

分娩後乳牛の初回排卵に係わる性腺刺激ホルモン

分泌調節に関する研究

角川博哉

目次

第1章 緒論	3
第2章 分娩後初回排卵に関連する血中マーカー	7
材料と方法	9
結果	11
考察	12
表および図	14
小括	22
第3章 分娩後早期乳牛における性腺刺激ホルモン（LH）分泌調節	23
実験1 GnRH投与によるLH分泌反応	25
材料と方法	25
結果	27
考察	27
表および図	30
実験2 プロピレングルコール投与による血中LH濃度の変動	33
材料と方法	33
結果	35
考察	36
表および図	39
実験3 FFA投与による血中LH濃度の変動	42
材料と方法	42
結果	44
考察	45
表および図	47

実験 4 エストロゲンレセプターアンタゴニスト投与による血中 LH 濃度の	
変動	50
材料と方法	50
結果	52
考察	54
表および図	56
実験 5 オピオイドレセプターアンタゴニスト投与による血中 LH 濃度の変動	
	60
材料と方法	60
結果	62
考察	63
表および図	65
小括	68
第 4 章 総括ならびに結論	71
謝辞	77
引用文献	79

第 1 章

緒論

乳牛では、初回排卵が遅延しない個体は初回排卵後の繁殖成績も良好で分娩間隔が短い傾向にあることが知られている(Thatcher, 1973、Roche, 2000)。分娩から初回排卵までの日数が適切な範囲にあること、すなわち分娩後の初回排卵を自然に誘起させ遅延させないことが重要であるとされ(Thatcher, 1973、Roche, 2000)、乳牛の分娩間隔は 12～13 ヶ月が最も経済的であると報告されている (Dekker, 1998)。一方、ホルスタイン種乳牛に認められる主要な繁殖障害の一つである卵巢静止や卵胞嚢腫の大部分は、分娩後初回排卵前に発現し、分娩から初回排卵までの日数を延長させるとともに、低受胎率の原因となる (Kestler, 1979、Kestler, 1982)。またその結果として分娩間隔を延長させる (Kestler, 1979、Kestler, 1982)。したがって、初回排卵遅延牛の多い群に対しては平均分娩間隔を 12～13 ヶ月に調整するため、ホルモン剤を用いた排卵促進治療等が必要となる (Darwash, 2001)。

卵巢における排卵の誘起には、卵胞発育を刺激する卵胞刺激ホルモン (以下、FSH) と、排卵過程そのものを誘発させる性腺刺激ホルモン (以下、LH) の分泌調節が重要である。しかしながら、分娩から初回排卵までの時期に血中および下垂体中の FSH 量に変化は認められていないため (Nett, 1988、Crowe, 1998)、初回排卵に対して FSH は制限要因ではなく、LH の分泌調節が重要と考えられている。とくに未成熟卵胞を排卵可能な大きさの卵胞にまで成長させるためには、血中 LH 濃度が高低に変動する律動的 (パルス状) な分泌である LH パルスと、排卵直前の時期に血中 LH 濃度が一過性の上昇を示す LH サージとが必須である。またこれら LH 分泌調節について、Cagampang ら (Cagampang, 1991、Cagampang, 1997) は、絶食下の卵巢摘出ラットで認められる LH 分泌の抑制が、エストロジェンを投与した場合のみ認められ、またオピオイドレセプターアンタゴニスト投与で解除されることから、エストロジェン依存性やオピオイド依存性の LH 分泌調節中枢の存在を示唆している。

一方、Beam と Butler (Beam, 1998) や Zurek ら (Zurek, 1995) は、分娩からエネルギーバランスナダー（負のエネルギーバランスが軽減される変換点）までの日数（分娩後エネルギーバランスナダー日数）と分娩から初回排卵までの日数（以下、初回排卵日数）との間には正の相関関係があることを報告し、乳牛のエネルギー充足が初回排卵日数に影響すると推測している。乳牛では分娩後早期に急激な乳量の増加が起きるが、それを補う必要量の飼料を十分に摂取できないために、大部分の乳牛は著しいエネルギー欠乏状態となる (Roche, 2000、Butler, 2000)。乳牛のエネルギーバランスは、摂取したエネルギー量から泌乳や母体自体の生存のために必要なエネルギー量を差し引くことで算出され、乳牛では分娩後急激に負のエネルギーバランスを示すこととなる。その後、泌乳量の増加が停止し一定量に達すると、採食量の増加とあいまって必要なエネルギー量が摂取可能となり、負のエネルギーバランスが軽減され、泌乳中期になるとエネルギーバランスは保たれる。また、乳生産のみを目的とした遺伝的な改良により、高泌乳牛では繁殖障害の多発傾向や分娩間隔の延長傾向もこのことに関連する現象として示唆されている (Butler, 2000)。しかしながら、エネルギーバランスと初回排卵との関係における詳細なメカニズムは不明である。

最近、血中にはエネルギー充足度を表す信号物質（以下、末梢側信号物質）が存在し、中枢は末梢側信号物質の濃度変動に対応して視床下部や下垂体に作用し、LH 分泌を調節しているという仮説が考えられるようになってきた。Canfield と Butler は (Canfield, 1990)、分娩直後の乳牛ではエネルギーバランスが大きな負の状態であるため、LH 分泌が抑制されていると推測している。また Nagatani ら (Nagatani, 1996) や Funston ら (Funston, 1995) はラットや羊で脳のグルコース利用を阻害すると LH 分泌が抑制されることを報告し、また Clarke ら (Clarke, 1990) は羊でインスリン投与による低血糖で LH

分泌が抑制され、その抑制はグルコースの投与により解除されることを報告し、LH 分泌に関連する末梢側信号物質の最重要候補は血中グルコース濃度であることを示唆している。一方、分娩後の泌乳開始に伴ったエネルギー欠乏期間では乳牛は体脂肪の動員によって不足するエネルギーを補うため、体脂肪動員に依存している日数と初回排卵日数の間にも正の相関関係があると考えられている (Roche, 2000)。しかしながら、乳牛における初回排卵に関わる LH 分泌、ならびにその分泌調節に関連する末梢側信号物質については不明で、さらにその分泌調節機構についてはほとんど解析されていない。

そこで本論文では、初回排卵を遅延させず分娩間隔を短縮させる方法を確立することを最終目標に、分娩後初回排卵に関連する末梢側信号物質（血中マーカー）の検索、さらにその LH 分泌調節について検討した。まず第 2 章では乳牛のエネルギー充足度の指標と考えられるグルコースをはじめとする各種血中マーカーについて、これら血中濃度が分娩直後の濃度域から健常域に回復するのに要した分娩からの日数と初回排卵日数との関係を検討し、末梢側信号物質を検索した。ついで第 3 章では初回排卵に最も重要な分娩後早期の乳牛における LH 分泌反応について検討した。すなわち実験 1 では、分娩後早期の乳牛における LH の分泌反応について性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）を投与して検討した。ついで、末梢側信号物質と考えられる血中グルコース濃度を増加させるプロピレングリコール（実験 2）あるいは遊離脂肪酸（以下、FFA）（実験 3）を投与した際の LH 分泌反応について検討し、さらにエストロゲン依存性の LH 分泌反応（実験 4）ならびにオピオイド依存性の LH 分泌反応（実験 5）について検討した。

第2章

分娩後初回排卵に関連する血中マーカー

血中にはエネルギー充足度を表す信号物質（以下、末梢側信号物質）が存在し、LH 分泌調節中枢はこの濃度変化に応じて LH 分泌を調節し、分娩後の初回排卵を発現するという仮説が考えられている。とくにグルコース利用阻害剤（2-デオキシ-D-グルコース）を用いたラットや羊の実験から、この末梢側信号物質の最重要候補はグルコースであると推測されている (Nagatani, 1996、Funston, 1995)。乳牛においても分娩後の初回排卵について末梢側信号物質を介した LH 分泌調節中枢による LH 分泌調節の面から検討する必要があると思われる。しかしながらこれまでの末梢側信号物質に関する報告では、週に一回程度の採血で得た血中成分の平均濃度と、分娩後の初回排卵の時期について論じたもののみで (Miettinen, 1991)、血中成分と分娩から初回排卵までの日数（以下、初回排卵日数）との関連については明確でない。また、分娩前後の期間に週に 4 回程度採血して検討した論文では、血中成分は分娩前後に V 字型や逆 V 字型などの特異的な推移を示した後に、一定範囲内の濃度域に維持されると報告されているが (Bell, 1995)、その推移と初回排卵日数との関連も明らかでない。さらに、血中濃度ではなく分娩後の負エネルギーバランスが軽減される変換点までの日数（分娩後エネルギーバランスナダー日数）が初回排卵日数に相関するとも報告されている (Zurek, 1995、Beam, 1998)。一方、初回排卵後 2 週間以内に 1 個以上の優性卵胞や分娩後第 2 回目の排卵の認められることが多いことから (Kamimura, 1993)、初回排卵後 2 週間以内では排卵に関連する LH 分泌調節に問題はなく、またエネルギー充足度を示す血中の末梢側信号物質も健常範囲内に維持されていると推測される。そこで、まず初回排卵後 2 週間の各種血中成分の濃度を求め、その平均±2 標準偏差の範囲（95%信頼区間）内に、血中成分濃度が分娩後復帰するまでの日数を濃度安定到達日数とし、初回排卵日数との関連について検討するとともに乳牛における末梢側信号物質を検索した。

材料および方法

供試牛

北海道農業試験場畜産センターにおいて、動物福祉ガイドライン（Barr, 1988）に準拠して飼養されているホルスタイン種経産牛で、正常分娩（以下、分娩日を第0日とする）し、難産や子宮疾患等が認められない13頭を供試した。なお供試牛からは分娩直後に子牛を隔離した。供試牛の分娩前のボディーコンディションスコア（Yatabe, 1990）は3.0から3.5の範囲であった。また直腸検査ならびに血漿中プロジェステロン濃度から決定した初回排卵日数は17～43日（平均25.6 ± 2.4日）であった。供試牛は全て初回排卵後に正常な性周期を繰り返した。供試牛の体重は分娩3日後で692 ± 13 kg（以後、全ての結果を平均 ± 標準誤差として表示する）、305日乳量は9,048 ± 178 kg、乳脂肪率、乳蛋白率、無脂固形分率はそれぞれ3.81 ± 0.15 %、3.30 ± 0.06 %、8.71 ± 0.09 %であった。供試牛には日本飼養標準（1994）に従って、分娩前（乾乳期）には日量16～20kgのサイレージ、0.33kgのアルファルファペレット、0.33kgのビートパルプ、0.33kgのフレークコーン、1～3kgの濃厚飼料を給与し、この他に乾草を自由採食させた。分娩後には、日量25～30kgのサイレージ、2kgのアルファルファペレット、2kgのビートパルプ、1kgの加熱大豆および濃厚飼料を給与し、この他に乾草を自由採食させた。分娩後の濃厚飼料の給与量は、分娩日には3kg、その後6日間に1kgずつ増加させた。分娩後1週以降は濃厚飼料とサイレージの給与量は採食量等を観察し食滞を予防するために加減しながら日本飼養標準に基づく必要量を給与した。表2-1に用いた飼料の成分を表示した。

検体の採取

分娩予定日 3 週間前から分娩後約 60 日目まで、毎週 4 回 7:00～ 8:00 に頸静脈から血液を採取した。

測定

測定項目はエネルギー充足度の血中マーカーとされる、グルコース、遊離脂肪酸(以下、FFA)、ケトン体、フリーコレステロール、コレステロールエステル、ならびに尿素体窒素(以下、UN) とし、全て市販の測定キット(カインスラボラトリー社、東京)とオートアナライザー(モデル 7170、日立社、東京)を用いて測定した。また血中プロジェステロン濃度は ^3H 標識したプロジェステロン(NEN リサーチ社、東京)と、抗プロジェステロン抗体(竹ノ内ら、1993)を用いたラジオイムノアッセイ(RIA) デキストラン炭末法で、液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

統計学的解析

まず、全ての測定値の分布の正規性を Kolmogorov-Smirnov 検定により確認した。ついで各血中成分濃度について、分娩前 2 週間から初回排卵までの全検体と初回排卵後 2 週間の全検体との間に有意な差があるか否かを、正規分布を示す血中成分については T 検定で、正規分布を示さない血中成分については U 検定で解析した。さらに有意な濃度差が認められた血中成分については、各個体で初回排卵後 2 週間の平均値 \pm 2 標準偏差の範囲に分娩後の濃度が復帰する日数、すなわち濃度安定到達日数を算出した。全ての濃度安定到達日数が正規分布することを確認した後に、分娩から初回排卵までの日数、すなわち初回排卵日数との間で回帰分析を行った。また濃度安定到達日数が算出出来た項目については項目間の比較を、個体をブロックファクターとした分散分

析法と最小有意差検定法で解析した。

結果

血中グルコース、FFA、UN、フリーコレステロール、コレステロールエステル濃度は正規分布したが、ケトン体濃度は正規分布しなかった。表 2-2 に各血中成分濃度の分娩前 2 週間から初回排卵までの期間（排卵前期間）と初回排卵後 2 週間（排卵後期間）における供試牛ごとおよび全供試牛における平均値と標準偏差、ならびに全供試牛における初回排卵後 2 週間における平均値 ± 2 標準偏差の範囲を示した。また全供試牛の各血中成分濃度の推移について、分娩日を第 0 日とした前後 2 週間の推移、ならびに初回排卵日を第 0 日とした前後 2 週間の推移を示した（図 2-1）。グルコース濃度は分娩前まで約 60mg/dL で推移したが、分娩の数日前から増加し、分娩日以後に急激に減少した。供試牛の中には血中グルコース濃度が分娩後早期には健常時の 1/2 から 2/3 に著しく低下している個体も多かった。その後、個体により様々な期間低値を示した後、増加に転じ増加した後に初回排卵が観察された（図 2-1-a）。全供試牛の FFA 濃度は、分娩前まで低値で推移したが分娩日以後に急激に増加し、その後減少に転じるという推移を示し、減少に転じた後に初回排卵が観察された。これら以外の血中成分も分娩前後および初回排卵前後にそれぞれ固有の推移パターンを示した（図 2-1-b）。また血中グルコース、FFA、UN、フリーコレステロール、コレステロールエステル濃度については分娩前 2 週間から初回排卵までの全検体の濃度と初回排卵後 2 週間の全検体の濃度との間に有意差（ $P < 0.001$ ）が認められたが、ケトン体については認められなかった（表 2-2）。有意差の認められた項目のうち、血中コレステロールエステル濃度では分娩前 2 週間から初回排卵までの全濃度が初回排卵後 2 週間の濃度の 95%

信頼区間範囲に入るため、濃度安定到達日数を算出できなかったが、グルコース、FFA、UN、フリーコレステロール濃度については濃度安定到達日数が算出可能であった。

表 2-3 に各供試牛の初回排卵日数とグルコース、FFA、UN、フリーコレステロールの濃度安定到達日数を示した。濃度安定到達日数にグルコース、FFA、フリーコレステロールでは有意な差は認められなかったが、UN の濃度安定到達日数はこれらに比較して有意に小さかった ($P < 0.01$ 、図 2-2)。また得られたグルコースおよび FFA の濃度安定到達日数と初回排卵日数との間には有意な正の相関関係が認められたが、UN およびフリーコレステロールの濃度安定到達日数と初回排卵日数との間に相関関係は認められなかった (図 2-3)。

考察

分娩後のエネルギー充足度は、分娩後の初回排卵に重要な LH の分泌調節に影響を及ぼすと考えられるが、この機構はいまだ明らかにされていない。ラットや羊では血中グルコース濃度が末梢側信号物質であると推定されているが (Nagatani, 1996、Funston, 1995)、Sato ら (Sato, 1978、Sato, 1981) は分娩 1 ヶ月後の乳牛と泌乳中期の乳牛の血中グルコース濃度には差は認められないと報告している。しかしながら本実験の結果からは、分娩後早期の乳牛では血中グルコース濃度が健常時の $1/2$ から $2/3$ に著しく低下している個体が多く、この時期の乳牛は激しいエネルギー欠乏状態にあると推測され、また血中グルコース濃度はエネルギー充足度と関連すると考えられる。一方、エネルギー欠乏期間には乳牛は体脂肪の動員によって不足エネルギーを補うが、体脂肪動員を表す血中 FFA 濃度も有意な高値を示す。さらに本実験の結果、エネルギー充足度を表す指標と考えられている項目のうちケトン体以外のグルコ

ース、FFA、UN、フリーコレステロール、ならびにコレステロールエステルの血中濃度には、分娩前2週間から初回排卵までの期間の濃度と初回排卵後2週間の濃度との間に有意な差が認められた。すなわち、乳牛では初回排卵後には正常な発情・排卵周期を示すことから考えて、初回排卵前後ではエネルギー充足状態が異なるものと考えられた。また、分娩後に初回排卵後と同程度のエネルギー充足状態に早期に回復することが、初回排卵遅延を防止する上で重要と推測された。一方、エネルギー充足状態への回復はUNがグルコース、FFA、フリーコレステロール濃度と比較して早期に認められたが、初回排卵との関係は認められずLH分泌調節中枢の末梢側信号物質とは考えられなかった。

本実験の結果、グルコースおよびFFAの濃度安定到達日数と初回排卵日数との間には有意な正の相関が認められ、血中グルコースならびにFFA濃度が末梢側信号物質である可能性が示唆された。一方、Miettinen (Miettinen, 1991) は週に一回程度の採血で得た血中成分の平均濃度と初回排卵日数とを検討し、両者に明確な関連はないと報告している。しかしながら本実験の結果から考えて、Miettinenの実施した方法では、分娩直後の濃度域から健常域に回復するという変化に対する検討が不十分であることが、両者の関連を見いだせなかった理由であると推測された。さらにFormigoniら (Formigoni, 1996) は、分娩後早期の低栄養状態の乳牛にルーメン壁から吸収され肝臓で糖合成の前駆体として利用されるプロピレングリコールを強制的に連日経口投与すると、血中グルコース濃度が増加し、分娩後初回排卵も早期化されると報告しており、血中グルコース濃度が末梢側信号物質であることを示唆している。

以上の結果、初回排卵日数は血中グルコースおよびFFA濃度の分娩後の濃度安定到達日数と密接に関係することが明らかになり、血中グルコースならびにFFA濃度がLH分泌調節中枢に対する末梢側信号物質であると考えられた。

Table 2-1. Content of feed given to the Holstein dairy cows (dry matter basis)

	Dry matter (%)	Total digestible nutrients (%)	Crude protein (%)	Acid detergent fiber (%)	Neutral detergent fiber (%)
Grass silage	29.1	60.0	10.0	35.9	58.8
Grass hay	86.3	53.8	9.6	36.8	70.5
Alfalfa pellet	91.0	61.0	20.7	30.3	45.4
Beet pulp	90.0	74.0	9.4	29.0	43.3
Flaked corn	87.0	92.4	10.2	3.8	7.6
Heated soybeans	89.0	107.0	41.4	9.3	11.2
Concentrate					
dry period	88.8	91.0	18.0	10.1	17.8
postpartum period	88.3	90.0	19.2	9.1	16.4

Table 2-2-a. Concentrations of plasma components (Means \pm SD) in preovulation (from 14 days before parturition to the first ovulation) and postovulation periods (14 days after the first ovulation) in the Holstein dairy cows.

