemiology and control of neosporosis and Neospora caninum. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 323-367.
- Dunne LD., Diskin MG., Sreenan JM.** Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Anim Reprod Sci* 2000; 58: 39-44.
- Ealy AD., Drost M., Hansen PJ.** Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J Dairy Sci* 1993; 76: 2899-2905.
- Ealy AD., Arechiga CF., Bray DR., Risco CA., Hansen PJ.** Effectiveness of short-term cooling and vitamin E for alleviation of infertility induced by heat stress in dairy cows. *J Dairy Sci* 1994; 77: 3601-3607.
- Eiler H.** Retained placenta. In: Youngquist, R.S. (Ed.), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. W.B. Saunders Co., 1997 Philadelphia, PA, pp. 340-348.
- Ellington JE., Foote RH., Farrell PB., Hasler JF., Webb J., Henderson WB., McGrath AB.** Pregnancy rates after the use of a gonadotropin releasing hormone agonist in bovine embryo transfer recipients. *Theriogenology* 1991; 36: 1035-1042.
- El-Zarkouny SZ., Cartmill JA., Hensley BA., Stevenson JS.** Pregnancy in dairy cows after synchronized ovulation regimens with or without presynchronization and progesterone. *J Dairy Sci* 2004; 87: 1024-1037.
- Esslemont D., Kossaibati M.** The cost of poor fertility and disease in UK dairy herds. *Dairy Research Report*, 2002.
- Etherington WG., Kelton DF., Adams JE.** Reproductive performance of dairy cows following treatment with fenprostalene, dinoprost, or cloprostenol between 24 and 31 Days post partum: a field trial. *Theriogenology* 1994; 42: 739-752.
- Farin PW., Ball L., Olson JD., Mortimer RG., Jones RL., Adney WS., McChesney AE.** Effect of *Actinomyces pyogenes* and gram-negative anaerobic bacteria on the development of bovine pyometra. *Theriogenology* 1989; 31: 979-989.
- Farin CE., Imakawa K., Roberts RM.** In situ localization of mRNA for the interferon, ovine trophoblast protein-1, during early embryonic development of the sheep. *Mol Endocrinol* 1989; 3: 1099-1107.
- Farin CE., Imakawa K., Hansen JR., McDonnell JJ., Murphy CN., Farin PW., Roberts RM.** Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. *Biol Reprod* 1990; 43: 210-218.
- Farin CE., Farin PW., Piedrahita JA.** Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos. *J Anim Sci* 2004. 82(E-Suppl.): E53-62 Review.
- Farin PW., Piedrahita JA., Farin CE.** Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 2006; 65: 178-191.
- Fernandes C., Alves B., Oliveira E., Viana J., Figueiredo A., Gioso M., Oba E.** Efficiency of different cloprostenol doses in the postpartum period of Zebu (*Bos indicus*) beef

- cows. Proceedings of the XXV WBC, Budapest 2008a; Book of Abstracts, Abst. 855; p. 190
- Fernandes C., Figueiredo A., Alves B., Oliveira E., Viana J., Gioso M.** Use of florfenicol associated or not to Cloprostenol in puerperal disturbances in dairy cows. Proceedings of the XXV WBC, Budapest 2008b; Book of Abstracts, Abst. 857; p. 191.
- Ferre I., Serrano-Martínez E., Martínez A., Osoro K., Mateos-Sanz A., Del-Pozo I., Aduriz G., Tamargo C., Hidalgo CO., Ortega-Mora LM.** Effects of re-infection with *Neospora caninum* in bulls on parasite detection in semen and blood and immunological responses. *Theriogenology* 2008; 69: 905–911.
- Feugang JM., Camargo-Rodríguez O., Memili E.** Culture systems for bovine embryos. *Livestock Sci* 2009; 121: 141–149.
- Fortune JE., Rivera GM., Evans AC., Turzillo AM.** Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod* 2001; 65: 648–654.
- Franco M., Block J., Jousan FD., Castro e Paula LA., Brad AM., Franco JM., Grisel F., Monson RL., Rutledge JJ., Hansen PJ.** Effect of transfer of one or two in vitro-produced embryos and post-transfer administration of gonadotropin releasing hormone on pregnancy rates of heat-stressed dairy cattle. *Theriogenology* 2006a; 66: 224–233.
- Franco M., Thompson PM., Brad AM., Hansen PJ.** Effectiveness of administration of gonadotropin-releasing hormone at Days 11, 14 or 15 after anticipated ovulation for increasing fertility of lactating dairy cows and non-lactating heifers. *Theriogenology* 2006b; 66: 945–954.
- Fray MD., Mann GE., Clarke MC., Charleston B.** Bovine viral diarrhoea virus: its effects on estradiol, progesterone and prostaglandin secretion in the cow. *Theriogenology* 1999; 51: 1533–1546.
- Fray MD., Mann GE., Clarke MC., Charleston B.** Bovine viral diarrhoea virus: its effects on ovarian function in the cow. *Vet Microbiol* 2000; 77: 185–194.
- Fray MD., Mann GE., Bleach EC., Knight PG., Clarke MC., Charleston B.** Modulation of sex hormone secretion in cows by acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Reproduction* 2002; 123: 281–289.
- Frazer GS.** A rational basis for therapy in the sick postpartum cow. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2005; 21: 523–568.
- Fricke PM.** Scanning the future—ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. *J Dairy Sci* 2002; 85: 1918–1926.
- Fricke PM., Guenther JN., Wiltbank MC.** Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology* 1998; 50: 1275–1284.
- Friedrich M., Holtz W.** Establishment of an ELISA for measuring bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum or milk and its application for early pregnancy detection. *Reprod Domest Anim* 2010; 45: 142–146.
- Fujii TU., Kasai N., Nishi SM., Dubey JP., Gennari SM.** Seroprevalence of *Neospora caninum* in female water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the south eastern region of Brazil. *Vet Parasitol* 2001; 99: 331–334.
- Galli C., Lazzari G.** The manipulation of gametes and embryos in farm animals. *Repro Domest Anim* 2008; 43 (Suppl.2): 1–7.
- Galvao KN., Santos JE., Cerri RL., Chebel RC., Rutigliano HM., Bruno RG., Bicalho RC.** Evaluation of methods of resynchronization for insemination in cows of unknown pregnancy status. *J Dairy Sci* 2007; 90: 4240–4252