Cow No.	Glucose (mg/dL)		FFA (nEq/mL)		Ketones (mmol/mL)	
	Preovulation period	Postovulation period	Preovulation period	Postovulation period	Preovulation period	Postovulation period
1	58.6 \pm 8.5	62.1 \pm 4.5	503 \pm 316	327 \pm 157	1161 \pm 822	1089 \pm 681
2	57.2 \pm 9.7	65.4 \pm 5.7	753 \pm 232	310 \pm 123	1010 \pm 394	617 \pm 82
3	57.8 \pm 10.0	64.5 \pm 4.2	643 \pm 296	358 \pm 96	1180 \pm 981	1202 \pm 392
4	51.2 \pm 10.8	61.3 \pm 4.6	529 \pm 243	445 \pm 85	1185 \pm 1186	1091 \pm 203
5	66.6 \pm 5.8	69.3 \pm 4.7	543 \pm 221	123 \pm 30	651 \pm 168	633 \pm 87
6	56.9 \pm 8.5	64.5 \pm 4.4	654 \pm 351	211 \pm 56	671 \pm 225	566 \pm 75
7	57.4 \pm 9.1	55.9 \pm 2.7	377 \pm 165	229 \pm 48	693 \pm 359	651 \pm 193
8	65.9 \pm 7.2	65.7 \pm 3.4	653 \pm 381	382 \pm 129	663 \pm 298	662 \pm 91
9	56.1 \pm 5.9	56.2 \pm 6.9	400 \pm 189	187 \pm 63	552 \pm 322	634 \pm 129
10	57.9 \pm 5.5	57.1 \pm 4.4	442 \pm 255	226 \pm 46	645 \pm 220	643 \pm 136
11	58.1 \pm 6.0	63.5 \pm 3.5	616 \pm 332	440 \pm 93	677 \pm 395	499 \pm 103
12	50.3 \pm 13.5	58.5 \pm 1.9	994 \pm 573	241 \pm 73	2142 \pm 1902	574 \pm 61
13	58.3 \pm 8.7	64.8 \pm 4.8	393 \pm 82	303 \pm 96	439 \pm 97	382 \pm 72
Mean \pm SD	58.0 \pm 9.6	62.2 \pm 5.8*	569 \pm 344	285 \pm 127*	892 \pm 2088	711 \pm 339
SR+		50.6 \sim 73.8		30 \sim 540		33 \sim 1388

*: Significant difference ($P < 0.001$) between the pre- and post-ovulation periods.

+: Significant range calculated from Mean \pm 2SD for postovulation period.

Table 2-2-b. Concentrations of plasma components (Means \pm SD) in preovulation (from 14 days before parturition to the first ovulation) and postovulation periods (14 days after the first ovulation) in the Holstein dairy cows.

Cow No.	Urea nitrogen (mg/dL)		Free cholesterol (mg/dL)		Ester cholesterol (mg/dL)	
	Preovulation period	Postovulation period	Preovulation period	Postovulation period	Preovulation period	Postovulation period
1	9.2 \pm 2.2	12.7 \pm 2.1	17.8 \pm 5.7	33.7 \pm 3.1	52.7 \pm 17.4	92.7 \pm 5.9
2	7.9 \pm 1.6	9.8 \pm 0.9	17.1 \pm 4.6	32.5 \pm 2.7	57.6 \pm 15.7	102.3 \pm 5.8
3	7.7 \pm 1.5	8.2 \pm 1.8	18.2 \pm 3.5	27.0 \pm 2.5	56.5 \pm 14.4	96.6 \pm 9.6
4	7.2 \pm 1.7	9.8 \pm 1.7	18.1 \pm 5.6	34.2 \pm 3.1	61.9 \pm 23.5	122.3 \pm 11.3
5	5.7 \pm 2.1	8.3 \pm 0.9	15.2 \pm 4.1	20.9 \pm 1.2	48.2 \pm 9.8	65.7 \pm 4.8
6	10.4 \pm 2.3	12.2 \pm 1.6	16.9 \pm 2.1	33.0 \pm 4.6	54.8 \pm 7.6	109.8 \pm 15.5
7	8.2 \pm 2.3	9.9 \pm 2.2	21.1 \pm 2.9	34.6 \pm 2.7	71.7 \pm 12.5	129.5 \pm 9.0
8	9.5 \pm 1.5	10.7 \pm 1.9	22.2 \pm 5.8	42.5 \pm 3.9	72.7 \pm 20.2	136.9 \pm 10.2
9	9.6 \pm 1.9	12.7 \pm 1.6	21.2 \pm 5.1	31.6 \pm 2.4	66.4 \pm 16.3	95.5 \pm 8.1
10	7.9 \pm 1.5	8.3 \pm 0.7	26.0 \pm 8.2	37.5 \pm 3.2	91.2 \pm 36.1	134.9 \pm 11.2
11	10.4 \pm 3.4	14.8 \pm 2.8	17.3 \pm 4.7	32.0 \pm 2.8	57.4 \pm 15.7	101.1 \pm 8.4
12	9.3 \pm 2.5	10.6 \pm 1.5	20.1 \pm 5.1	31.2 \pm 3.2	66.9 \pm 20.1	98.6 \pm 8.6
13	6.3 \pm 2.6	9.8 \pm 1.1	14.4 \pm 2.9	21.8 \pm 2.8	51.7 \pm 8.8	74.7 \pm 6.1
Mean \pm SD	8.4 \pm 2.5	10.6 \pm 2.6*	19.3 \pm 5.9	32.0 \pm 6.0*	63.6 \pm 22.1	95.3 \pm 45.8*
SR+		5.5 \sim 15.7		20.0 \sim 43.9		3.7 \sim 187.0

*: Significant difference ($P < 0.001$) between the pre- and post-ovulation periods.

+: Significant range calculated from Mean \pm 2SD for postovulation period.

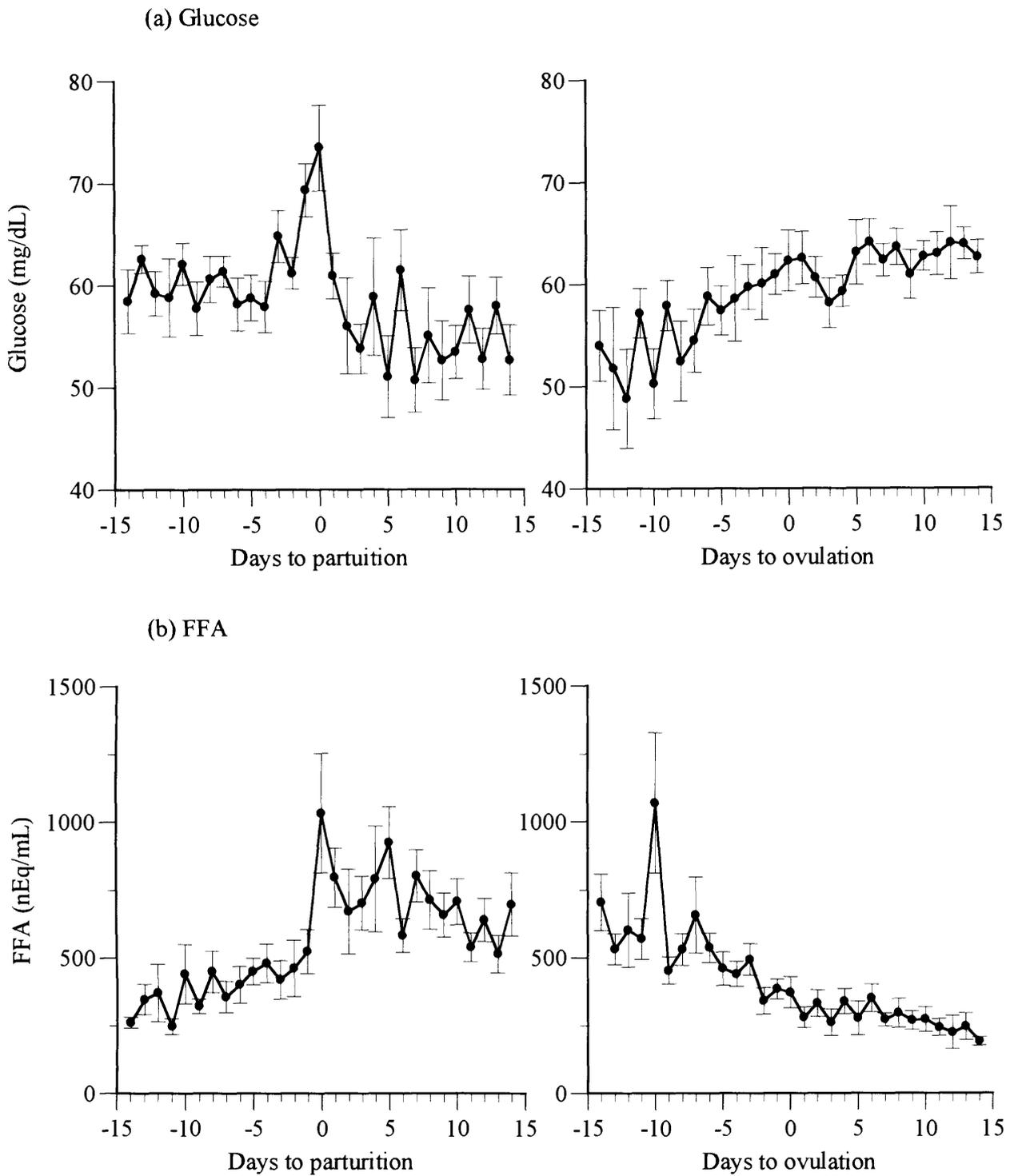


Fig.2-1-a Changes of plasma concentrations of glucose (a) and FFA (b) during the parturition period (left) and the first ovulation period (right) in the Holstein dairy cows. Values are the means \pm SEM. The number of animals at each time point varies from 2 to 13.

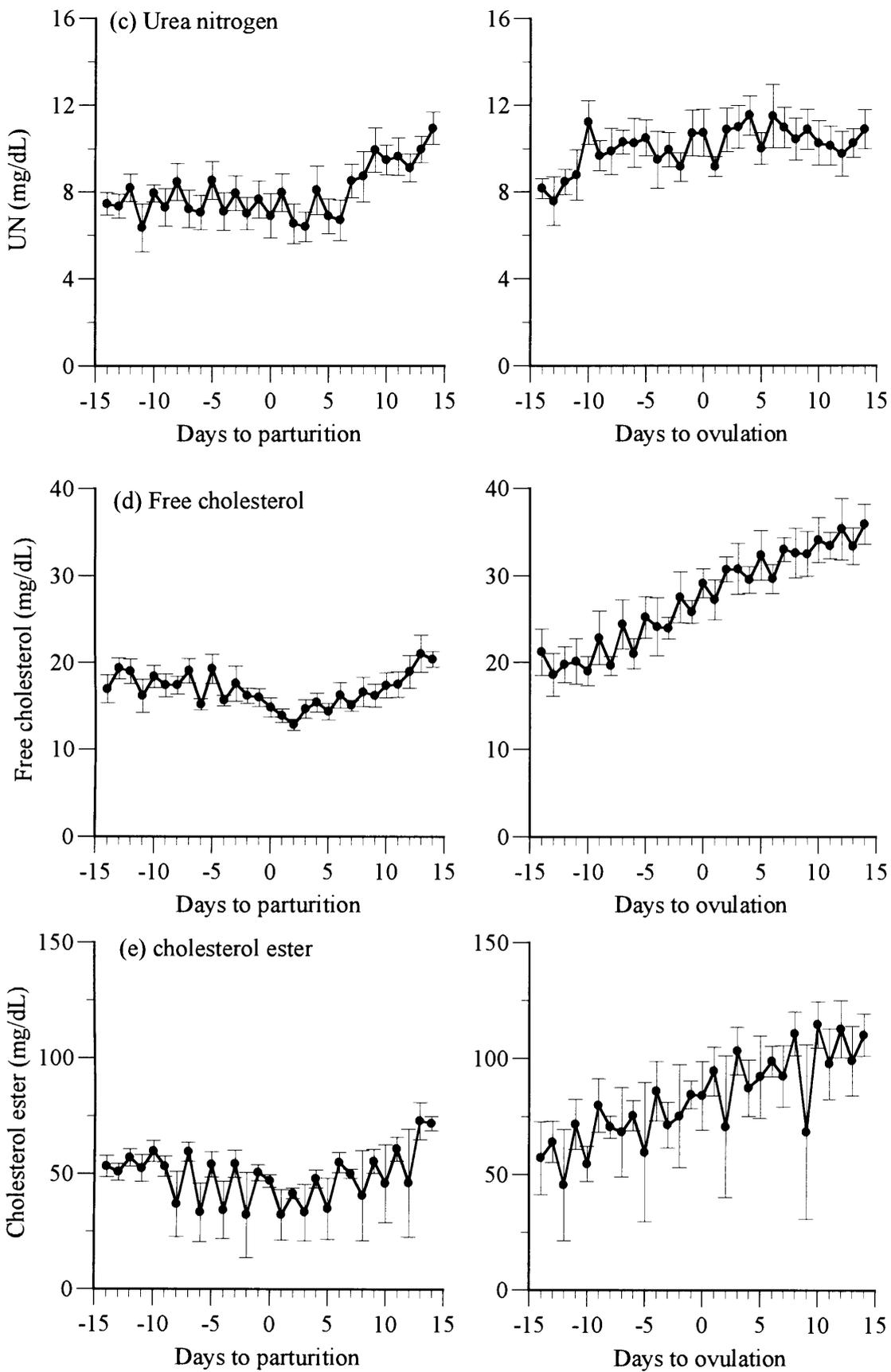


Fig.2-1-b Changes of plasma concentrations of urea nitrogen (c), free cholesterol (d), and cholesterol ester (e) during the parturition period (left) and the first ovulation period (right) in the Holstein dairy cows. Values are the means \pm SEM. The number of animals at each time point varies from 2 to 13.

Table 2-3. The day of first postpartum ovulation and the steady day of plasma glucose, FFA, urea nitrogen, and free cholesterol concentrations.

Cow No.	The first postpartum ovulation day* (days)	The steady day**			
		Glucose (days)	FFA (days)	Urea nitrogen (days)	Free cholesterol (days)
1	23	18	14	9	14
2	17	14	19	3	15
3	20	9	17	-7	14
4	27	21	24	5	17
5	21	5	5	10	20
6	20	17	14	1	19
7	17	16	9	6	7
8	41	34	37	-3	13
9	43	25	22	6	20
10	31	17	15	19	3
11	18	17	13	4	13
12	31	31	29	5	12
13	24	5	6	8	21

*: The duration (days) from parturition to the first postpartum ovulation

** : The duration (days) of the plasma components to reach the steady concentration (calculated from Mean \pm 2SD of postovulation period)

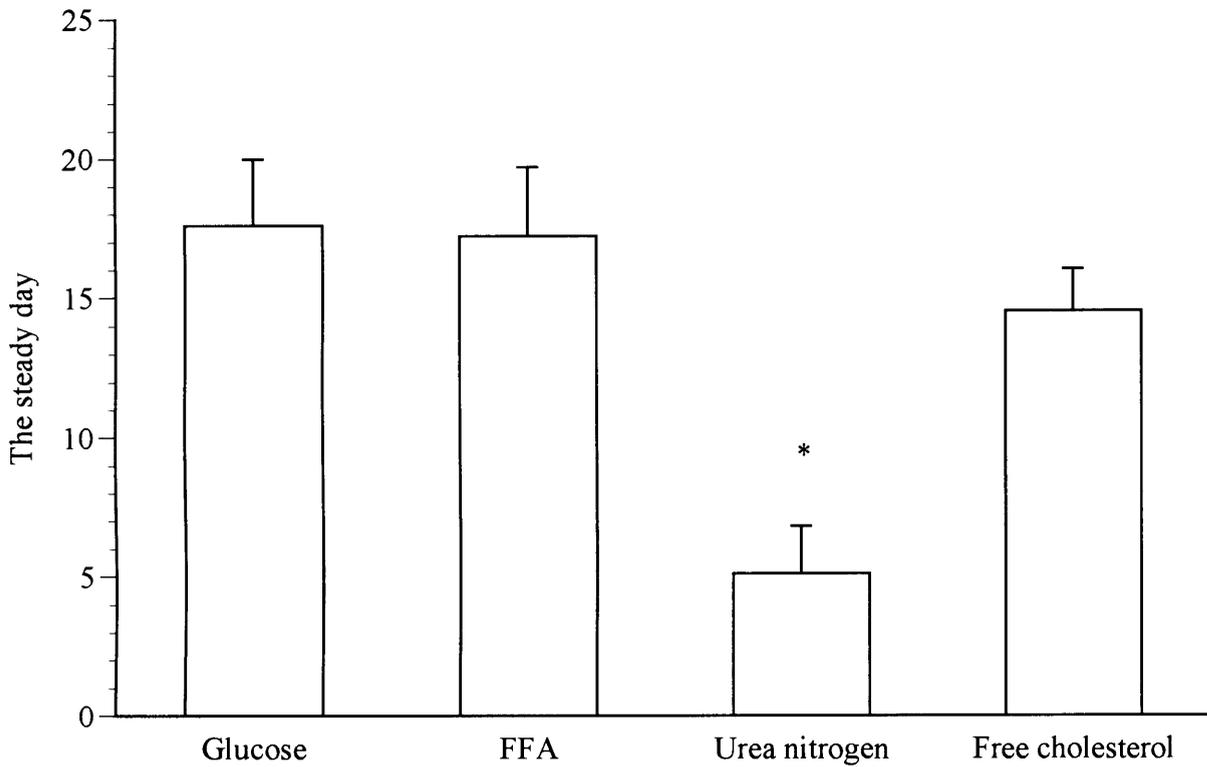


Fig. 2-2 The steady day (Mean \pm SEM) to reach the steady concentration calculated from plasma glucose, FFA, urea nitrogen, and free cholesterol concentrations for 14 days after the first postpartum ovulation. *: Significant difference ($P < 0.01$) compared with others.