- Garcia FE., Cordero MJ., Hizarza EA., Peralta OJ., Ortega CM., Cárdenas M., Gutierrez CG., Sánchez TE.** Induction of a new follicular wave in holstein heifers synchronized with norgestomet. *Animal Reprod Sci* 2004; 80: 47–57.
- García-Ispuerto I., Lopez-Gatius F., Santolaria P., Yaniz JL., Nogareda C., Lopez-Bejar M., De Rensis F.** Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. *Theriogenology* 2006; 65: 799–807.
- Garner DL., Seidel GE., Jr.** History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 2008; 69: 886–895.
- Garverick HA.** Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci* 1997; 80: 995–1004.
- Geary TW., Wittier JC., Downing ER., LeFever DG., Silcox RW., Holland MD., Nett TM., Niswender GD.** Pregnancy rates of postpartum beef cows that were synchronized using Syncro-Mate-B or the Ovsynch protocol. *J Anim Sci* 1998; 76: 1523–1527.
- Geary TW., Downing ER., Bruemmer JE., Whittier JC.** Ovarian and estrous response of suckled beef cows to the select synch estrous synchronisation protocol. *Prof Anim Sci* 2000; 16: 1–5.
- Gilbert RO., Shin ST., Guard CL., Erb HN., Frajblat M.** Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 2005; 64: 1879–1888.
- Ginther OJ., Bergfelt DR., Kulick LJ., Kot K.** Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biol Reprod* 2000a; 63: 383–389.
- Ginther OJ., Bergfelt DR., Kulick LJ., Kot K.** Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. *Biol Reprod* 2000b; 62: 920–927.
- Givens MD.** A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenology* 2006; 66: 648–654.
- Givens MD., Marley SD.** Approaches to biosecurity in bovine embryo transfer programs. *Theriogenology* 2008a; 69: 129–136.
- Givens MD., Marley MS.** Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. *Theriogenology* 2008b; 70: 504–507.
- Gondim LF., McAllister MM., Pitt WC., Zemlicka DE.** Coyotes (*Canis latrans*) are definite hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 2004; 34: 159–161.
- Green JA., Parks TE., Avalle MP., Telugu BP., McLain AL., Peterson AJ., McMillan W., Mathialagan N., Hook RR., Xie S., Roberts RM.** The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. *Theriogenology* 2005; 63: 1481–1503.
- Green MP., Hunter MG., Mann GE.** Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2005; 88: 179–189.
- Greve T., Lehn-Jensen H.** The effect of hCG administration on pregnancy rate following non-surgical transfer of viable bovine embryos. *Theriogenology* 1982; 17: 91.
- Groenendaal H., Galligan DT., Mulder HA.** An economic spreadsheet model to determine optimal breeding and replacement decisions for dairy cattle. *J Dairy Sci* 2004; 87: 2146–2157.
- Grooms DL., Brook KV., Pate JL., Day ML.** Changes in ovarian follicles following acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Theriogenology* 1998; 49: 595–605.
- Gröhn YT., Hertl JA., Harman JL.** Effect of early lactation milk yield on reproductive disorders in dairy cows. *A. J Vet Res* 1994; 55: 1521–1528.

- Gupta S., Kumar H., Soni J.** Effect of Vitamin E and selenium supplementation on concentrations of plasma cortisol and erythrocyte lipid peroxides and the incidence of retained fetal membranes in crossbred dairy cattle. *Theriogenology* 2005; 64: 1273-1286.
- Guzelogu A., Erdem H., Saribay MK., Thatcher WW., Tekeli T.** Effect of the administration of flunixin meglumine on pregnancy rates in Holstein heifers. *Vet Rec* 2007; 160: 404-406.
- Guzelogu A., Erdem H., Cinar M., Kilic K., Talmac M., Gorgundur A., Gumen A.** Effect of ketoprofen administration 15 and 16 days after AI on conception rates in lactating dairy cows. *Proceedings of the 16th ICAR, Budapest 2008*; Abst. p. 43.
- Hall CA., Reichel MP., Ellis JT.** Neospora abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet Parasitology* 2005; 128: 231-241
- Hansen PJ.** Effects of environment on bovine reproduction. In: Youngquist RS (ED), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, WB Saunders, Philadelphia, PA, 1997, pp. 403-415.
- Hansen PJ., Drost M., Rivera RM., Paula-Lopes FF., al-Katanani YM., Kringer CE 3rd., Chase CC Jr.** Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology* 2001; 55: 91-103.
- Hansen PJ.** Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 349-360.
- Hatler TB., Hayes SH., Laranja da Fonseca LF., Silvia WJ.** Relationship between endogenous progesterone and follicular dynamics in lactating dairy cows with ovarian follicular cysts. *Biol Reprod.* 2003; 69: 218-223.
- Haugejordan G., Waage S., Dahl E., Karlberg K., Beckers JF., Ropstad E.** Pregnancy associated glycoproteins (PAG) in postpartum cows, ewes, goats and their offspring. *Theriogenology* 2006; 66: 1976-1984.
- Hendricks KE., Bartolome JA., Melendez P., Risco C., Archbald LF.** Effect of repeated administration of PGF2alpha in the early post partum period on the prevalence of clinical endometritis and probability of pregnancy at first insemination in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2006; 65: 1454-1464.
- Hernandez J., Risco C., Donovan A.** Association between exposure to Neospora caninum and milk production in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 219: 632-635.
- Hernandez-Ceron J., Chase CC Jr., Hansen PJ.** Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano and Angus Breeds. *J Dairy Sci* 2004; 87: 53-58.
- Haugejorden G., Waage S., Dahl E., Karlberg K., Beckers JF., Ropstad E.** Pregnancy associated glycoproteins (PAG) in postpartum cows, ewes, goats and their offspring. *Theriogenology* 2006; 66: 1976-1984.
- Huwieser W., Ferguson JD., Guard CL., Foote RH., Warnick LD., Breickner LC.** Relationships between administration of GnRH, body condition score and fertility in Holstein dairy cattle. *Theriogenology* 1994; 42: 703-714.
- Huwieser W., Tenhagen BA., Tischer M., Luhr J., Blum H.** Effect of three programmes for the treatment of endometritis on the reproductive performance of a dairy herd. *Vet Rec* 2000; 146: 338-341.
- Hill J., Gilbert R.** Reduced quality of bovine embryos cultured in media conditioned by exposure to an inflamed endometrium. *Aust Vet J* 2008; 86: 312-316.
- Houe H., Myrup Pedersen K., Meyling A.** The effect of bovine virus diarrhoea virus infection on conception rate. *Prev Vet Med* 1993; 15: 117-123.

- Humblot P.** Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology* 2001; 56: 1417-1433.
- Hussain AM.** Bovine uterine defence mechanisms: a review. *Zentralbl Veterinarmed B* 1989; 36: 641-651.
- Ijaz A., Fahning ML., Zemjanis R.** Treatment and control of cystic ovarian disease in dairy cattle: a review. *Br Vet J* 1987; 143: 226-237.
- Innes EA., Wright S., Bartley P., Maley S., Macalodow C., Esteban-Redondo I., Buxton D.** The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 108: 29-36.
- Innes EA.** The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. *Parasitology* 2007; 134: 1903-1910.
- Jonsson NN., McGowan MR., McGuigan K., Davison TM., Hussain AM., Kafi M., Matschoss A.** Relationships among calving season, heat load, energy balance and postpartum ovulation of dairy cows in a subtropical environment. *Anim Reprod Sci* 1997; 47: 315-326.
- Jolly PD., McDougall S., Fitzpatrick LA., Macmillan KL., Entwistle KW.** Physiological effects of undernutrition on post partum anestrous in cows. *J Reprod Fertil* 1995; Suppl 49: 477-492.
- Kafi M., McGowan MR., Kirkland PD., Jillela D.** The effect of bovine pestivirus infection on the superovulatory response of Friesian heifers. *Theriogenology* 1997; 48: 985-996.
- Kaim M., Bloch A., Wolfenson D., Braw-Tal R., Rosenberg M., Voet H., Folman Y.** Effects of GnRH administered to cows at the onset of estrus on timing of ovulation, endocrine responses and conception. *J Dairy Sci* 2003; 86: 2012-2021.
- Kaneda Y., Domeki I., Kamomae H., Otake M., Watanabe F., Nishikata K., Nakahara T.** Effects of additional injection of hCG on the formation of the corpus luteum and the fertility of estrous synchronized dairy heifers by simultaneous injection of prostaglandin F_{2a} and estradiol ben-zoate. *Jpn J Anim Reprod* 1981; 27: 86-92.
- Kasimanickam R., Duffield TF., Foster RA., Gartley CJ., Leslie KE., Walton JS., Johnson WH.** Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 2004; 62: 9-23.
- Kasimanickam R., Duffield TF., Foster RA., Gartley CJ., Leslie KE., Walton JS., Johnson WH.** The effect of a single administration of cephalirin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis. *Theriogenology*, 2005; 63: 818-830.
- Kastelic JP., Thundathil JC.** Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reprod Domest Anim* 2008; 43 (Suppl.2): 368-373.
- Keister ZO., DeNise SK., Armstrong DV., Ax RL., Brown MD.** Pregnancy outcomes in two commercial dairy herds following hormonal scheduling programs. *Theriogenology* 1999; 51: 1587-1596.
- Kerbler TL., Buhr MM., Jordan LT., Leslie KE., Walton JS.** Relationship between maternal progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 1997; 47: 703-714.
- Kharcho SD., Srivastava SK.** Dose dependent effect of GnRH analogue on pregnancy rate of repeat breeder crossbred cows. *Anim Reprod Sci* 2007; 99: 196-201.
- Kindahl H., Ondensvik K., Aiumlamai S., Fredriksson G.** Utero-ovarian relationships during the bovine postpartum period. *Anim Reprod Sci* 1992; 28: 363-369.
- Kornmatitsuk B., Chantaratpeep P., Kornmatitsuk S., Kindahl H.** Different types of postpartum luteal activity affected by the exposure of heat stress and subsequent

- reproductive performance in Holstein lactating cows. *Reprod Domest Anim* 2008; 43: 515–519.
- Lamming GE, Darwash AO, Back HL** Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality. *J Reprod Fertil* 1989; Suppl 37: 245–252.
- Lane EA, Austin EJ, Crowe MA** Oestrous synchronisation in cattle—current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food-producing animals: a review. *Anim Reprod Sci* 2008; 109: 1–16.
- LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH** Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci* 2002a; 85: 2223–2236.
- LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH** The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci* 2002b; 85: 2237–2249.
- LeBlanc SJ, Herdt TH, Seymour WM, Duffield TF, Leslie KE** Peripartum serum vitamin E, retinol, and beta-carotene in dairy cattle and their associations with disease. *J Dairy Sci* 2004; 87: 609–619.
- LeBlanc SJ** Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *Vet J* 2008; 176: 102–114.
- Lee CN, Maurice E, Ax RL, Pennington JA, Hoffman WF, Brown MD** Efficacy of gonadotropin-releasing hormone administered at the time of artificial insemination of heifers and postpartum repeat breeder dairy cows. *Am J Vet Res* 1983; 44: 2160–2163.
- Lewis GS, Caldwell DW, Rexroad CE Jr, Dowlen HH, Owen JR** Effect of gonadotropin-releasing hormone and human chorionic gonadotropin on pregnancy rate in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1990; 73: 66–72.
- Lewis GS** Uterine health and disorders. *J Dairy Sci* 1997; 80: 984–994.
- Lewis GS** Steroidal regulation of uterine immune defenses. *Anim Reprod Sci* 2004; 82–83: 281–294.
- Lincke A, Drillich M, Heuwieser W** Subclinical endometritis in dairy cattle and its effect on fertility – a review of recent publications. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2007; 120: 245–250.
- Lindsay DS, Kelly EJ, McKown RD, Stein FJ, Plozer J, Herman J, Blagburn BL, Dubey JP** Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. *J Parasitol* 1996; 82: 657–659.
- Lindsay DS, Spencer J, Rupprecht C, Blagburn BL** Prevalence of agglutinating antibodies to *Neospora caninum* in raccoons, *Procyon lotor*. *J Parasitol* 2001; 87: 1197–1198.
- Loneragan P, Fair T** In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology* 2008; 69: 17–22.
- Looney CR, Nelson JS, Schneider HJ, Forrest DW** Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology* 2006; 65: 201–209.
- Lopez H, Satter LD, Wiltbank MC** Relationship between level of milk production and estrus behavior of lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2004; 81: 209–223.
- Lopez H, Caraviello DZ, Satter LD, Fricke PM, Wiltbank MC** Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2005; 88: 2783–2793.