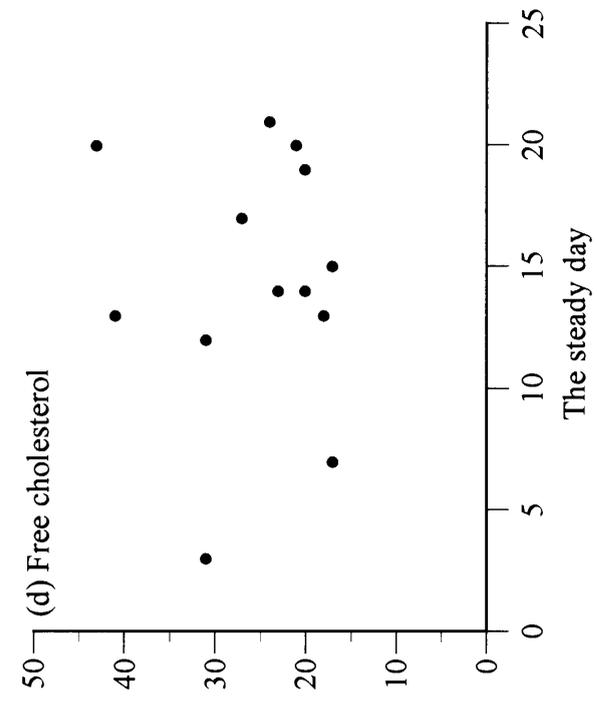
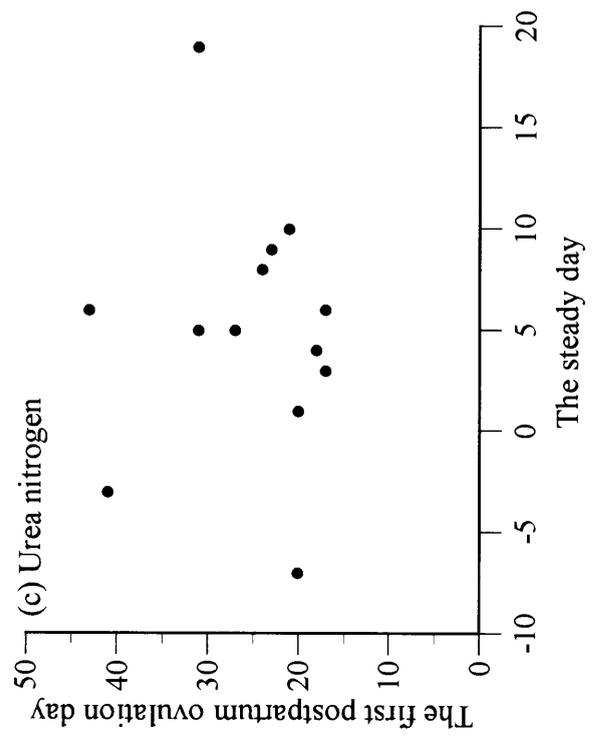
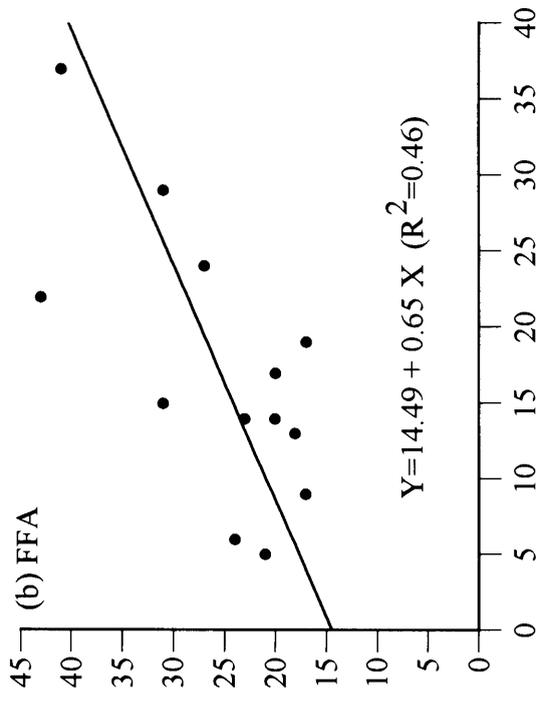
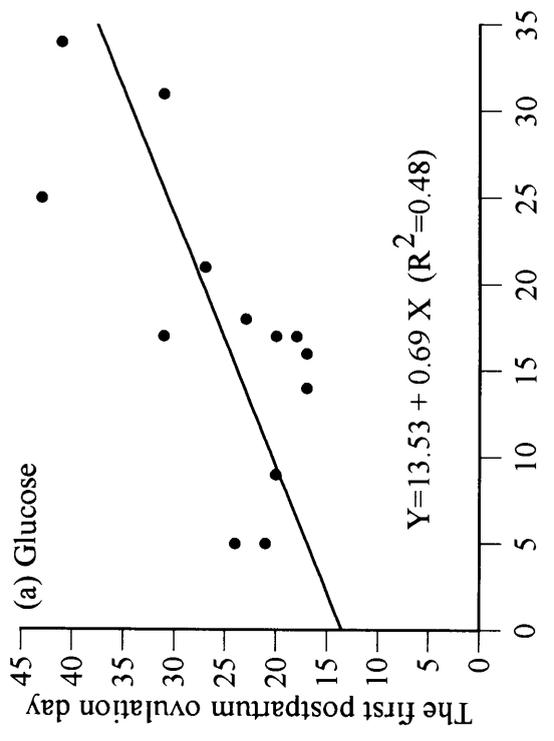


Fig. 2-3 Relationships between the first postpartum ovulation day and the steady day of glucose (a), FFA (b), urea nitrogen (c), and free cholesterol (d) concentrations.

小括

血中にはエネルギー充足度を表す末梢側信号物質が存在し、LH 分泌調節中枢はこの濃度変化に応じて LH 分泌を調節するという仮説が考えられている。とくにこの末梢側信号物質の最重要候補は血中グルコース濃度であると推測されている。そこで、グルコースをはじめとする各種血中マーカーが分娩直後の濃度域から健常域に回復するために要した分娩後日数と分娩から初回排卵までの日数（以下、初回排卵日数）との関連を検討した。すなわち、初回排卵後 2 週間における各血中成分の濃度の平均±2 標準偏差の範囲（健常域）内に、各個体の血中因子の濃度が達するに要した分娩後からの日数と初回排卵日数との相関関係について検討した。13 頭のホルスタイン種乳牛から分娩前 14 日から分娩後約 60 日まで週に 4 回採血し、血漿中のグルコース、遊離脂肪酸 (FFA)、ケトン体、尿素体窒素 (UN) を測定した。初回排卵後 2 週間のグルコース、UN、フリーコレステロール、コレステロールエステルの濃度は分娩前 2 週間から分娩後初回排卵までの期間の濃度と比較して有意に高く、また初回排卵後 2 週間の FFA は初回排卵前のそれと比較して有意に低かった。しかしケトン体については、初回排卵前と初回排卵後の間の有意差は認められなかった。さらにこのうちグルコースと FFA については健常域内に復帰するまでに要した日数と初回排卵日数との間に有意な正の相関が認められた。したがって、血中グルコースと FFA 濃度が分娩後の初回排卵に関連する末梢側信号物質と考えられた。

第3章

分娩後早期乳牛における 性腺刺激ホルモン分泌調節

前章の結果から、LH 分泌調節中枢に関与する末梢側信号物質は血中グルコースと FFA 濃度であると推測された。すなわち血中の末梢側信号物質の濃度が健常域に回復すると初回排卵を誘起させるが、回復できずに分娩直後の濃度が持続した場合には初回排卵を遅延させる LH 分泌の調節中枢が存在すると考えられた。ラットでは脳のグルコース利用を阻害すると LH 分泌の抑制が発現することが (Nagatani, 1996)、また分娩後早期のエネルギーバランスが負の状態の乳牛では LH 分泌が抑制されていることが報告されている (Beam, 1999)。しかしながら、分娩後早期の乳牛における末梢側信号物質に関連した LH 分泌調節については不明である。そこでまず分娩後早期の乳牛に性腺刺激ホルモン放出ホルモン (以下、GnRH) を投与した際の LH の分泌反応について検討し (実験 1)、ついで末梢側信号物質と考えられる血中グルコース濃度 (実験 2) および血中 FFA 濃度 (実験 3) を増加させた際の LH 分泌反応について、さらに絶食下のラットで認められる LH 分泌の抑制には、エストロジェンやオピオイドが関与すると報告されていることから (Cagampang, 1991、Cagampang, 1997)、エストロジェンを介した LH 分泌反応 (実験 4) ならびにオピオイドを介した LH 分泌反応 (実験 5) について検討した。

実験 1 GnRH 投与による LH 分泌反応

分娩後早期の乳牛における LH 分泌反応の抑制ならびに血中グルコース濃度との関連を検討するため、まず GnRH 投与し、LH 分泌反応を検討するとともにエネルギー充足率、蛋白充足率、血漿中グルコース濃度を測定し検討した。

材料および方法

供試牛

北海道農業試験場畜産センターで飼養する、正常分娩し、難産や子宮疾患等が認められないホルスタイン種乳牛 24 頭を供試した。供試牛からは分娩直後に子牛を隔離した。供試牛の 305 日乳量は $9,482 \pm 151$ kg で、供試期間中は日本飼養標準（1994）に従って飼育した。また供試牛は第 30 日まではタイストールで、第 31 日以後はフリーストールで飼育した。供試牛は分娩日に無作為に 4 群にわけ、分娩後 10 日（10 日群 9 頭、全例初回排卵前）、30 日（初回排卵前 30 日群 4 頭、ならびに初回排卵後 30 日群 6 頭）、60 日（60 日群 5 頭、全例初回排卵後）のいずれかの時期に GnRH を投与した。分娩後 10 日および 30 日に GnRH を投与した初回排卵前の供試牛については、投与実施週における日本飼養標準（1994）に基づくエネルギー充足率および蛋白充足率を算定した。分娩後 10 日群のエネルギー充足率($67.8 \pm 3.3\%$)および蛋白充足率($74.2 \pm 3.8\%$)は排卵前 30 日群との間には差はないものの、排卵後 30 日群および 60 日群（それぞれ $83.3 \pm 5.3\%$ および $89.1 \pm 7.5\%$ ）よりも有意に低かった ($P < 0.05$)。また、初回排卵日ならびに排卵数を直腸検査と血漿中プロジェステロン濃度から決定した。

検体の採取

供試牛には GnRH 投与前日に頸静脈に三方活栓（トップ社、東京）を接続したカテーテル（メディカットカテーテルキット 14G、アーガイル、東京）を装着した。GnRH 投与前後の血液を装着したカテーテルから採取した。すなわち、GnRH 投与日の 10:30 に、グルコース濃度の測定用検体を採取し、11:00 に 200 μ g の GnRH（酢酸フェルチレリン、コンセラル、武田薬品工業、大阪）を筋肉内投与した。GnRH の投与後は 3 時間まで 15 分間隔で採血し、さらに投与後 3~8 時間まで 30 分間隔で採血した。採取した血液はそれぞれヘパリン入りの試験管に入れ、採血直後に 4°C で遠心分離を行い、測定まで -20°C で血漿を保存した。

測定

血中プロジェステロン濃度の測定は第 2 章と同様のラジオイムノアッセイ法により実施したが、抗プロジェステロン抗体は帝国臓器社（東京）のものを用いた。典型的な血中プロジェステロン濃度の変動を図 3-1 に示した。血中 LH 濃度は、ラジオイムノアッセイ 2 抗体法により測定した。すなわち、¹²⁵I 標識した牛 LH 標準品（クロラミン T 法、UCB バイオプロダクト社、ブリュッセル、ベルギー）、抗牛 LH ウサギ血清（UCB バイオプロダクト社）および当研究室で作製した抗ウサギ γ グロブリン羊血清を用いた。血中グルコース濃度はオートアナライザー（アボット、ダイナボット社、東京）と市販の測定キット（アボットクイックスタートグルコースキット、ダイナボット社、東京）を用いて測定した。

統計学的解析

Gauter と Mauleon (Gauter, 1983) の報告に従い GnRH 投与による LH の分泌反応を表す指標として、投与後の最高 LH 濃度（ピーク濃度；以下、pLH）

ならびに、投与後 8 時間の LH 放出反応曲線と X 軸の間の面積（放出 LH 量、以下、 Σ LH）を個体ごとに算出した。測定項目ごとに 10 日群、初回排卵前 30 日群、初回排卵後 30 日群、60 日群の群間の平均値の差を分散分析法と Fisher's PLSD 検定法により解析した。

結果

図 3-2 に GnRH 投与後の血中 LH 濃度の推移を示した。血中 LH 濃度はいずれの群においても GnRH 投与後に増加し、約 2 時間後にピーク濃度に達した後に、減少を示した。しかしながら、10 日群では他の群に比較して低値を示した。LH の分泌反応を表す指標を図 3-3 に示した。10 日群の pLH と Σ LH は他群に比較して有意に低値であったが、排卵前 30 日群、排卵後 30 日群、60 日群の間に有意差は認められなかった。グルコース濃度についても pLH と Σ LH と同様に、10 日群は他群よりも有意に低く、排卵前 30 日群、排卵後 30 日群、60 日群の間には有意差は認められなかった。

考察

本実験の結果、初回排卵前の 10 日群の LH ピーク濃度（pLH）と放出 LH 量（ Σ LH）はいずれも他群のそれと比較して低値であった。したがって、分娩後早期の乳牛では GnRH の投与に対して LH 分泌反応は抑制されていることが明らかとなった。中枢による LH 分泌の抑制は、その主体は内因性 GnRH の分泌抑制であり、それにともなって GnRH の作用である下垂体の LH 合成・分泌が抑制され、発現すると考えられている。しかしながら血中グルコース濃度の低下が GnRH 投与時の LH 分泌反応を抑制することから、血中グルコース濃

度の低下は直接 LH 分泌を抑制すると考えられる。すなわち、Kestler ら (Kestler, 1977) や Foster ら (Foster, 1980) は、分娩後の乳牛に GnRH を投与した場合、LH の分泌反応は分娩後 7 日目までは低下しているが、分娩後 10 日目以降では性周期を正常に繰り返す乳牛と LH 分泌反応に差がないことを認めている。また肉牛においても、LH 分泌反応の低下は分娩後 7 日目までと考えられている (Gauter, 1983)。本実験の結果においても、分娩後日数の経過とともに LH 分泌反応は改善し、これまでの報告と同様であったが、初回排卵前である分娩後 10 日目では抑制されており、他の報告に比較して LH 分泌反応の抑制が遅くまで認められた。一方、10 日群のエネルギー充足率は他群と比較して有意に低く、またその血中グルコース濃度も他群のそれと比較して低値で、第 2 章と同様に分娩後早期には激しいエネルギー欠乏状態にあることを示していた。Gauter と Mauleon (Gauter, 1983) は、分娩後の肉牛で分娩後に給与エネルギーを制限すると、LH 分泌反応の改善が著しく遅延すると報告している。また、分娩後 30 日目に GnRH 投与した 2 群、すなわち排卵前 30 日群と排卵後 30 日群との間には LH の分泌反応に差は認められず、排卵前 30 日群、排卵後 30 日群、60 日群の血中グルコース濃度にも差は認められなかった。したがって、泌乳量の増加した現代の乳牛では、分娩後早期においてはエネルギー不足が重篤で、LH 分泌反応の回復時期が遅延しているものと考えられ、また分娩後早期における GnRH 投与時の LH 分泌の抑制は、血中グルコース濃度が影響しているものと推測された。

一方、初回排卵前の全供試牛では、GnRH 投与後、排卵が観察された。したがって、血中グルコース濃度の低下による LH 分泌の抑制は、分娩後の初回排卵に影響する程大きなものではなく、主に GnRH の分泌抑制が重要と考えられる。McDougall ら (McDougall, 1995) も同様の結果を報告しており、別種の GnRH 剤を投与しているが大部分の高泌乳牛において排卵を認めてい

る。さらに乳牛では分娩後第1週の時点には既に卵巢内で卵胞が次々と成長・退行を繰り返す卵胞ウェーブが存在することも知られている（Kamimura, 1993）。したがって、分娩後早期であっても卵巢は排卵誘起に必要な LH 分泌が起これば排卵する状態にあり、分娩後初回排卵の遅延は GnRH 分泌が抑制された結果と考えられる。

以上の結果から、分娩後早期の乳牛では GnRH 投与に対する LH 分泌反応は低下しており、この低下はエネルギー充足率、とくに血中グルコース濃度に関連するものと考えられた。

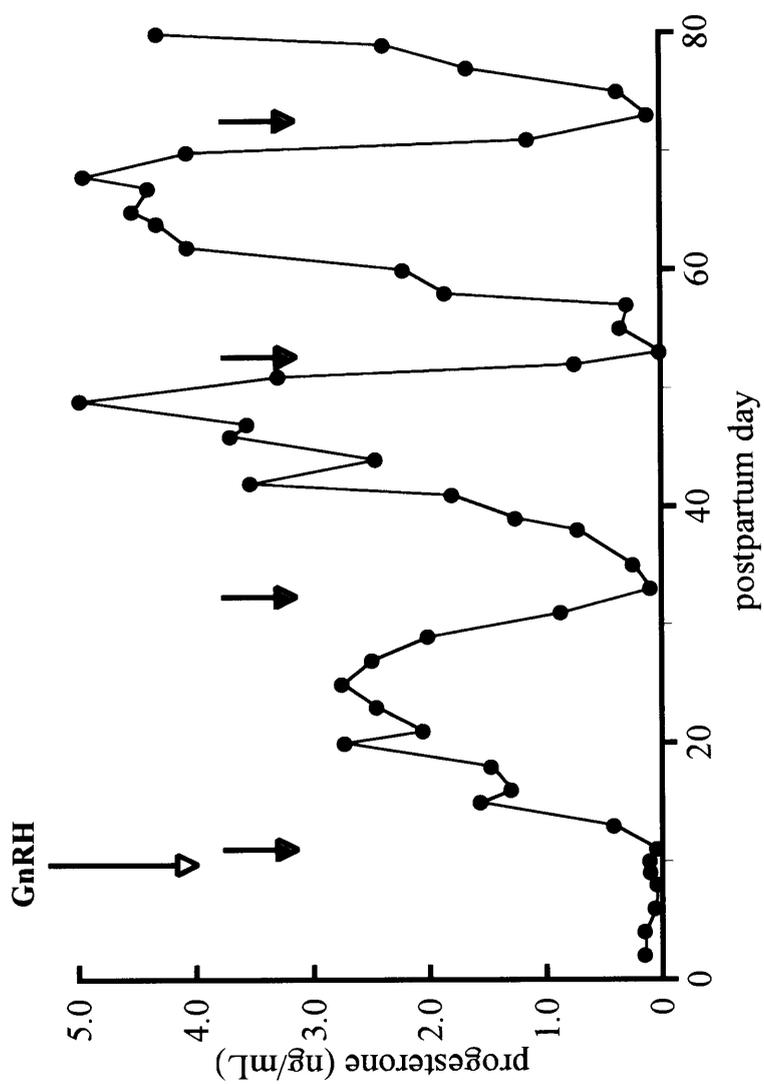


Fig. 3-1 Typical pattern of plasma progesterone concentration from day 0 (the day of parturition) to day 80 in a Holstein dairy cow injected with GnRH analogue at day 10. Black arrows represent the ovulation.

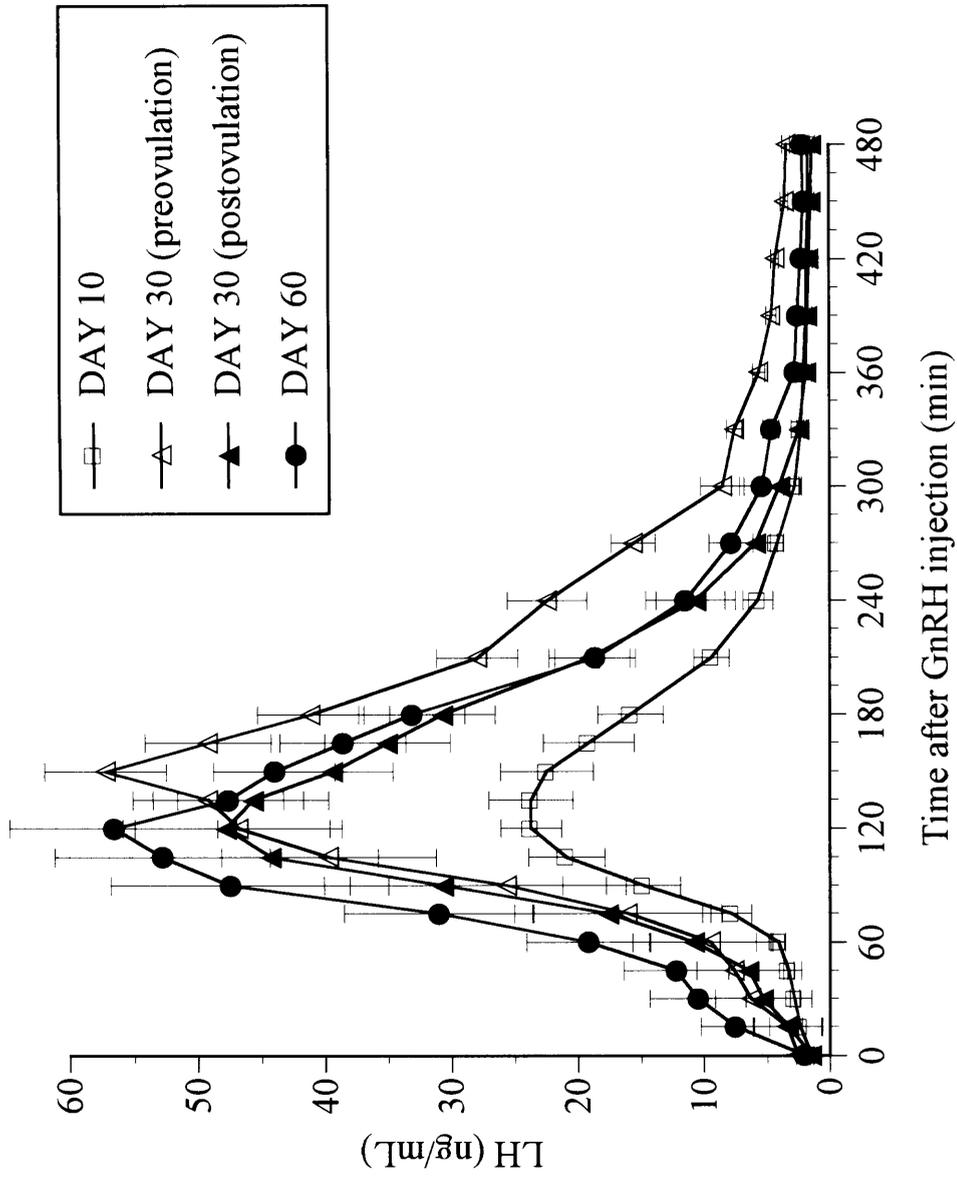


Fig. 3-2 Changes of plasma LH concentrations in the Holstein dairy cows after the intramuscular injection with GnRH analogue at day10 (n=9, preovulation \square), day 30 (n=4, preovulation \triangle , and n=6, postovulation \blacktriangle) or day 60 (n=5, cyclic cows with functional CL \bullet). Each value is the mean \pm SEM.

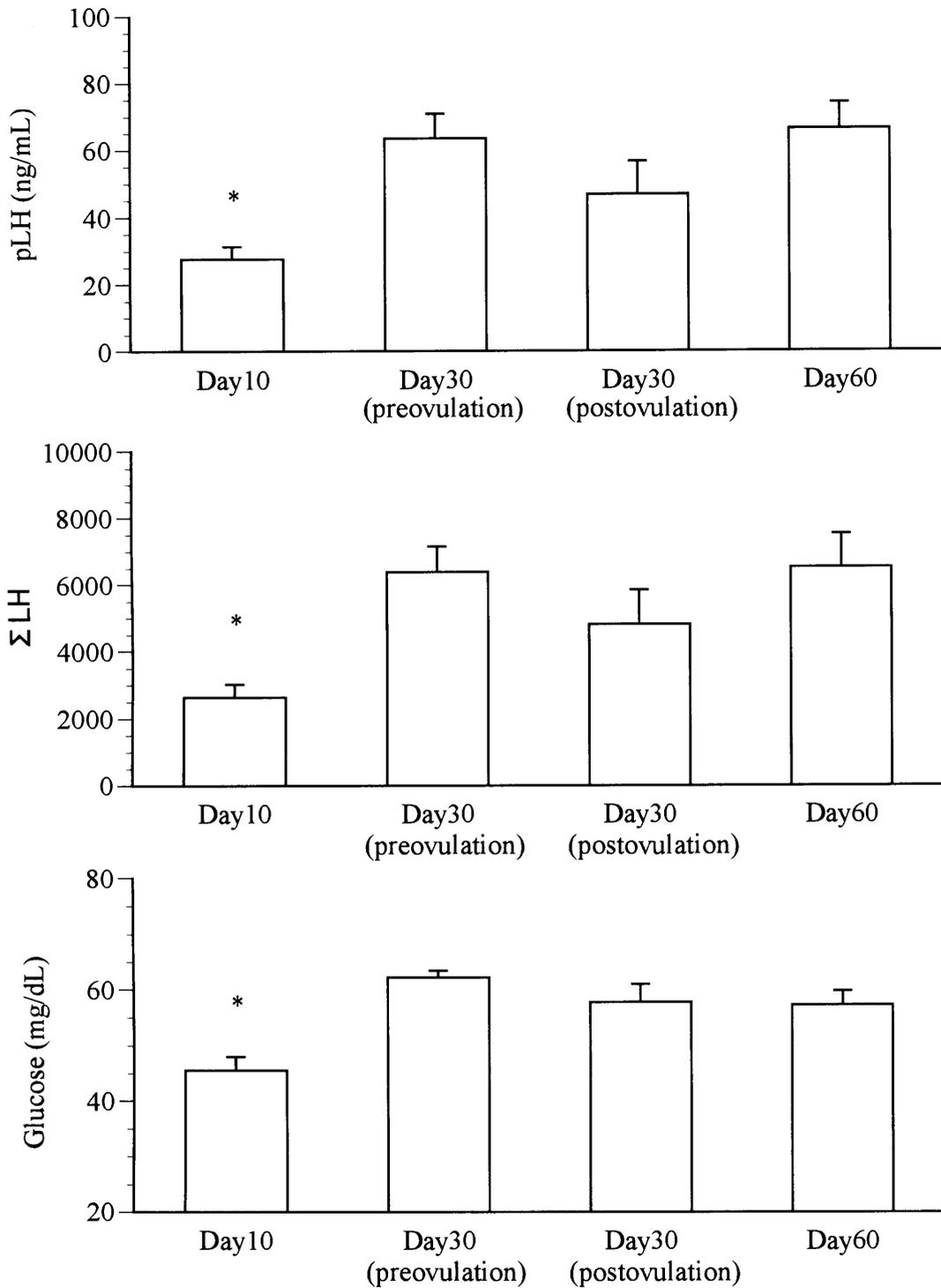


Fig. 3-3 Plasma concentrations of peak LH (pLH), the area under the LH response curve for 8 h after GnRH analogue injection (Σ LH), and glucose in the Holstein dairy cows. *: Significant difference ($P < 0.05$) compared with other groups.

実験2 プロピレングリコール投与による血中 LH 濃度の変動

これまでの結果から、LH 分泌調節中枢の末梢側信号物質は血中グルコース濃度であると考えられた。また分娩後早期の乳牛では GnRH 投与に対する LH 分泌反応は低く、血中グルコース量の増加にともなって反応性が改善することも明らかとなった。さらに、グルコース利用阻害剤（2-デオキシ-D-グルコース）の投与によりラットや羊で LH 分泌が抑制されると報告されており（Nagatani, 1996、Funston, 1995）、また、インスリン投与による低血糖で LH 分泌が抑制され、その抑制はグルコースの投与により解除されることも羊で報告されている（Clarke, 1990）。しかしながら、乳牛ではグルコースの点滴投与によって血中グルコース濃度を長期間維持させることは不可能で、分娩後早期の乳牛の血中グルコース濃度を増加させた際の LH 分泌反応を検討することはできない。プロピレングリコールは反芻動物の糖合成経路に対する主要な前駆体であるプロピオン酸類似物質で、経口投与が可能である。乳牛にプロピレングリコールを経口投与すると、その大部分はルーメン壁から急速に吸収され肝臓における糖合成に利用され血中グルコース濃度が上昇する（Studer, 1993、Grummer, 1994）。そこで、分娩後早期で血中グルコース濃度の低い（低栄養状態）乳牛にプロピレングリコールを経口投与し、血中グルコース濃度を増加させた際の LH 分泌反応を検討した。

材料および方法

供試牛

北海道農業試験場畜産センターにおいて飼養されている 14 頭のホルタイン種経産牛を供試し、正常分娩後に、供試牛から子牛を隔離した。供試牛の分

分娩後 9 日目の体重は 646 ± 66 kg、305 日乳量は 9745 ± 995 kg であった。分娩後は供試牛を 1 日 2 回、朝（8:45 から 9:15 の間）および夜（19:00 から 19:30 の間）に搾乳した。供試牛への飼料給与は毎日 2 回、朝の搾乳後と夜の搾乳前に実施し、日量 25~30kg のサイレージ、5kg の乾草、2kg のアルファルファペレット、1kg の加熱大豆と濃厚飼料を給与した。濃厚飼料の給与量は分娩日には 2kg、その後 10 日間に 1kg ずつ給与量を増加させた。分娩後 10 日目以降は採食量と日本飼養標準（1999）に従って濃厚飼料とサイレージを給与し、分娩後 9 日目の時点で、エネルギーバランスを算定した（ -28.3 ± 2.8 Mcal）。水とミネラルブロックは自由摂取させた。また基本的に毎日 10:30 から 16:00 の間、パドックで運動させた。

分娩後 8 日目に供試牛に、三方活栓（トップ社、東京）および延長チューブ（LX1-L100、トップ社、東京）を接続したカテーテル（メディカットカテーテルキット 16G、メディカット社、東京）を頸静脈へ装着した。なお超音波画像診断から分娩後 8 日目の供試牛の卵巢には黄体は存在せず、分娩後 9 日目の血中プロジェステロン濃度は 0.33 ± 0.06 ng/mL と低値であった。

検体の採取

全供試牛の LH 分泌反応が抑制されると期待される分娩後 9 日目の 10:00 から 14:00 まで（投与前）、カテーテルを用いて 10 分間隔で血液検体を採取した。14:00 に 1 L の水（対照群、 $n=7$ ）または 1 L の 100%プロピレングリコール（166-07256、和光純薬工業、大阪）（プロピレングリコール群、 $n=7$ ）を数分以内に経口投与した。投与後、カテーテルを用いて 10 分間隔で投与後 5 時間（投与後）までの血液検体を採取した。採取した血液はそれぞれヘパリン入りの試験管に入れ遠心し、血漿を分離した。得られた血漿は LH、グルコース、FFA、ならびにインスリン濃度の測定まで -35°C で保存した。

測定

血漿中 LH 濃度は、ラジオイムノアッセイ 2 抗体法により測定した。測定には ^{125}I 標識した牛 LH 標準品（クロラミン T 法、AFP11743B、NIDDK ナショナルホルモン&下垂体プログラム、カリフォルニア、米国）と抗牛 LH 抗体（バイオジェネシス社、プーレ、イギリス）および当研究室で作製した抗ウサギ IgG 羊血清を用いた。血漿中インスリン濃度は、市販のラジオイムノアッセイキット（インスリン栄研、栄研化学、東京）を用いて測定した。血中グルコースならびに FFA 濃度は、第 2 章と同様オートアナライザーで測定した。

統計学的解析

各供試牛の投与前と投与後それぞれ全検体のグルコース、FFA、ならびにインスリンの平均濃度を算出した。各供試牛の投与前と投与後の LH 分泌反応の指標として、平均 LH 濃度、1 時間あたりの LH パルス数ならびにその振幅を Merriam と Watcher (Merriam, 1982) のアルゴリズムと Canfield と Butler (Canfield, 1990) の G カットオフ基準値を用いて算出した。群間および投与前後間のデータを反復測定分散分析と最小有意差検定法により解析した。全ての結果は平均 \pm 標準誤差として表示した。

結果

図 3-4 に投与前後の血中グルコース、FFA、およびインスリン濃度の変動を示した。投与前の血中グルコース、FFA、ならびにインスリン濃度に群間差は認められなかった。一方投与前後の比較では、プロピレングリコール投与群では投与後の血中グルコース濃度とインスリン濃度は投与前に比較して有意 ($P < 0.05$) に高かったが、対照群では水の投与前後に血中グルコース、FFA、

ならびにインスリン濃度に有意な変動は認められなかった。投与前の LH 分泌反応の指標（平均 LH 濃度、1 時間あたりの LH パルス数ならびにその振幅）に群間に有意な差は認められなかったが（図 3-5）、投与後のプロピレングリコール投与群では投与後に平均 LH 濃度は有意に増加した（ $P < 0.05$ ）。また 1 時間あたりの LH パルス数も投与前と比較して有意に増加し（ $P < 0.05$ ）、投与後の対照群との比較でも有意に高かった（ $P < 0.05$ ）。一方、対照群では水の投与前後に有意な変動は認められなかった。図 3-6 にプロピレングリコール群の典型的な投与前後の血中 LH 濃度の推移を示した。投与前 LH パルス数は 2 回であったが、投与後には 4 回と LH パルス数は明らかな増加を示した。

考察

供試牛の飼養管理、ホルモンの測定方法およびデータの解析方法等により差が生じるため報告者による違いはあるが、分娩後早期の乳牛の 1 時間あたりの LH パルス数は、1 時間あたり 0.2～1.2 回の範囲と報告されており（Peters, 1981、Savio, 1990、Canfield, 1991、Zurek, 1995、Beam, 1999）、性周期中の発情前期の 1 時間あたり 1.1～2.6 回（Walters, 1984、Schallenberger, 1984）と比較して少なく、分娩後早期の乳牛では LH 分泌は抑制されていると考えられている。本実験においてもプロピレングリコール投与前の LH パルス数はこれまでの報告と同様の範囲で、1 時間あたり約 0.2 回とその数は少なく、LH 分泌は抑制されていた。本実験で供試した分娩後早期の乳牛はいずれもエネルギーバランスが負の状態、血中グルコース濃度も約 40mg/dL と低い。これら乳牛に、プロピレングリコールを投与すると血中グルコース濃度が約 50～60mg/dL に増加するとともに、平均 LH 濃度ならびに 1 時間あたりの LH パルス数が有意に増加した。すなわち、分娩後早期