- Lopez-Gatius F., Lopez-Bejar M.** Reproductive performance of dairy cows with ovarian cysts after different GnRH and cloprostenol treatments. *Theriogenology* 2002; 58: 1337-1348.
- Lopez-Gatius F., Santolaria P., Martino A., Delatang F., De Rensis F.** The effects of GnRH treatment at the time of AI and 12 days later on reproductive performance of high producing dairy cows during the warm season in northeastern Spain. *Theriogenology* 2006; 65: 820-830.
- Lopez-Gatius F., Hunter RH., Garbayo JM., Santolaria P., Yaniz J., Serrano B., Ayad A., de Sousa NM., Beckers JF.** Plasma concentrations of pregnancy-associated glycoprotein-1 (PAG-1) in high producing dairy cows suffering early fetal loss during the warm season. *Theriogenology* 2007; 67: 1324-1330.
- Lucaci E.** Effects of flunixin meglumine (FM) on reproductive events in fixed timed artificial inseminated cows. Proceedings of the 16th ICAR, Budapest 2008, Abstr. P. 50.
- Lynch R A., Alexander BM., R. G. Sasser.** The cloning and expression of the pregnancy-specific protein B. *Biol Reprod* 1992; 46 (Suppl. 1):72. (Abstr.).
- Macmillan KL., Taufa VK., Day AM.** Effects of an agonist of gonadotrophin releasing hormone (Buserelin) in cattle III. Pregnancy rates after a post-insemination injection during metoestrus or dioestrus. *Anim Reprod Sci* 1986; 11: 1-10.
- Macmillan KL., Laen IJ., Westwood CT.** The effects of lactation on the fertility of dairy cows. *Aust Vet J* 1996; 73: 141-147.
- Malayer JR., Hansen PJ.** Differences between Brahman and Holstein cows in heat-shock induced alterations of protein synthesis and secretion by oviducts and uterine endometrium. *J Anim Sci* 1990; 68: 266-280.
- Mann GE., Lamming GE., Fray MD.** Plasma oestradiol and progesterone during early pregnancy in the cow and the effects of treatment with buserelin. *Anim Reprod Sci* 1995; 37: 121-131.
- Mann GE., Mann SJ., Lamming GE.** The interrelationship between the maternal hormone environment and the embryo during the early stages of pregnancy. *J Reprod Fertil* 1996; Abstr Series 17: 55.
- Mann GE., Lamming GE., Fisher PA.** Progesterone control of embryonic interferon- τ production during early pregnancy in the cow. *J Reprod Fertil* 1998; Abst Series 21: 37.
- Mann GE., Lamming GE., Robinson RS., Wathes DC.** The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl* 1999; 54: 317-328.
- Mann GE., Payne JH., Lamming GE.** Hormonal regulation of oxytocin-induced prostaglandin F(2alpha) secretion by the bovine and ovine uterus in vivo. *Domest Anim Endocrinol* 2001; 21: 127-141.
- Mapletoft RJ., Hasler JF.** Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev Sci Tech* 2005; 24: 393-403.
- Matsui M., Shimada A., Yagi K., Kida K., Miyamoto A., Miyake YI.** The characteristics of ovarian function and endocrine status in pregnant cows during early period after insemination. Proceedings of the 16th ICAR, Budapest 2008; Abst. p. 52.
- McDougall S., Cullum AA., Anniss FM., Rhodes FM.** Treatment of anovulatory anoestrus postpartum dairy cows with a gonadotrophin-releasing hormone (GnRH), prostaglandin F_{2 α} GnRH regimen or with progesterone and oestradiol benzoate. *N.Z. Vet. J.* 2001; 49: 168-172.

- McDougal S., Compton CW., Anniss FM.** Effect of exogenous progesterone and oestradiol on plasma progesterone concentrations and follicle wave dynamics in anovulatory anoestrous post-partum dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 2004; 84: 303-314.
- McGowan MR., Kirkland PD., Richards SG., Littlejohns IR.** Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. *Vet Rec* 1993; 133: 39-43.
- McGowan MR., Kafi M., Kirkland PD., Kelly H., Bieleferdt-Ohmann H., Occhio MD., Jillella D.** Studies of the pathogenesis of bovine pestivirus-induced ovarian dysfunction in superovulated dairy cattle. *Theriogenology* 2003; 59: 1051-1066.
- McMillan WH.** Statistical models predicting embryo survival to term in cattle after embryo transfer. *Theriogenology* 1998; 50: 1053-1070.
- Mee MO, Stevenson JS, Sooby RK, Folman Y.** Influence of gonadotropin-releasing hormone and timing of insemination relative to estrus on pregnancy rates of dairy cattle at first service. *J Dairy Sci* 1990; 73: 1500-1507.
- Mee MO., Stevenson JS., Alexander BM., Sasser RG.** Administration of GnRH at estrus influences pregnancy rates, serum concentrations of LH, FSH, estradiol 17 beta, pregnancy-specific protein B, and progesterone, proportion of luteal cell types, and in vitro production of progesterone in dairy cows. *J Anim Sci* 1993; 71: 185-198.
- Mee JF., Ryan DP., Condon T.** Ultrasound diagnosis of pregnancy in cattle. *Vet Rec* 1994; 134: 532.
- Mejia ME., Lacau-Mengido IM.** Endometritis treatment with a PGF2alpha analog does not improve reproductive performance in a large dairy herd in Argentina. *Theriogenology* 2005; 63: 1266-1276.
- Melendez P., Gonzalez G., Aguilar E., Loera O., Risco C., Archbald LF.** Comparison of two estrus-synchronization protocols and timed artificial insemination in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2006; 89: 4567-4572.
- Merrill ML., Ansotegui RP., Burns PD., MacNeil MD., Geary TW.** Effects of flunixin meglumine and transportation on establishment of pregnancy in beef cows. *J. Anim. Sci.* 2007; 85: 1547-1554.
- Mihm M., Deletang F., Roche JF.** The gonadotrophin and ovarian response to an intermediate or low dose of gonadorelin in beef heifers: influence of dose, follicle status and progesterone environment. *J Reprod Fertil Abstr Ser* 1998; 21: 74.
- Mihm M., Bleach EC.** Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci* 2003; 78: 217-237.
- Mihm M., Evans AC.** Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. *Reprod Domest Anim* 2008; 43 (Suppl. 2): 48-56.
- Moreira F., Orlandi C., Risco CA., Mattos R., Lopes F., Thatcher WW.** Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2001; 84: 1646-1659.
- Morgan WF., Lean JI.** Gonadotrophin-releasing hormone treatment in cattle: a meta-analysis of the effects on conception at the time of insemination. *Austral Vet J* 1993; 70: 205-209.
- Morton H., Hegh V., Clunie GJ.** Studies of rosette inhibition test in pregnant mice: evidence of immunosuppression? *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1976; 193: 413-419.
- Morton JM., Tranter WP., Mayer DG., Jonsson NN.** Effects of environmental heat on conception rates in lactating dairy cows: critical periods of exposure. *J Dairy Sci* 2007; 90: 2271-2278.