の乳牛において LH 分泌は抑制されており、プロピレングリコール投与による血中グルコース濃度の増加により、その抑制が解除されることを示している。反芻動物でプロピレングリコール投与と繁殖成績との関係について検討した報告は少ないが、乳牛でプロピレングリコールを分娩前に飼料に混合して給与し、さらに分娩後に経口投与させると、分娩後初回排卵が早期化されると報告されている (Formigoni, 1996)。また単胃動物でも絶食により視床下部からの GnRH 分泌が抑制され、再給餌により数十分以内にその抑制が解除されることが認められている (Temple, 2000)。さらに育成牛でも長期間の絶食後にグラスサイレージを再給餌すると数時間以内に血中 LH 濃度の上昇が観察されている (McCann, 1986)。

本実験は分娩後の血中グルコース濃度が低下した乳牛に対して血中グルコース濃度を健常域に増加させた場合の LH 分泌の変動を観察したもので、ラットや羊で報告されているインスリンやグルコース利用阻害剤 (2-デオキシ-D-グルコース) を用いた方法による低血糖状態あるいは脳のグルコース利用阻害で認められている LH 分泌の抑制 (Nagatani, 1996、Funston, 1995、Clarke, 1990) とは本質的には異なる。しかしながら、本実験の結果からも血中グルコース濃度が低下している場合には LH 分泌は抑制され、血中グルコース濃度を増加させると抑制が解除されることから、血中グルコース濃度が LH 分泌調節中枢に対する重要な末梢側信号物質であることは明らかである。

プロピレングリコール投与により血中グルコース濃度の増加とともに血中インスリン濃度も増加した。Bucholtz ら (Bucholtz, 2000)、Tanaka ら (Tanaka, 2000) や Blache ら (Blache, 2000) は、インスリンはグルコースと協調して LH 分泌調節中枢に作用する末梢側信号物質と推測している。また羊では末梢血中のインスリン濃度と脳脊髄液中のインスリン濃度は正の相関を示すと報告されているが (Tanaka, 2000)、通常血中インスリン濃度の増

加は血中グルコース濃度の増加に伴って発現することから、プロピレングリコール投与により直接血中インスリン濃度が増加したとは考えられない。したがって、LH 分泌調節中枢に対する末梢側信号物質としては血中インシュリン濃度は付随的なもので血中グルコース濃度が重要と考えられる。

以上の結果、分娩後早期のエネルギーバランスが負で血中グルコース濃度が低い乳牛にプロピレングリコールを投与すると、血中グルコース、ならびにインスリン濃度が増加し、抑制されていた LH 分泌反応が解除された。血中インスリン濃度の増加は血中グルコース濃度の増加に基づくため、LH 分泌調節中枢に対する末梢側信号物質は血中グルコース濃度であると考えられた。

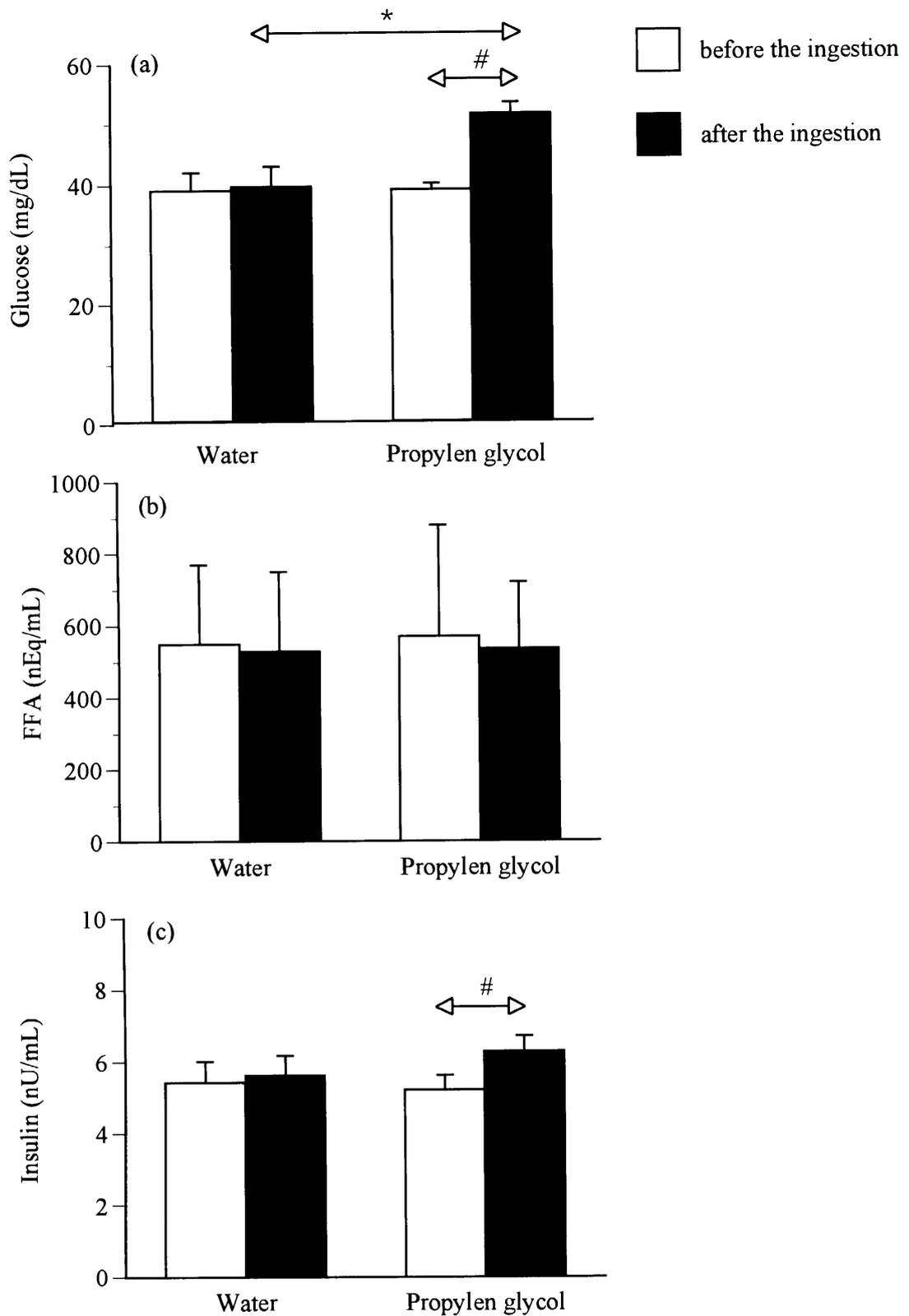


Fig. 3-4. Plasma glucose (a), FFA (b), and insulin (c) concentrations before (white column) and after (black column) the ingestion of water or propylene glycol at early postpartum phase in the Holstein dairy cows. Bars represent the mean \pm SEM. #: Significant difference ($P < 0.05$) between before and after the ingestion. *: Significant difference ($P < 0.05$) between the water and the propylene glycol ingestion.

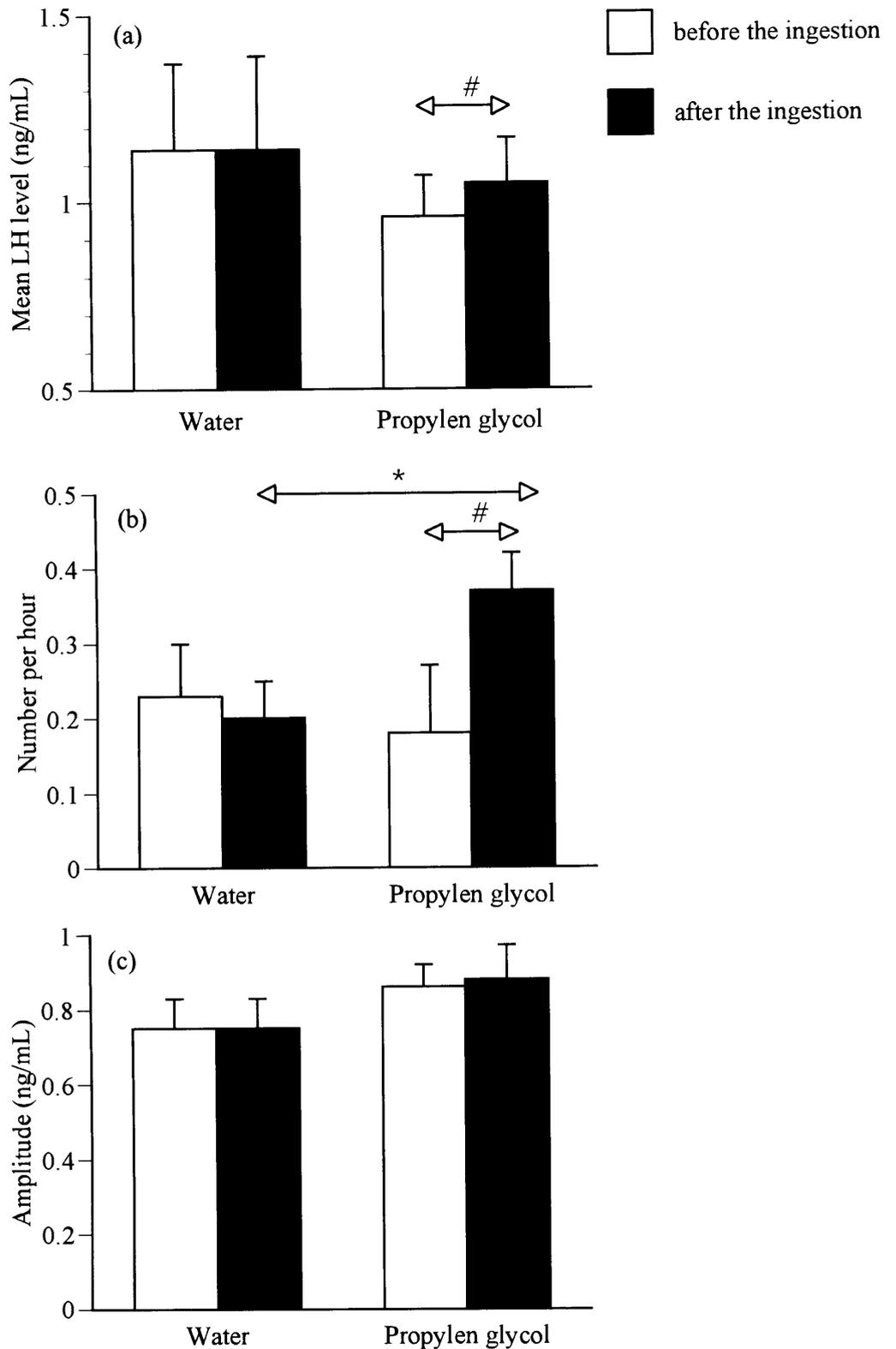


Fig. 3-5. The mean LH level (a), the number of LH peaks per hour (b), and the amplitude of the LH peaks (c) before (white column) and after (black column) the ingestion of water or propylene glycol at early postpartum phase in the Holstein dairy cows. Bars represent the mean \pm SEM. #: Significant difference ($P < 0.05$) between before and after the ingestion. *: Significant difference ($P < 0.05$) between the water and the propylene glycol ingestion.

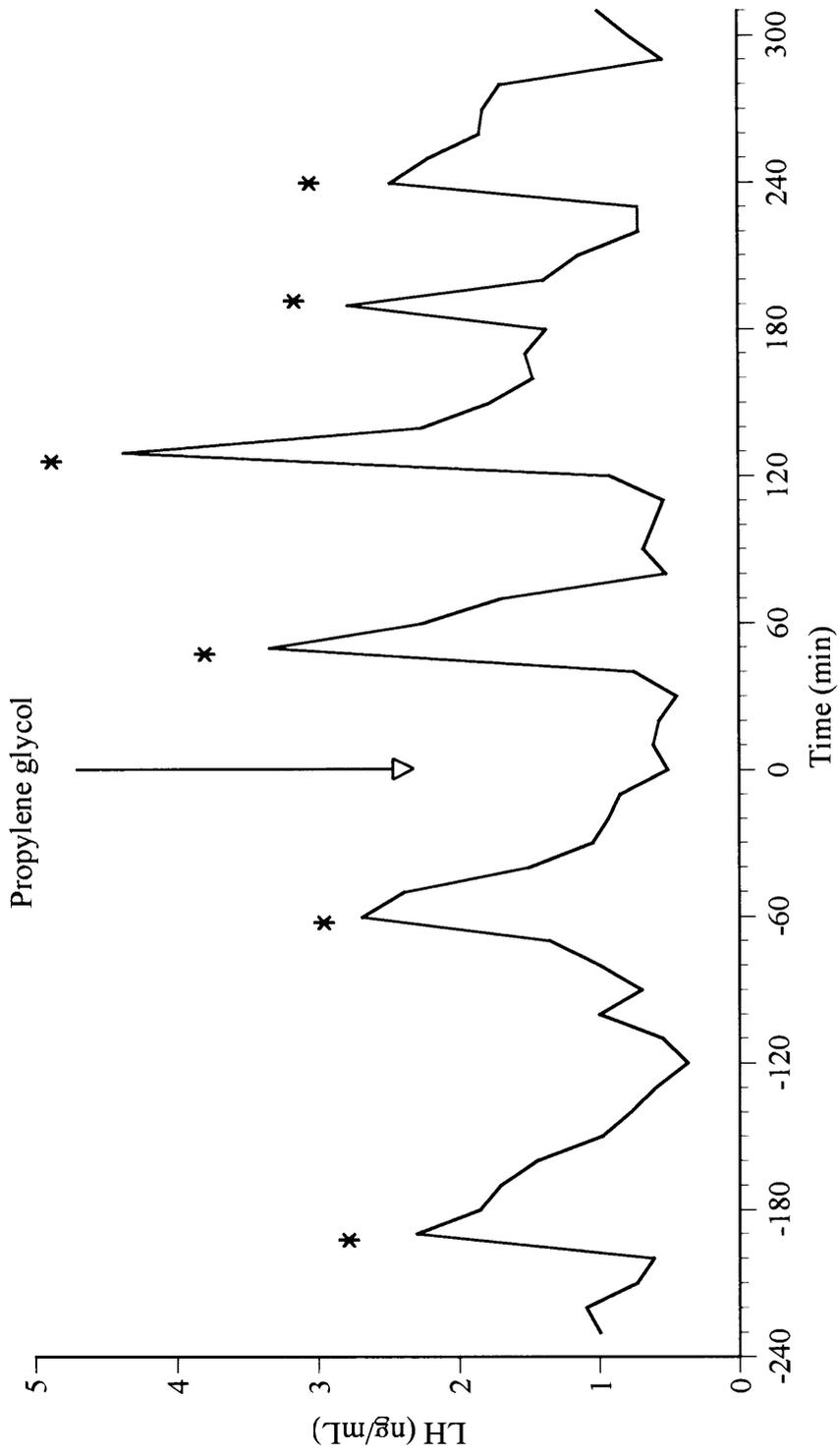


Fig. 3-6. Typical changes of plasma LH concentration before and after the ingestion of propylene glycol at early postpartum phase in a Holstein dairy cow. Asterisks indicate the LH pulse. Increase of the LH pulse is noted after the propylene glycol ingestion.

実験3 FFA 投与による血中 LH 濃度の変動

第2章の結果から血中グルコース濃度とともに血中 FFA 濃度も LH 分泌調節中枢に作用する重要な末梢側信号物質であると考えられた。Grimard ら (Grimard, 1995) は、分娩後の肉牛では1時間あたりの LH パルス数と血中 FFA 濃度の間には有意な負の相関関係 ($P < 0.01$) が存在すると報告している。しかしながら、エネルギー充足が満たされている状態の雌成羊 (Estienne, 1989) およびエネルギー充足が過剰な状態の性成熟前の雌子羊 (Estienne, 1990) では、FFA を点滴投与しても LH 分泌反応は抑制されず、FFA 濃度の影響を受けない。このように、血中 FFA 濃度と LH 分泌反応との関係についてはいまだ明確ではなく、とくにエネルギー充足が満たされていない分娩後早期の乳牛における関係は不明である。そこで分娩後早期の乳牛に FFA を投与し、LH 分泌反応との関連を検討した。

材料および方法

供試牛

北海道農業試験場畜産センターにおいて飼養されている 11 頭のホルスタイン種経産牛を供試し、正常分娩後に、供試牛から子牛を隔離した。分娩後は供試牛を1日2回搾乳した。供試牛への飼料給与は毎日2回、朝の搾乳後と夜の搾乳前に実施し、日量 25~30kg のサイレージ、5kg の乾草、2kg のビートパルプ、1kg の圧扁大豆と濃厚飼料を給与した。濃厚飼料の給与量は分娩日には 2kg、その後 10 日間に 1kg ずつ給与量を増加させた。分娩後 10 日目から 13 日目まで同量を給与し、それ以後には採食量と日本飼養標準 (1999) に従って濃厚飼料とサイレージを給与した。供試牛の分娩後 13 日目の体重は

636 ± 21 kg で、同日にエネルギーバランスを算定した (-14.1 ± 1.9 Mcal)。水とミネラルブロックは自由摂取させた。

分娩後 12 日目に供試牛に、三方活栓（トップ社、東京）および延長チューブ(LX1-L100、トップ社、東京)を接続したカテーテル（メディカットカテーテルキット 16G、メディカット社、東京）を左右の頸静脈へ装着した。なお超音波画像診断から全ての供試牛の卵巢には黄体は存在せず、血漿中プロジェステロン濃度は 0.23 ± 0.05 ng/mL と低値であった。

FFA の投与と検体の採取

全供試牛が初回排卵よりも前であると予測される分娩後 13 日目の FFA 濃度が安定している 14:00 から 20:30 まで、カテーテルを用いて 10 分間隔で血液検体を採取した。このうち 14:00 から 14:20 の検体を投与前期の値とした。ついで 14:30 から 17:30 まで、250mL の生理食塩水(生食群、n=5) または 250mL の FFA(FFA 群、n=6 ; Intralipid20、ファルマシア AB 社、ストックホルム、スウェーデン)を反対側のカテーテルを通じてペリスタポンプ (AC2120、アトー社、東京)を用いて、Estienne ら (Estienne, 1989) ならびに Filley ら (Filley, 1999) の報告に基づき静脈内に点滴投与した。採取した血液はそれぞれヘパリン入りの試験管に入れ遠心し、血漿を分離した。得られた血漿は LH、グルコース、FFA、ならびにインスリン濃度の測定まで 35°C で保存した。また 14:00 の検体については血中プロジェステロン濃度を測定した。

測定

測定項目は LH、グルコース、FFA、ならびにインスリンとし、血中グルコース、FFA 濃度は第 2 章と同じオートアナライザーを用いた方法で、血漿

中 LH 濃度は、本章実験 2 と同じラジオイムノアッセイ 2 抗体法により測定した。また、血中インスリン濃度は、本章実験 2 と同じ市販のラジオイムノアッセイキット(インスリン栄研、栄研化学、東京)を用いて測定した。

統計学的解析

投与前の両群 (FFA 群と生食群) について全検体の血中グルコース、FFA、インスリン濃度の平均を算出し、投与前の値とした。また FFA 群については血中 FFA 濃度が生食群と比較して有意な高値を示す、FFA 投与中の 3 時間ならびに投与終了後 2 時間の計 5 時間の検体を投与後の値とし (図 3-7)、血中グルコース、FFA、インスリン濃度の平均を算出した。また生食群についてもこれに相当する 5 時間の血中グルコース、FFA、インスリン濃度の平均を算出した。FFA とインスリンのデータは個体差が大きく、かつ、濃度が高いほどバラツキが大きいと判断されたため対数変換した上で以後の解析に用いた。一方、投与後の各供試牛の LH 分泌反応の指標として平均 LH 濃度、1 時間あたりの LH パルス数ならびにその振幅を、本章実験 2 と同様の方法により算出した。投与前における血中グルコース、FFA、ならびにインスリン濃度、および LH 分泌反応の指標については T 検定により群間の平均値を比較した。投与後における血中グルコース、FFA、ならびにインスリン濃度については、個体差を除去するために投与前のデータを共変量として用いた共分散分析により解析し、投与物の違いによる効果が認められた場合には Fisher の PLSD 検定により群間の平均値を比較した。全ての結果は平均 \pm 標準誤差として表示した。

結果

投与前の血中グルコース、FFA、ならびにインスリン濃度に、群間に差は

認められなかった（図 3-8）。共分散分析の結果、FFA 投与により有意な FFA 濃度増加効果が認められた（ $P<0.01$ ）。また、FFA 群、生食群ともに投与後の血中グルコースならびにインスリン濃度いずれにも有意な変動は認められなかった。一方、投与後の平均 LH 濃度、1 時間あたりの LH パルス数ならびにその振幅のいずれについても FFA 群と生食群との間に有意な変動は認められなかった（図 3-9）。

考察

分娩後早期のエネルギー欠乏状態では、乳牛は体脂肪の動員によって不足エネルギーを補っている。Roche ら（Roche, 2000）は体脂肪動員に依存している日数と初回排卵日数との間に正の相関関係があることを認めている。しかしながら、本実験の結果、投与後の FFA 濃度は FFA 群で生食群よりも有意に高かったが、LH 分泌反応の指数に FFA 投与による変動は認められなかった。また前述したごとく、エネルギー充足が満たされている状態の雌成羊（Estienne, 1989）ならびにエネルギー充足が過剰な状態の性成熟前の雌子羊（Estienne, 1990）いずれにおいても、FFA の点滴投与では LH 分泌反応の変動は観察されていない。さらに、Filley ら（Filley, 1999）は分娩後の肉牛に対して長期間の FFA 投与を実施しても初回排卵日数は延長しないと報告している。さらに本章実験 2 のプロピレングリコール投与時では、血中グルコース濃度の増加ならびに LH 分泌反応の指標である平均 LH 濃度および 1 時間あたりの LH パルス数の増加が観察されるにもかかわらず、血中 FFA 濃度は低下を示さず変動していない。

Grimard ら（Grimard, 1995）は、分娩後の肉牛において 1 時間あたりの LH パルス数と血中 FFA 濃度の間に負の相関関係があると報告している。しか

しながらエネルギー充足度を表す血中グルコース濃度と FFA 濃度とは負の相関を表すことが明らかで、血中 FFA 濃度は単にエネルギー不足の指標の一つであり、LH 分泌調節中枢に関連する末梢側信号物質とは考えられない。

一方、*in vitro* で精巣ライディッヒ細胞からのテストロン分泌に対して FFA は抑制的な効果を有すると報告されている (Meikle, 1989)。この抑制効果は薬理的な効果とは考えられるが、FFA が直接卵巢におけるステロイドホルモン分泌を抑制する可能性は否定できない。乳牛における分娩後の初回排卵にこのステロイドホルモン分泌抑制が影響することを考慮する必要はあるかもしれないが、血中 FFA 濃度が LH 分泌調節中枢に作用するとは考えられない。

以上の結果、血中 FFA 濃度の変動は血中グルコース濃度の低下に対応するもので、分娩後早期の乳牛における LH 分泌調節中枢に対する末梢側信号物質であるとは考えられなかった。

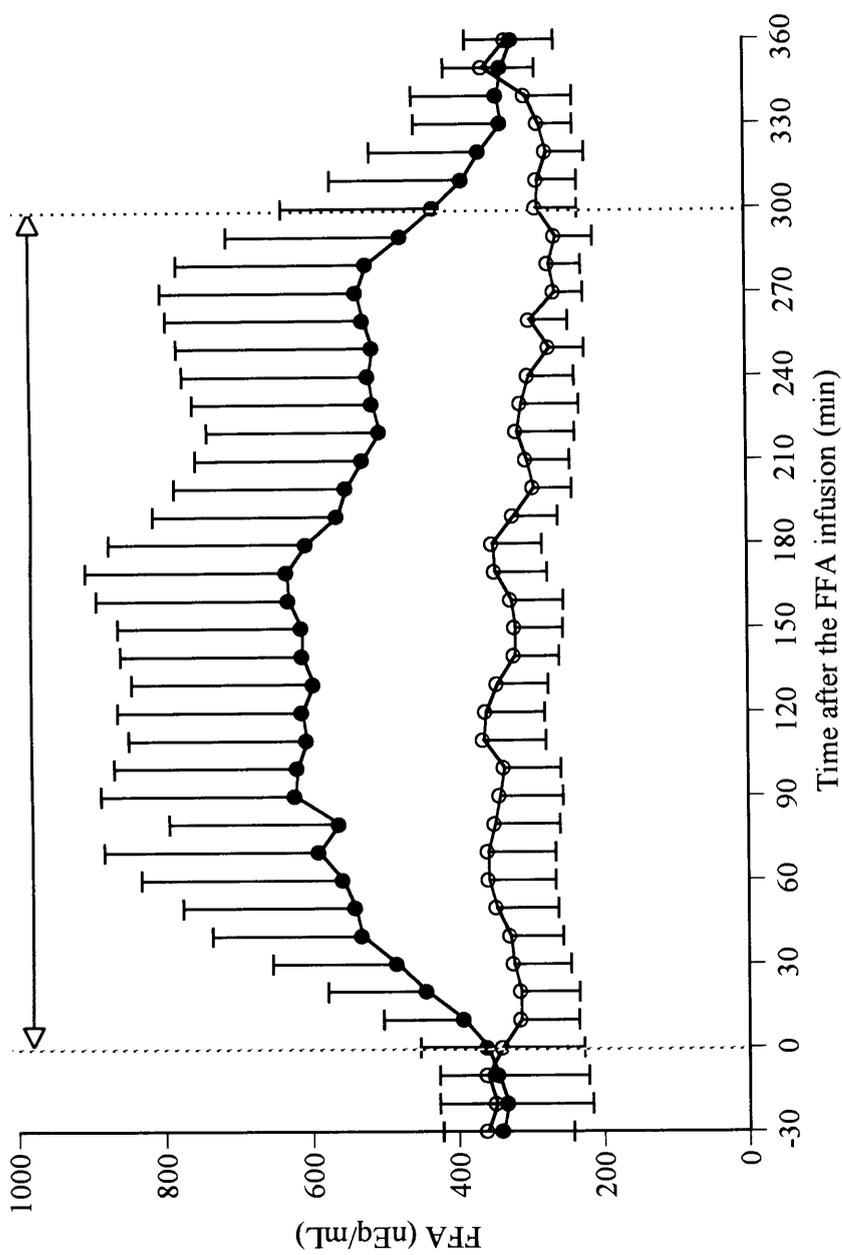


Fig. 3-7 Changes of plasma FFA concentrations after the treatment with FFA (closed circle) or saline (open circle). Statistical analysis was carried out during the infusion period from 0 to 300 min, in which plasma FFA concentrations are significantly higher in FFA treatment group than those in saline treatment group. Values are the mean \pm SEM.

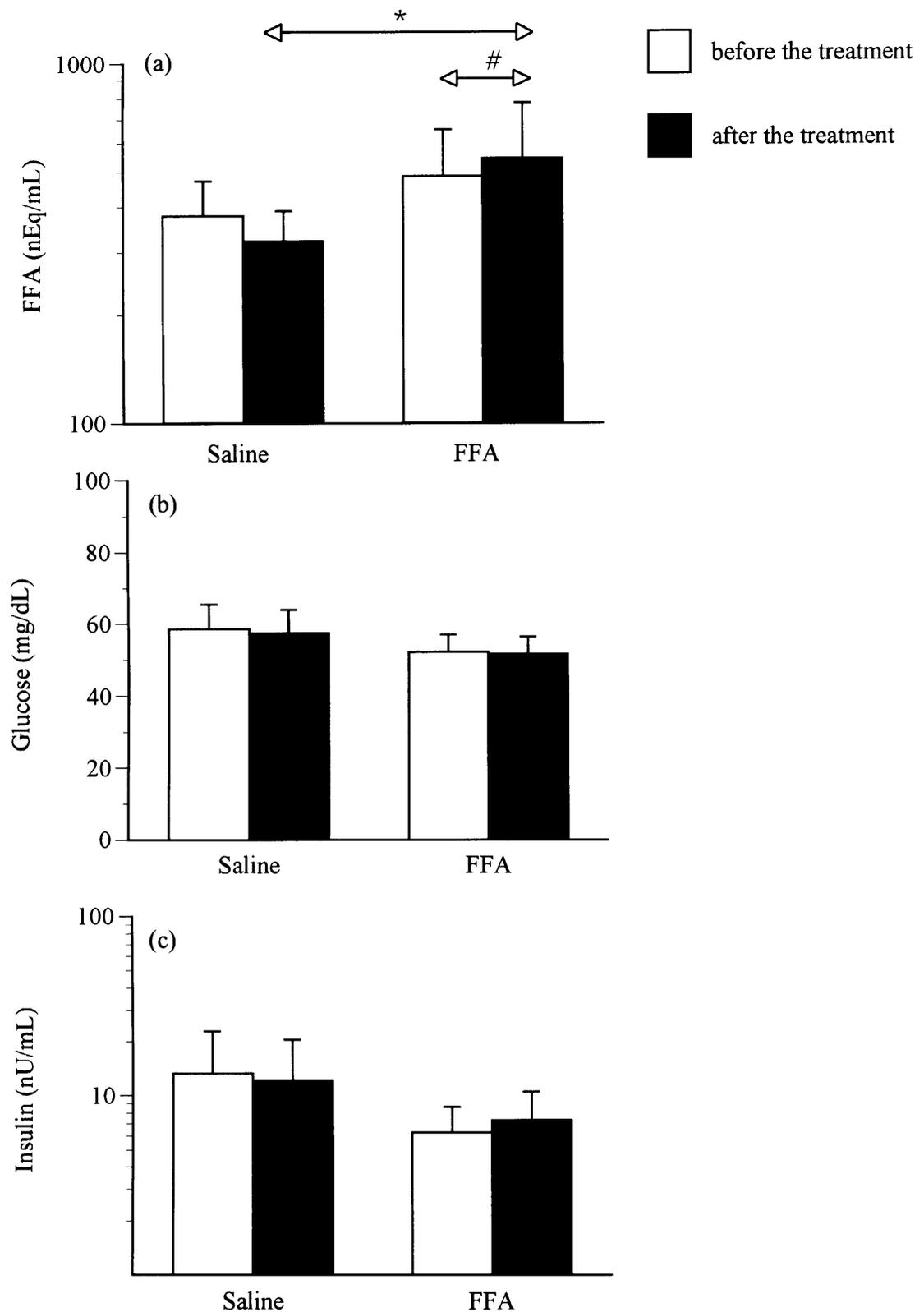


Fig. 3-8. Plasma FFA (a), glucose (b), and insulin (c) concentrations before (white column) and after (black column) the treatment with saline or FFA at early postpartum phase in the Holstein dairy cows. Bars represent the mean \pm SEM. *: Significant difference ($P < 0.01$) between the treatment with FFA and saline. #: Significant difference ($P < 0.001$) between before and after the treatment.

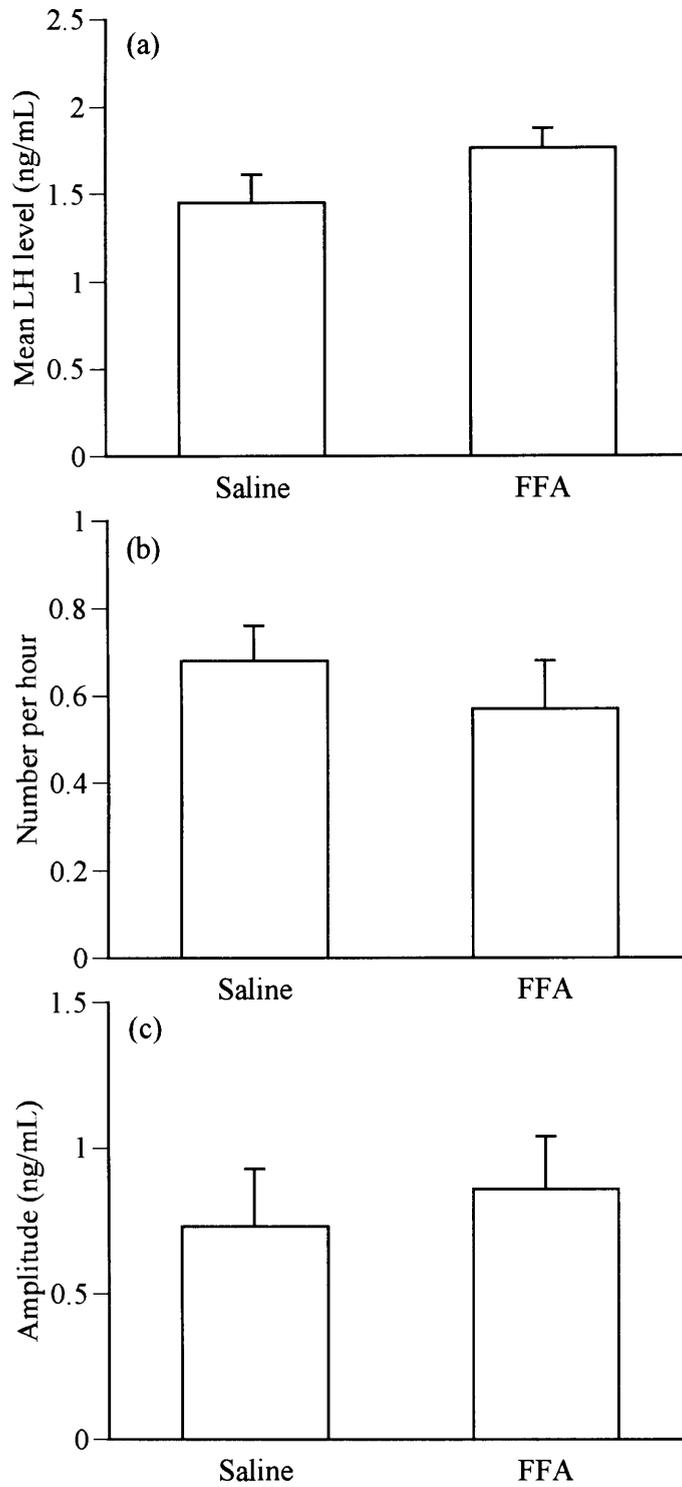


Fig. 3-9. The mean LH level (a), the number of LH peaks per hour (b), and the amplitude of the LH peaks (c) after the treatment with FFA or saline in the early postpartum Holstein dairy cows. Bars represent the mean \pm SEM.