- Murray RD., Allison JD., Gard RP.** Bovine endometritis: comparative efficacy of alfaprostol and intrauterine therapies, and other factors influencing clinical success. *Vet Rec* 1990; 127: 86-90.
- Nakao T., Gama A., Osawa T., Nakada K., Moriyoshi M., Kawata K.** Postpartum plasma PGF metabolite profile in cows with dystocia and/or retained placenta, and effect of fenprostalene on uterine involution and reproductive performance. *J Vet Med Sci* 1997; 59: 791-794.
- Nancarrow CD., Wallace AL., Grewal AS.** The early pregnancy factor of sheep and cattle. *J Reprod Fertil* 1981; (Suppl.) 30: 191-199.
- Nebel RL., Jobst SM.** Symposium: Gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin for estrus detection. Evaluation of systematic breeding programs for lactating dairy cows: a review. *J Dairy Sci* 1998; 81: 1169-1174.
- Nishigai M., Takamura A., Kamomae H., Tanaka T., Kaneda Y.** The effect of human chorionic gonadotropin on the development and function of bovine corpus luteum. *J Reprod Dev* 2001; 47: 283-294.
- Nishigai M., Kamomae H., Tanaka T., Kaneda Y.** Improvement of pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 2002; 58: 1597-1606.
- Nobel RL., Jobst SM., Dransfield MB., Pandolfi SM., Balley TL.** The use of radio frequency data communication system, Heat Watch, to describe behavioural estrus in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1997; 179 (abstract).
- Olynk NJ., Wolf CA.** Economic Analysis of Reproductive Management Strategies on US Commercial Dairy Farms. *J Dairy Sci* 2008; 91:4082-4091.
- Olynk NJ., Wolf CA.** Stochastic economic analysis of dairy cattle artificial insemination reproductive management programs. *J Dairy Sci* 2009; 92: 1290-1299.
- Opsomer G., Mijten P., Coryn M., de Kruif A.** Post-partum anoestrus in dairy cows: a review. *Vet Q* 1996; 18: 68-75.
- Opsomer G., Grohn YT., Hertl J., Coryn M., Deluyker H., de Kruif A.** Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology* 2000; 53: 841-857.
- Padula AM., Borman JM., Wright PJ., Macmillan KL.** Restoration of LH output and 17beta-oestradiol responsiveness in acutely ovariectomised holstein dairy cows pre-treated with a GnRH agonist (deslorelin) for 10 days. *Anim Reprod Sci* 2002; 70: 49-63.
- Padula AM., Macmillan KL.** Oestradiol-17beta responsiveness, plasma LH profiles, pituitary LH and FSH concentrations in long-term ovariectomised Holstein cows at 24h, 48h and 21 days following treatment with an absorbable GnRH agonist implant. *Anim Reprod Sci* 2005; 85: 27-39.
- Pancarci SM., Jordan ER., Risco CA., Schouten MJ., Lopes FL., Moreira F., Thatcher WW.** Use of estradiol cypionate in a presynchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. *J Dairy Sci* 2002; 85: 122-131.
- Paula-Lopes FF, Chase CC Jr, Al-Katanani YM, Kringer CE 3rd, Rivera RM, Tekin S, Majewski AC, Ocon OM, Olson TA, Hansen PJ.** Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction* 2003; 125: 285-294.
- Peter AT., Vos PL., Ambrose DJ.** Postpartum anestrus in dairy cattle. *Theriogenology* 2009; 71: 1333-1342.

- Peters AR, Drew SB, Mann GE, Lamming GE, Beck NF.** Experimental and practical approaches to the establishment and maintenance of pregnancy. *J Physiol Pharmacol* 1992; 43 (4 Suppl 1): 143–152.
- Peters AR, Ward SJ, Warren MJ, Gordon PJ, Mann GE, Webb R.** Ovarian and hormonal responses of cows to treatment with an analogue of gonadotrophin releasing hormone and prostaglandin F2 alpha. *Vet Rec* 1999; 27: 343–346.
- Peters AR, Martinez TA, Cook AJ.** A meta-analysis of studies of the effect of GnRH 11–14 days after insemination on pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 2000; 54: 1317–1326.
- Peterson AJ, Lee RS.** Improving successful pregnancies after embryo transfer. *Theriogenology* 2003; 59: 687–697
- Petrunkina AM, Waberski D, Gunzel-Apel AR, Topfer-Petersen E.** Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction* 2007; 134: 3–17.
- Phatak AP, Whitmore HL, Brown MD.** Effect of gonadotrophin-releasing hormone on conception rate in repeat-breeder dairy cows. *Theriogenology* 1986; 26: 605–609.
- Pieterse MC, Szenci O, Willemsse AH, Bajcsy CS, Dieleman SJK, Taverne MA.** Early pregnancy diagnosis in cattle by means of linear-array real-time ultrasound scanning of the uterus and a qualitative and quantitative milk progesterone test. *Theriogenology* 1990; 33: 697–707.
- Pösö J, Mäntysaari EA.** Genetic relationships between reproductive disorders, operational days open and milk yield. *Livest Prod Sci* 1996; 46: 41–48.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC.** Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. *Theriogenology* 1995; 44: 915–923.
- Pursley JR, Kosorok MR, Wiltbank M.C.** Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J Dairy Sci* 1997; 80: 301–306.
- Rabiee AR, Lean IJ, Stevenson MA.** Efficacy of Ovsynch program on reproductive performance in dairy cattle: a meta-analysis. *J Dairy Sci* 2005; 88: 2754–2770.
- Rajamahendran R, Sianangama PC.** Effect of human chorionic gonadotrophin on dominant follicles in cows: formation of accessory corpora lutea, progesterone production and pregnancy rates. *J Reprod Fertil* 1992; 95: 577–584.
- Rhoads ML, Rhoads RP, Gilbert RO, Toole R, Butler WR.** Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. *Animal Reprod Sci* 2006; 91: 1–10.
- Rhodes FM, Burke CR, Clark BA, Day ML, Macmillan KL.** Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicle turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. *Anim Reprod Sci* 2002; 69: 139–150.
- Robert A, Beaudeau F, Seegers H, Joly A, Philipot JM.** Large scale assessment of the effect associated with bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy cows in 6149 dairy herds in Brittany (Western France). *Theriogenology* 2004; 61: 117–127.
- Robinson RS, Mann GE, Lamming GE, Wathes DC.** The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow. *J Endocrinol* 1999; 160: 21–33.
- Robinson RS, Hammond AJ, Wathes DC, Hunter MG, Mann GE.** Corpus luteum–endometrium–embryo interactions in the dairy cow: underlying mechanisms and clinical relevance. *Reprod Domest Anim* 2008; 43 (Suppl. 2): 104–112.