実験4 エストロジェンレセプターアンタゴニスト投与による血中 LH 濃度の変動

絶食による LH 分泌の抑制は卵巣摘出ラットではエストロジェンを投与した場合にのみ生じることが知られており (Cagampang, 1991、Cagampang, 1997)、血中グルコース濃度の低下による LH 分泌抑制機構におけるエストロジェンの重要性が考えられている (Cagampang, 1991、Cagampang, 1997)。前章までの結果から、分娩後早期の乳牛では血中グルコース濃度が低く、また LH 分泌は抑制された状態であった。タモキシフェンは実験動物で一般的に用いられるエストロジェンレセプターアンタゴニストで、これまでに反芻動物に対して用いた報告は少ないが (Jacobs, 1988)、細胞膜および核膜を通過してエストロジェンレセプターに結合する脂溶性の物質である。そこで絶食させたホルスタイン種雌牛について、タモキシフェンを投与し、LH 分泌の変動を検討した。

材料および方法

供試牛

北海道農業試験場畜産センターにおいて、飼養されている 29 頭の春機発動後のホルスタイン種未経産牛 (体重 323 ± 4 kg, 11 ヶ月齢) を供試した。日本飼養標準 (1994) に従って日量 8kg のサイレージ、4kg の乾草、3kg の濃厚飼料を給与した (乾物約 8.5 kg、代謝エネルギー約 18.6Mcal、粗蛋白約 479g に相当)。水は自由摂取とした。

供試牛は LH 分泌反応のばらつきを最小にするために、20mg のプロスタグランジン製剤 (ジノプラスト、プロナルゴン F、武田製薬、大阪) を 11 日

間隔で2回筋肉内投与し、性周期を同期化させた。全供試牛をランダムに2群に分け、絶食処置（絶食群、n=14）あるいは飼料給与（給餌群、n=15）とし、絶食は性周期の排卵日から排卵後4日目までの4日間とした。なおこの期間は排卵後4日間が性周期中でもっともLH分泌反応が活発であるという報告（Walters, 1984）に基づいて決定した。

排卵後3日目に供試牛に、三方活栓および延長チューブ(LX1-L100、トップ社、東京)を接続したカテーテル（メディカットカテーテルキット 14G、アーガイル社、東京）を頸静脈へ装着した。

検体の採取

排卵後4日目の10:00から14:00まで、カテーテルを用いて10分間隔で血液検体（投与前検体）を採取した。14:00に各群の供試牛をさらにランダムに細分した。すなわち、生理食塩水（1.5mL）、エタノール（1.5mL）、あるいは1.5mLのエタノールに溶解した35mgのタモキシフェン（T-5648、シグマケミカル社、セントルイス、米国）投与群とし、それぞれカテーテルから数秒で投与した（生理食塩水を投与した絶食群は4頭、その他の群は全て5頭）。投与後、引き続きカテーテルを用いて10分間隔で投与後4時間までの血液検体（投与後検体）を採取した。採取した血液はそれぞれヘパリン入りの試験管に入れ遠心分離し、血漿はLHの測定まで-35°Cで保存した。投与前の最初の検体は血中グルコース濃度の測定にも用いた。

測定

血漿中LH濃度は、クロラミンT法で標識した¹²⁵I牛LH（UCBバイオプロダクト社、ブリュッセル、ベルギー）と抗牛LH抗体（UCBバイオプロダク

ト社) および当研究室で作製した抗ウサギγグロブリン羊血清を用いたラジオイムノアッセイ 2 抗体法で測定した。血中グルコース濃度は、オートアナライザーを用いて測定した。

統計学的解析

各供試牛の投与前と投与後それぞれにおける LH 分泌反応の指標として平均 LH 濃度、1 時間あたりの LH パルス数ならびにその振幅を本章実験 2 と同様の方法で算出した。投与前の LH 分泌反応の指標と血中グルコース濃度については絶食群と給餌群との間の違いを T 検定により解析した。また 6 群それぞれにおいて投与前後の LH 分泌反応の指標の変動を paired T 検定により解析した。ついで、投与後における LH 分泌反応の指標については個体差を除去するために投与前のデータを共変量として用いた共分散分析により、絶食と給餌の違いによる効果(絶食効果)、投与物の違いによる効果(投与物差効果)、ならびに絶食効果と投与物差効果の間の交互作用を解析した。全ての結果は平均 ± 標準誤差として表示した。

結果

投与前では、絶食群の血中グルコース濃度は給餌群に比べ有意 ($P < 0.001$) に低かったが、その差は小さく約 5% 低下しただけであった(図 3-10)。また投与前の LH 分泌反応の指標である平均 LH 濃度、1 時間あたりの LH パルス数ならびにその振幅いずれにも絶食群と給餌群の間に差は認められなかった(図 3-11)。

図 3-12 に給餌下の牛群における生食、エタノール、あるいはエタノールに溶解したタモキシフェンの投与前後の平均 LH 濃度、1 時間あたりの LH パ

ルス数ならびにその振幅を示した。給餌下ではエタノール投与群と生食投与群との間で、平均 LH 濃度ならびに振幅に差は認められなかったが、投与後のエタノール投与群が LH パルス数で有意 ($P < 0.05$) な低値を示した。またエタノール投与群の 1 時間あたりの LH パルス数の投与前後の比較でも投与後の LH パルス数が有意 ($P < 0.05$) な低値を示した。タモキシフェン投与群では生食投与群との比較でも、投与前後を比較しても有意な変動は認められなかった。

一方、絶食下の牛群では、エタノール投与群と生食投与群との間で 1 時間あたりの LH パルス数 ($P < 0.01$) ならびにその振幅 ($P < 0.05$) でエタノール投与群が有意な低値を示した (図 3-13)。また投与前後の比較ではエタノール投与群のみで、投与後の平均 LH 濃度、1 時間あたりの LH パルス数ならびにその振幅いずれも有意な低値を示した。一方、タモキシフェン投与群では生食投与群との比較でも、投与前後を比較しても有意な変動は認められなかった。

すなわち、エタノール投与により給餌下の牛群では 1 時間あたりの LH パルス数が、絶食下の牛群では、平均 LH 濃度、1 時間あたりの LH パルス数ならびにその振幅が有意に低下し、LH 分泌反応が抑制された。一方、給餌下と絶食下いずれにおいてもタモキシフェン投与群では平均 LH 濃度、1 時間あたりの LH パルス数、ならびにその振幅いずれにも変動は認められなかった。

考察

単胃動物においてはエタノールの投与で LH 分泌反応の抑制が認められており、この抑制はエタノールの LH 分泌調節中枢への直接的な作用と考えられている (Canteros, 1995、Nyberg, 1993)。本実験の結果、エタノール投与で、とくに絶食下の牛群で LH 分泌反応の指標である平均 LH 濃度、1 時間あたりの LH パルス数ならびにその振幅が有意に低下し、エタノールによる LH 分泌抑制が反芻動物にも存在すると考えられた。またその抑制は血中グルコース濃度が低下すると増強されると推測された。反芻動物では、絶食による血中グルコース濃度の低下の度合いは単胃動物に比較して低いとされ (Martin, 1973、Sasaki, 1974)、本実験でも約 5% のみの低下であった。また絶食により LH 分泌反応の指標 (平均 LH 濃度、1 時間あたりの LH パルス数ならびにその振幅) に差は認められなかった。したがって、分娩後早期の乳牛に認められる LH 分泌反応の抑制には育成牛の血中グルコース濃度の低下の度合から考えて、血中グルコース濃度が 50% 程度低下することが必要と思われる。一方、給餌下では軽微であるが絶食下では著しい、エタノールによる LH 分泌抑制はエストロゲンレセプターアンタゴニストであるタモキシフェンによって解除された。したがって乳牛における末梢側信号物質と考えられる血中グルコース濃度の低下により LH 分泌抑制が発現する機構に対するエストロジェンの関与が示唆された。

エタノールの投与では卵巢からのエストロゲン分泌や血中エストロゲン濃度の変動は認められておらず (Teoh, 1988)、エタノールは直接 LH 分泌調節中枢に作用して LH 分泌を抑制すると考えられている (Cicero, 1982、Ellingboe, 1987)。しかしながら、LH 分泌調節に密接な関係があるとされる視床下部弓状核にはエストロゲンレセプターを有するオピオイド産生ニュー

ロンが存在する (Lehman, 1993)。また前述したごとく絶食下の卵巢摘出ラットに認められる LH 分泌抑制はエストロジェンを投与した場合にのみ生じるが、同ラットでオピオイドレセプターアンタゴニストを投与した場合に認められる LH 分泌の抑制解除もエストロジェン投与した場合にのみ観察される (Cagampang, 1991、Cagampang, 1997、Nagatani, 1994)。したがって絶食下のラットにおける血中グルコース濃度による LH 分泌抑制についてはオピオイド産生ニューロンを介した LH 分泌調節中枢を考慮する必要があると考えられる。

以上の結果、分娩後早期の乳牛に認められる血中グルコース濃度の低下にともなう LH の分泌抑制にはエストロジェンが何らかの作用を有しているものと推測された。

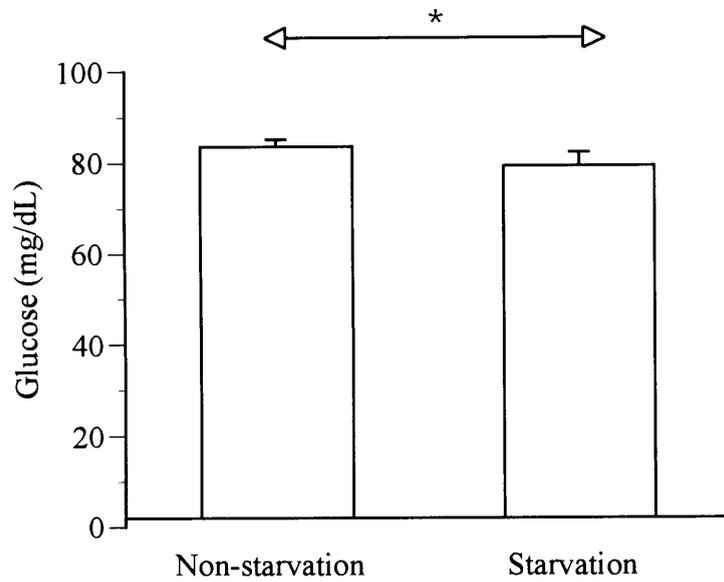


Fig. 3-10. Plasma glucose concentration in the Holstein heifers. Bars represent the mean \pm SEM. *: Significant difference ($P < 0.001$) between non-starvation and starvation groups.

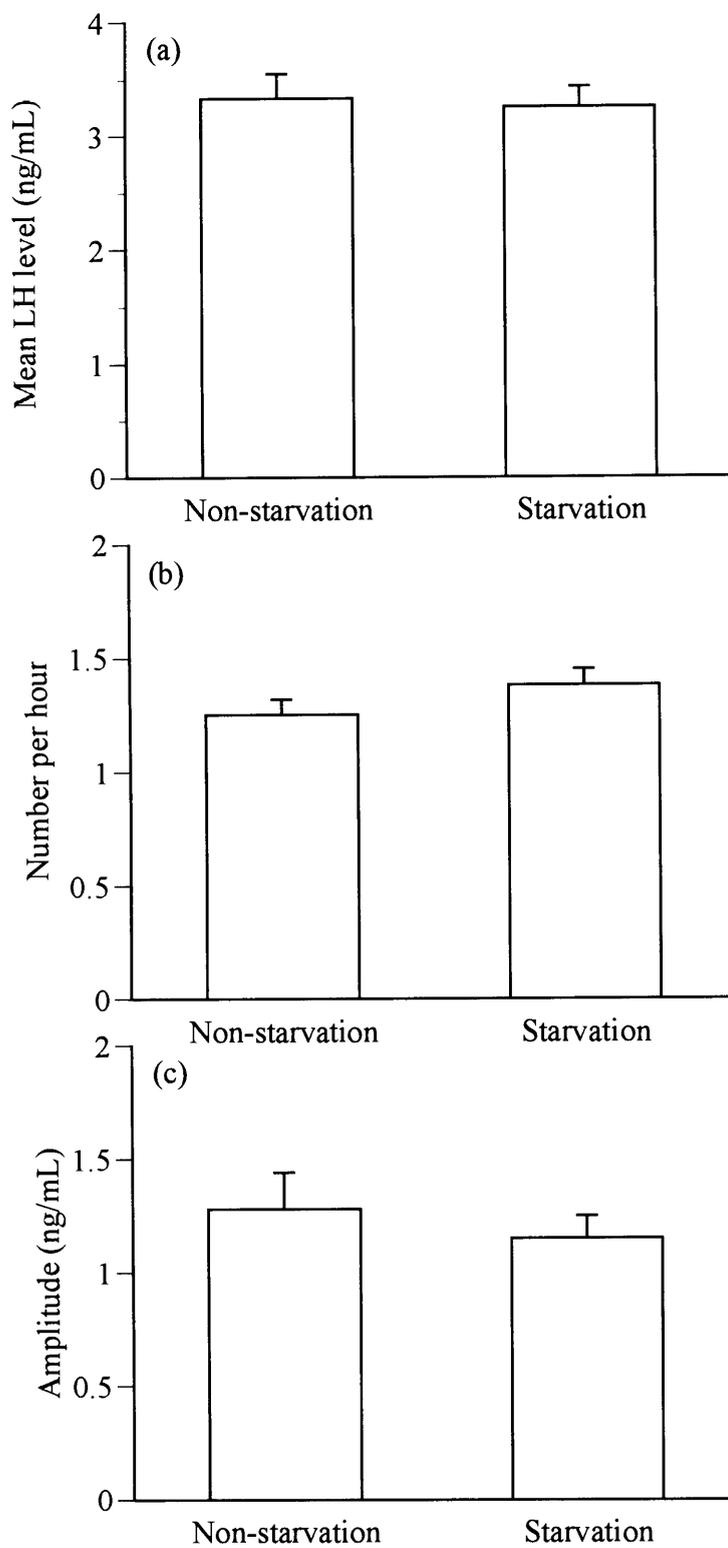


Fig. 3-11. The mean LH level (a), the number of LH peaks per hour (b), and the amplitude of the LH peaks (c) in the Holstein heifers with or without starvation. Bars represent the mean \pm SEM.

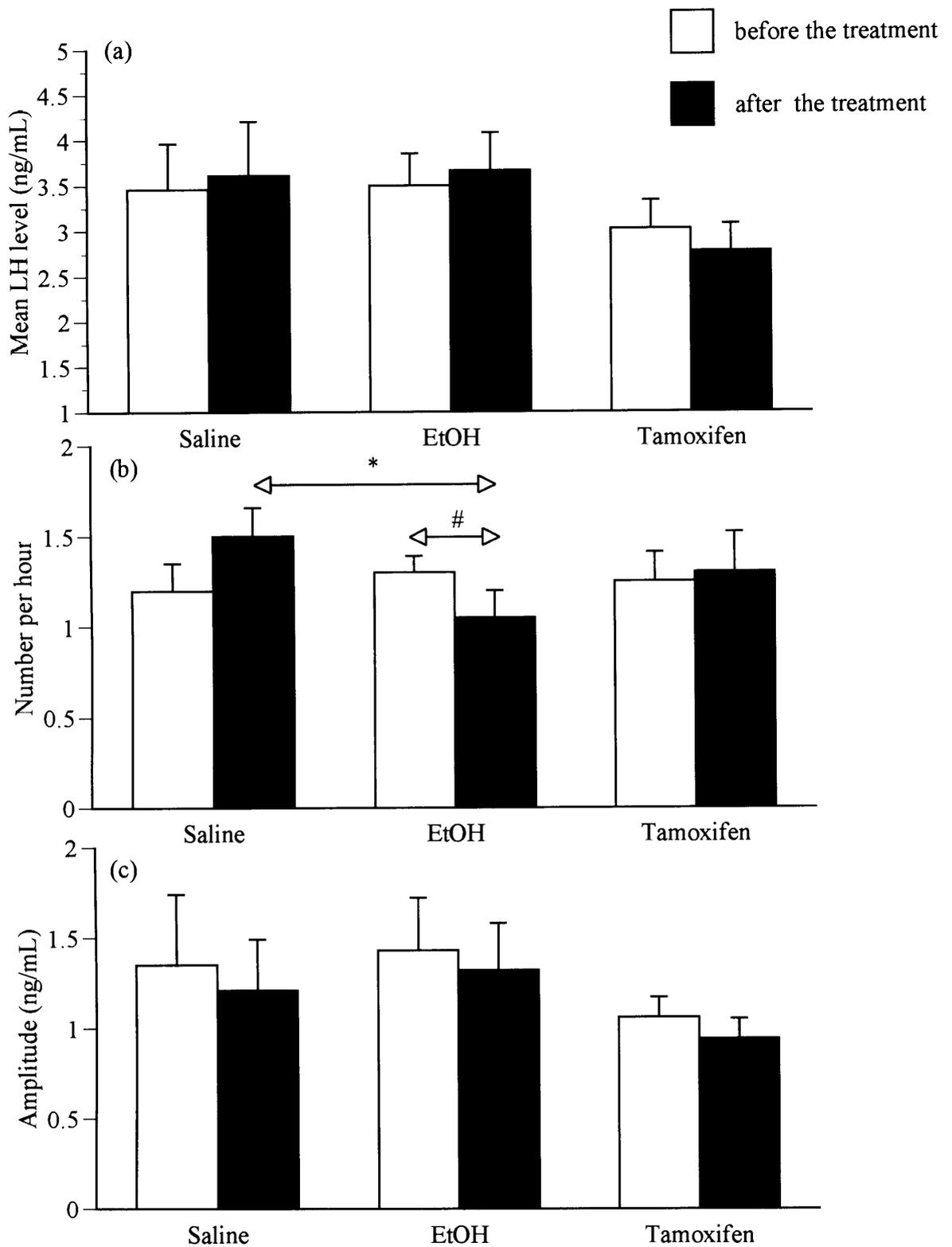


Fig. 3-12. The mean LH level (a), the number of LH peaks per hour (b), and the amplitude of the LH peaks (c) before (white column) and after (black column) the treatment with saline (Saline), ethanol (EtOH) or tamoxifen dissolved in ethanol (Tamoxifen) in the Holstein heifers without starvation. Bars represent the mean \pm SEM. *: Significant difference ($P < 0.05$) compared to saline group. #: Significant difference ($P < 0.05$) between before and after the treatment.