- Roche JF., Boland MP., McGeady TA.** Reproductive wastage following artificial insemination of heifers. *Vet Rec* 1981; 109: 401-404.
- Roelofs JB., Graat EA., Mullaart E., Soede NM., Voskamp-Harkema W., Kemp B.** Effects of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. *Theriogenology* 2006; 66: 2173-2181.
- Romano JE., Thompson JA., Kraemer DC., Westhusin ME., Forrest DW., Tomaszewski MA.** Early pregnancy diagnosis by palpation per rectum: Influence on embryo/fetal viability in dairy cattle. *Theriogenology* 2007; 67: 486-493.
- Romero JJ., Perez E., Frankena K.** Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. *Vet Parasitol* 2004; 123: 149-159.
- Romero JJ., Breda VS., Vargas B., Dolz G., Frankena K.** Effect of neosporosis on productive and reproductive performance of dairy cattle in Costa Rica. *Theriogenology* 2005; 64: 1928-1939.
- Ronchi B., Stradaoli G., Verini Supplizi A., Bernabuci U., Lacetera N., Accorsi PA.** Influence of heat stress or feed restriction on plasma progesterone, oestradiol 17-Beta, LH, FSH, prolactin and cortisol in Holstein Heifers. *Livestock Prod Sci* 2001; 68: 231-241.
- Rosenberg M., Chun SY., Kaim M., Herz Z., Folman Y.** The effect of GnRH administered to dairy cows during oestrus on plasma LH and conception in relation to the time of treatment and insemination. *Anim Reprod Sci* 1991; 24: 13-24.
- Roth Z., Meidan R., Braw-Tal R., Wolfenson D.** Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *J Reprod Fert* 2000; 120: 83-90.
- Roth Z., Meidan R., Shaham-Albalancy A., Braw-Tal R., Wolfenson D.** Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction* 2001a; 121: 745-751.
- Roth Z., Arav A., Bor A., Zeron Y., Braw-Tal R., Wolfenson D.** Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction* 2001b; 122: 737-744.
- Rukkwamsuk T., Wensing T., Kruip TA.** Relationship between triacylglycerol concentration in the liver and first ovulation in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 1998; 51: 1133-1142.
- Rutledge JJ.** Use of embryo transfer and IVF to bypass effects of heat stress. *Theriogenology* 2001; 55: 105-111.
- Ryan DP., Prichard JF., Kopel E., Godke RA.** Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cool seasons of the year. *Theriogenology* 1993; 39: 719-737.
- Saacke RG.** Insemination factors related to timed AI in cattle. *Theriogenology* 2008; 70: 479-484.
- Sakonju I., Enomoto S., Kamimura S., Hamana K.** Monitoring bovine embryo viability with early pregnancy factor. *J Vet Med Sci* 1993; 55: 271-274.
- Sangsrivong S., Combs DK., Sartori R., Armentano LE., Wiltbank MC.** High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and oestradiol-17beta in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2002; 85: 2831-2842.
- Santos JE., Thatcher WW., Pool L., Overton MW.** Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *J Anim Sci* 2001; 79: 2881-2894.
- Santos JE., Bartolome JA., Cerri RL., Juchem SO., Hernandez O., Trigg T., Thatcher WW.** Effect of a deslorelin implant in a timed artificial insemination protocol on follicle

- development, luteal function and reproductive performance of lactating dairy cows. *Theriogenology* 2004; 61: 421-435.
- Sartori R., Sartor-Bergfeldt R., Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC.** Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating dairy cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 2002a; 85: 2803-2812.
- Sartori R., Rosa GJ, Wiltbank MC.** Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 2002b; 85: 2813-2822.
- Scherzer J., Fayrer-Hosken RA, Ray L, Hurley DJ, Heusner GL.** Advancements in large animal embryo transfer and related biotechnologies. *Reprod Domest Anim* 2008; 43: 371-376.
- Schmitt EJ, Diaz T, Barros CM, de la Sota RL, Drost M, Fredriksson EW, Staples CR, Thorne R, Thatcher WW.** Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. *J Anim Sci* 1996a; 74: 1074-1083.
- Schmitt EJ, Barros CM, Fields PA, Fields MJ, Diaz T, Kluge JM, Thatcher WW.** A cellular and endocrine characterization of the original and induced corpus luteum after administration of gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin on day five of the estrous cycle. *J Anim Sci* 1996b; 74: 1915-1929.
- Schmitz W., Driancourt MA, Hoppe S, Friedrich M, Erhardt G, Gaulty M, Holtz W, Schmitz W.** A modified co-synch protocol for timed artificial insemination in beef cattle. *Abst. Proc. 16th ICAR, 2008, Budapest.*
- Sedlak K., Bartova E.** Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. *Vet Parasitol* 2006; 136: 223-231.
- Seidel GE Jr.** Overview of sexing sperm. *Theriogenology* 2007; 68: 443-446.
- Serrano-Martinez E., Ferre I, Martinez A, Osoro K, Mateos-Sanz A, Del-Pozo I, Aduriz G, Tamargo C, Hidalgo CO, Ortega-Mora LM.** Experimental neosporosis in bulls: Parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. *Theriogenology* 2007; 67: 1175-1184.
- Sheldon IM, Noakes DE.** Comparison of three treatments for bovine endometritis. *Vet Rec* 1998; 142:575-579.
- Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, Dobson H.** Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction* 2002; 123: 837-845.
- Sheldon IM, Rycroft AN, Zhou C.** Association between postpartum pyrexia and uterine bacterial infection in dairy cattle. *Vet Rec* 2004a; 154: 289-293.
- Sheldon IM, Dobson H.** Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci* 2004b; 82-83: 295-306.
- Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Dobson H.** Effect of intrauterine administration of oestradiol on postpartum uterine bacterial infection in cattle. *Anim Reprod Sci* 2004c; 81: 13-23.
- Sheldon IM, Bushnell M, Montgomery J, Rycroft AN.** Minimum inhibitory concentrations of some antimicrobial drugs against bacteria causing uterine infections in cattle. *Vet Rec* 2004d; 155: 383-387.
- Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO.** Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* in 2006; 65: 1516-1530.

- Sheldon IM., Williams EJ., Miller AN., Nash DM., Herath S.** Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet J* 2008; 176: 115–121.
- Shephard R.** Investigation of a whole herd controlled breeding program using GnRH and prostaglandin in commercial seasonally-calving dairy herds. *Aust Cattle Vet* 2002; 23: 24–28.
- Shrestha HK., Nakao T., Suzuki T., Higaki T., Akita M.** Effects of abnormal ovarian cycles during pre-service period postpartum on subsequent reproductive performance of high-producing Holstein cows. *Theriogenology* 2004; 61: 1559–1571.
- Sianangama PC., Rajamahendran R.** Effect of human chorionic gonadotropin administered at specific times following breeding on milk progesterone and pregnancy in cows. *Theriogenology* 1992; 38: 85–96.
- Singh J., Murray RD., Mshelia G., Woldehiwet Z.** The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. *Vet J* 2008; 175: 301–309.
- Silva E., Sterry RA., Kolb D., Mathialagan N., McGrath MF., Ballam JM., Fricke PM.** Accuracy of a pregnancy-associated glycoprotein ELISA to determine pregnancy status of lactating dairy cows twenty-seven days after timed insemination. *J Dairy Sci* 2007; 90: 4612–4622.
- Silva JR., Figueiredo JR., van den Hurk R.** Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology* 2009; 71: 1193–1208.
- Silvia WJ., Lewis GS., McCracken JA., Thatcher WW., Wilson L Jr.** Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F₂alpha during luteolysis in ruminants. *Biol Reprod* 1991; 45: 655–663.
- Silvia WJ., Hatler TB., Nugent AM., Laranja da Fonseca LF.** Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 23: 167–177.
- Sirard MA., Coenen K.** In vitro maturation and embryo production in cattle. *Methods Mol Biol* 2006; 348: 35–42.
- Skarzynski DJ., Ferreira-Dias G., Okuda K.** Regulation of luteal function and corpus luteum regression in cows: hormonal control, immune mechanisms and intercellular communication. *Reprod Domest Anim* 2008; 43 (Suppl. 2): 57–65.
- Small JA., Ambrose JD., McCaughey WP., Ward DR., Sutherland WD., Glover ND., Rajamahendran R.** The effects of gonadotrophin releasing hormone in prostaglandin F₂ alpha-based timed insemination programs for beef cattle. *Can J Anim Sci* 2001; 81: 335–343.
- Sousa NM., Ayad A., Beckers JF., Gajewski Z.** Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) as pregnancy markers in the ruminants. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 (Suppl.8): 153–171.
- Ssentongo YK., Johnson RH., Smith JR.** Association of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus with ovaritis in cattle. *Aust Vet J* 1980; 56: 272–273.
- Sterry RA., Welle ML., Fricke PM.** Treatment with gonadotropin-releasing hormone after first timed artificial insemination improves fertility in noncycling lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2006; 89: 4237–4245.
- Stevens RD., Dinsmore RP., Cattell MB.** Evaluation of the use of intrauterine infusions of oxytetracycline, subcutaneous injections of fenprostalene, or a combination of both, for the treatment of retained fetal membranes in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* 1995; 207: 1612–1615.

- Stevenson JL, Dalton JC, Santos JE, Sartori R, Ahmadzadeh A, Chebel RC.** Effect of synchronization protocols on follicular development and estradiol and progesterone concentrations of dairy heifers. *J Dairy Sci* 2008; 91: 3045–3056.
- Stevenson JS, Frantz KD, Call EP.** Conception rates in repeat-breeders and dairy cattle with unobserved estrus after prostaglandin F(2) alpha and gonadotropin-releasing hormone. *Theriogenology* 1988; 29: 451–460.
- Stevenson JS, Phatak AP, Call EP, Scooby RK.** Double insemination and GnRH treatment of repeat breeding Holsteins. *J Dairy Sci* 1989; Suppl 72: 352.
- Stevenson JS, Call EP, Scooby RK, Phatak AP.** Double insemination and gonadotropin-releasing hormone treatment of repeat-breeding dairy cattle. *J Dairy Sci* 1990; 73: 1766–1772.
- Stevenson JS, Kobayashi Y, Thompson KE.** Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including Ovsynch and combination of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F_{2α}. *J Dairy Sci* 1999; 82: 506–515.
- Stevenson JS, Smith JF, Hawkins DE.** Reproductive outcomes for dairy heifers treated with combinations of prostaglandin F_{2α}, norgestomet and gonadotropin-releasing hormone. *J Dairy Sci* 2000a; 83: 2008–2015.
- Stevenson JS, Thompson KE, Forbes WL, Lamb GC, Grieger DM, Corah LR.** Synchronizing estrus and (or) ovulation in beef cows after combinations of GnRH, norgestomet, and prostaglandin F_{2α} with or without timed insemination. *J Anim Sci* 2000b; 78: 1747–1758.
- Stevenson JS, Tiffany SM, Lucy MC.** Use of estradiol cypionate as a substitute for GnRH in protocols for synchronizing ovulation in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2004; 87: 3298–3305.
- Stevenson JS, Pursley JR, Garverick HA, Fricke PM, Kesler DJ, Ottobre JS, Wittbank MC.** Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. *J Dairy Sci* 2006; 89: 2567–2578.
- Thatcher WW, Meyer MD, Danet-Desnoyers G.** Maternal recognition of pregnancy. *J Reprod Fertil* 1995; Suppl 49: 15–28.
- Thomas JC.** Induced abortion – a therapeutic disaster. Proceedings of the AACV Pan Pacific Conference; Sydney 1991: 35–36.
- Thompson KE, Stevenson JS, Lamb GC, Grieger DM, Loest CA.** Follicular, hormonal, and pregnancy responses of early postpartum suckled beef cows to GnRH, norgestomet, and prostaglandin F_{2α}. *J Anim Sci* 1999; 77: 1823–1832.
- Tieman JC, Rodrigues AA, de Souza SL, Duarte JM, Gennari SM.** Occurrence of anti-Neospora caninum antibodies in Brazilian cervids kept in captivity. *Vet Parasitol* 2005; 129: 341–343.
- Todoroki J, Yamakuchi H, Mizoshita K, Kubota N, Tabara N, Noguchi J, Kikuchi K, Watanabe G, Taya K, Kaneko H.** Restoring ovulation in beef donor cows with ovarian cysts by progesterone-releasing intravaginal silastic devices. *Theriogenology* 2001; 55: 1919–1932.
- Twagiramungu H, Guilbault LA, Proulx J, Villeneuve P, Dufour JJ.** Influence of an agonist of gonadotropin-releasing hormone (buserelin) on estrus synchronization and fertility in beef cows. *J Anim Sci* 1992; 70: 1904–1910.
- Ullah G, Fuquay JW, Keawkhong T, Clark BL, Pogue DE, Murphey EJ.** Effect of gonadotropin-releasing hormone at estrus on subsequent luteal function and fertility in lactating Holsteins during heat stress. *J Dairy Sci* 1996; 79: 1950–1953.

- Vanholder T., Opsomer G., de Kruijff A.** Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod Nutr Dev* 2006a; 46: 105-119.
- Vanholder T., Leroy JL, Van Soom A., Coryn M., de Kruijff A., Opsomer G.** Effects of beta-OH butyrate on bovine granulosa and theca cell function in vitro. *Reprod Domest Anim* 2006b; 41: 39-40.
- Vasconcelos JL, Silcox RW., Lacerda JA, Pursley JR., Wiltbank MC.** Pregnancy rate, pregnancy loss, and response to heat stress after AI at two different times from ovulation in dairy cows. *Biol. Reprod.* 1997; 56 (Suppl 1): 140. (Abstr.).
- Vasconcelos JL, Silcox RW., Rosa GJ., Pursley JR., Wiltbank MC.** Synchronisation rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 1999; 52: 1067-1078.
- Vasconcelos JL, Demetrio DG., Santos RM., Chiari JR, Rodrigues CA., Sa Filho OG.** Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology* 2006; 65: 192-200.
- Vasconcelos JLM, Sa Filho OG., Campos Perez G., Takiguchi Nogueira Silva A.** Intravaginal progesterone device and/or temporary weaning on reproductive performance of anestrous crossbred Angus × Nelore cows. *Anim Reprod Sci* 2009; 111: 302-311.
- Wathes DC., Lammig GE.** The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl* 1995; 49: 53-67.
- White CR, Keister ZO., McCauley TC., AX RL.** Hormonal therapy in dairy cows: Five ways to improve reproductive efficiency. *Vet Med* 1996; 6: 571-575.
- Willard S., Gandy S., Bowers S., Graves K., Elias A., Whisnant C.** The effects of GnRH administration postinsemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. *Theriogenology* 2003; 59: 1799-1810.
- Williams SW., Stanko RL., Amstalden M., Williams GL.** Comparison of three approaches for synchronization of ovulation for timed artificial insemination in Bos indicus-influenced cattle managed on the Texas gulf coast. *J Anim Sci* 2002; 80: 1173-1178.
- Wiltbank MC., Gumen A., Sartori R.** Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 2002; 57: 21-52.
- Wiltbank M., Lopez H., Sartori R., Sangsritavong S., Gumen A.** Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 2006; 65: 17-29.
- Wolf D., Schares G., Cardenas O., Huanca W., Cordero A., Barwald A., Conraths FJ., Gaulty M., Zahner H., Bauer C.** Detection of specific antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in naturally infected alpacas (*Lama pacos*), llamas (*Lama glama*) and vicuñas (*Lama vicugna*) from Peru and Germany. *Vet Parasitol* 2005; 130: 81-87.
- Wolfenson D., Lew BJ., Thatcher WW., Graber Y., Meidan R.** Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Anim Reprod Sci* 1997; 47: 9-19.
- Wolfenson D., Roth Z., Meidan R.** Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 535-547.
- Wolfenson D., Sonogo H., Bloch A., Shaham-Albalancy A., Kaim M., Folman Y., Meidan R.** Seasonal differences in progesterone production by luteinized bovine thecal and granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol* 2002 ; 22: 81-90.

- Xie SC., Low BG., Nagel RJ., Kramer KK., Anthony RV., Zoli AP., Beckers JF., Roberts RM.** Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10247–10251.
- Xu ZZ., Verkerk GA., Mee JF., Morgan SR., Clark BA., Burke CR., Burton LJ.** Progesterone and follicular changes in postpartum noncyclic dairy cows after treatment with progesterone and estradiol or with progesterone, GnRH, PGF2alpha and estradiol. *Theriogenology* 2000; 54: 273–282.
- Yavas Y., Walton JS.** Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: a review. *Theriogenology* 2000a; 54: 1–23.
- Yavas Y., Walton JS.** Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology* 2000b; 54: 25–55.
- Younas M., Fuquay JW., Smith AE., Moore AB.** Estrous and endocrine responses of lactating Holsteins to forced ventilation during summer. *J Dairy Sci* 1993; 76: 430–436.
- Zerbe H., Schneider N., Leibold W., Wensing T., Krup TA., Schuberth HJ.** Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. *Theriogenology* 2000; 54: 771–786.
- Zerbe H., Ossadnik C., Leibold W., Schuberth HJ.** Influence of *Escherichia coli* and *Arcanobacterium pyogenes* isolated from bovine puerperal uteri on phenotypic and functional properties of neutrophils. *Vet Microbiol* 2001; 79: 351–365.
- Zerbe H., Ossadnik C., Leibold W., Schuberth HJ.** Lochial secretions of *Escherichia coli* – or *Arcanobacterium pyogenes*–infected bovine uteri modulate the phenotype and the functional capacity of neutrophilic granulocytes. *Theriogenology* 2002; 57: 1161–1177

Confidential