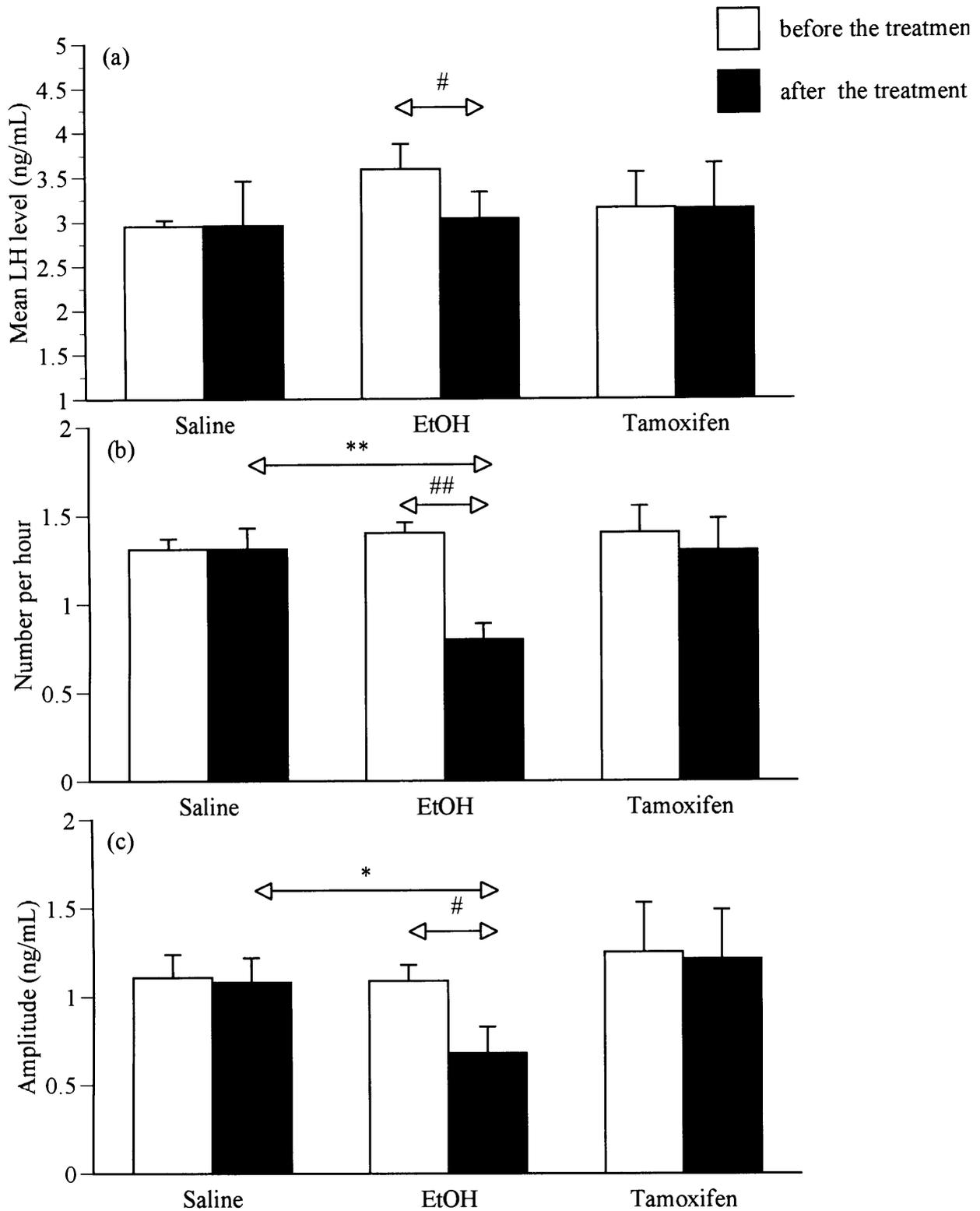


Fig. 3-13. The mean LH level (a), the number of LH peaks per hour (b), and the amplitude of the LH peaks (c) before (white column) and after (black column) the treatment with saline (Saline), ethanol (EtOH) or tamoxifen dissolved in ethanol (Tamoxifen) in the Holstein heifers with starvation. Bars represent the mean \pm SEM. *: Significant difference ($P < 0.05$) compared to saline group. # and ##: Significant difference ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively) between before and after the treatment.

実験5 オピオイドレセプターアンタゴニスト投与による血中 LH 濃度の変動

ラットでは絶食による LH 分泌の抑制はオピオイドレセプターアンタゴニストの投与により観察されなくなり (Cagampang, 1991、Cagampang, 1997、Dyer, 1985)、血中グルコース濃度の低下にともなう LH 分泌抑制にはオピオイド依存性の LH 分泌調節中枢が推定されている。またラットの組織学的な研究で、脳内の GnRH ニューロンはオピオイドレセプター保有細胞に周囲を囲まれ、シナプス結合されていると考えられている (Sannella, 1997)。分娩後で LH 分泌抑制の認められる乳牛について、Canfield と Butler (Canfield, 1991) は、作用時間の短いナロキソンを比較的低量点滴投与した場合には LH 分泌の抑制の解除は認められないと報告しているが、Ahmadzadeh ら (Ahmadzadeh, 1998) は、大量のナロキシソンの静脈内投与では、投与後に血中 LH 濃度が増加することを認めており、分娩後早期の乳牛におけるオピオイド依存性の LH 分泌調節中枢については一定の見解が得られていない。

ナルトレキソンは作用時間の長いオピオイドレセプターアンタゴニストである (Meijs-Roelofs, 1989)。そこで、分娩後早期の乳牛にナルトレキソンを静脈内投与し、血中グルコース濃度の低下に関連するオピオイド依存性の LH 分泌調節中枢について検討した。

材料および方法

供試牛

北海道農業試験場畜産センターにおいて飼養されている 10 頭のホルスタイン種経産牛を供試し、正常分娩後に子牛を隔離した。供試牛の分娩後 9 日

目の体重は 646 ± 66 kg、305 日乳量は 9387 ± 580 kg であった。分娩後は供試牛を 1 日 2 回、朝および夜に搾乳した。供試牛への飼料給与は毎日 2 回、朝の搾乳後と夜の搾乳前に実施し、日量 25~30kg のサイレージ、5kg の乾草、2kg のアルファルファペレット、2kg のビートパルプ、1kg の加熱大豆と濃厚飼料を給与した。濃厚飼料の給与量は分娩日には 3kg、その後 6 日間に 1kg ずつ給与量を増加させた。分娩後 6 日目以降は採食量と日本飼養標準（1999）に従って濃厚飼料とサイレージを給与した。水とミネラルブロックは自由摂取させた。

分娩後 9 日目に供試牛に、三方活栓（トップ社、東京）および延長チューブ（LX1-L100、トップ社、東京）を接続したカテーテル（メディカットカテーテルキット 16G、メディカット社、東京）を頸静脈へ装着した。なお超音波画像診断から分娩後 9 日目の供試牛の卵巣には黄体は存在せず、分娩後 9 日目の血漿中プロジェステロン濃度は 0.32 ± 0.06 ng/mL と低値であった。

検体の採取

カテーテル装着後、分娩後 10 日目の 10:00 から 14:00 まで、カテーテルを用いて 10 分間隔で血液検体（投与前検体）を採取した。14:00 に 10 mL の生理食塩水（対照群、n=5）または 10 mL の生理食塩水に溶解した 300 mg のナルトレキソン（N-3136、シグマケミカル社、セントルイス、米国）をカテーテルから静脈内投与した（ナルトレキソン群、n=5）。また投与後、カテーテルを用いて 10 分間隔で投与後 5 時間までの血液検体（投与後検体）を採取した。採取した血液はそれぞれヘパリン入りの試験管に入れ遠心し、血漿を分離した。得られた血漿は LH 濃度の測定まで -35°C で保存した。また 10:00 の検体については血中プロジェステロン濃度を測定し、13:00 の検体については血中グルコース濃度を測定した。

測定

血中 LH 濃度は、ラジオイムノアッセイ 2 抗体法により測定した。測定には ^{125}I 標識した牛 LH 標準品と抗羊 LH 抗体 (AFP11743B と AFP192279、NIDDK ナショナルホルモン & 下垂体プログラム、カリフォルニア、米国) および当研究所で作成した抗ウサギ IgG 山羊血清を用いた。血中グルコース濃度は、電極法 (プレシジョン QID、メディセンス社、マサチューセッツ、アメリカ) で測定した。

統計学的解析

各供試牛の投与前と投与後それぞれにおける LH 分泌反応の指標として平均 LH 濃度、1 時間あたりの LH パルス数ならびにその振幅を本章実験 2 と同様の方法で算出した。群間および投与前後間のデータを反復測定分散分析と T 検定により解析した。また、全ての結果は平均 \pm 標準誤差として表示した。

結果

図 3-14 に示したごとく、投与前の血中グルコース濃度にナルトレキソン群と生食群との間には差は認められなかったが、いずれもこれまでの結果と同様血中グルコース濃度は低値を示した。図 3-15 にナルトレキソン投与前後における血中 LH 濃度の典型的な変動を示した。投与前の LH 分泌反応の指標 (平均 LH 濃度、1 時間あたりの LH パルス数ならびにその振幅)、いずれにもナルトレキソン群と生食群との間に差は認められなかった (図 3-16)。投与前後の比較では、生食群では、LH 分泌反応の指標いずれについても投与前後で有意な変動は観察されなかった。一方、ナルトレキソン群では LH パルスの振

幅に変動は認められなかったが、投与前では1時間あたりの LH パルス数は 0.75 回であるのに対し、投与後では 1.20 回と増加し、またそのピーク濃度も高く、平均 LH 濃度と 1 時間あたりの LH パルス数も有意に増加した。

考察

分娩後の LH 分泌反応が抑制された状態の豚 (Barb, 1986)、羊 (Gregg, 1986)、肉牛 (Cross, 1987、Whisnant, 1986、Rund, 1989) にオピオイドレセプターアンタゴニストであり作用時間の短いナロキソンを投与すると LH 分泌の抑制が解除されることが認められている。しかしながらこれらの供試動物はいずれも哺乳させているため、血中グルコース濃度の低下にともなう LH 分泌抑制ばかりでなく子畜の吸乳刺激による LH 分泌の抑制に対するオピオイドレセプターアンタゴニストの投与効果を観察した結果となる可能性を考慮しなければならない (Tsukamura, 1992)。

本実験の結果、哺乳刺激を除外した分娩後早期で血中グルコース濃度の低下した乳牛にナルトレキソンを静脈内投与すると平均 LH 濃度が増加するとともに、1 時間あたりの LH パルス数が有意に増加することが明らかになった。前述した如く、Canfield と Butler (Canfield, 1991) は分娩後の LH 分泌の抑制された乳牛に作用時間の短いナロキソンを投与した場合、少量の投与では LH 分泌反応に変化は認められないと報告しているが、Ahmadzadeh ら (Ahmadzadeh, 1998) は、大量投与で LH 濃度が増加するとしている。本実験におけるナルトレキシソンの投与量は少量であるが、平均 LH 濃度の増加ならびに LH パルス数の増加が認められ、この違いはおそらくは投与した薬剤の作用時間の差によるものと推測される。したがって、オピオイドレセプターアンタゴニストの投与は基本的には血中グルコース濃度の低下により発現した

LH 分泌の抑制を解除すると考えられる。また、ヒトでは拒食症あるいは摂食障害の女性で体重減少とともに無月経症が発現する。この患者にナルトレキソンを投与すると平均 LH 濃度と LH パルス数が増加し、月経周期が再帰されると報告されている (Genazzani, 1995)。したがって、分娩後早期の乳牛においても、このような患者と同様に血中グルコース濃度の低下にともなってオピオイドを介した LH 分泌調節中枢の調節、すなわち LH 分泌抑制が発現しているものと考えられる。

本実験の結果からは、乳牛の脳内におけるオピオイドの産生部位や作用部位は不明である。Leshin ら (Leshin, 1991) はオートラジオグラフィ法を用いて培養した肉牛の視床下部組織には標識オピオイドレセプターアンタゴニストが結合することを報告し、オピオイドの作用部位は視床下部であると推測している。また Lehman と Karsch (Lehman, 1993) ならびに Sannella と Petersen (Sannella, 1997) は免疫染色法や *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた結果から、ラットや羊では GnRH ニューロンが存在し、またその近傍にオピオイド産生ニューロンが存在すること、さらに GnRH ニューロンはオピオイドレセプター保有ニューロンに周囲を囲まれシナプス結合していることから、視床下部弓状核が LH 分泌調節中枢ではないかと考えている。乳牛における LH 分泌調節中枢の脳内の存在部位については、分娩後早期の乳牛に認められる LH 分泌調節抑制機構を解明する上で今後検討すべき課題であり、今後の研究が必要である。

以上の結果、分娩後早期の乳牛においては、血中グルコース濃度の低下にともなう LH 分泌抑制にはオピオイドが関与するものと推測された。

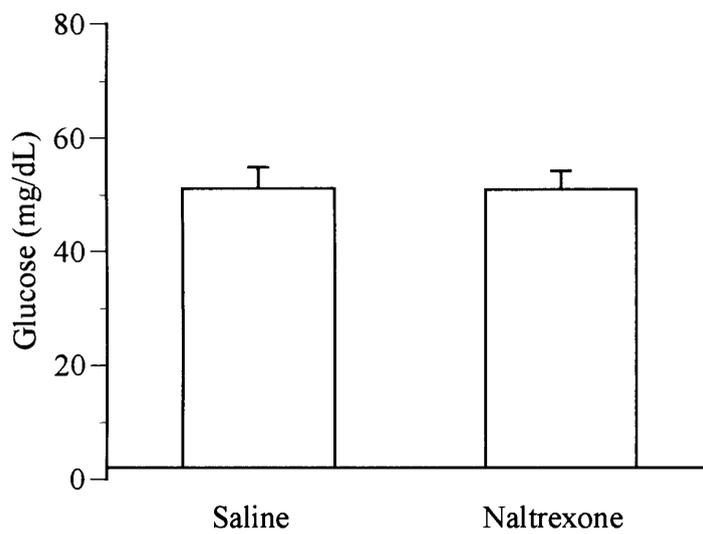


Fig. 3-14. Plasma glucose concentrations before the treatment with saline (Saline) or naltrexone (Naltrexon) at early postpartum phase in the Holstein dairy cows. Bars represent the mean \pm SEM.

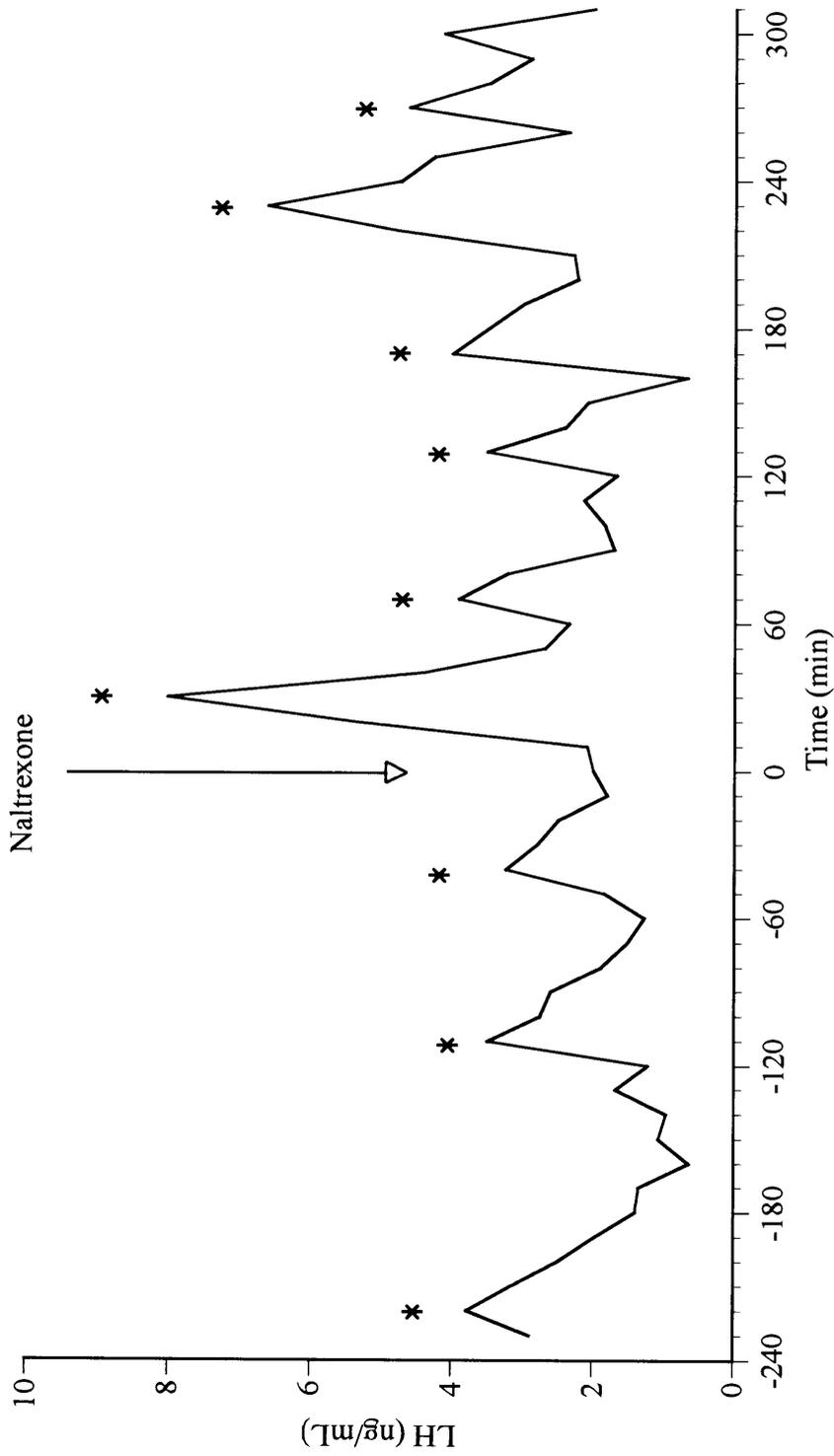


Fig. 3-15 Typical changes of plasma LH concentration before and after the treatment with naltrexone at early-postpartum phase in a Holstein dairy cow. Asterisks indicate the LH pulse. Increase of the LH pulse is noted after the naltrexone treatment.

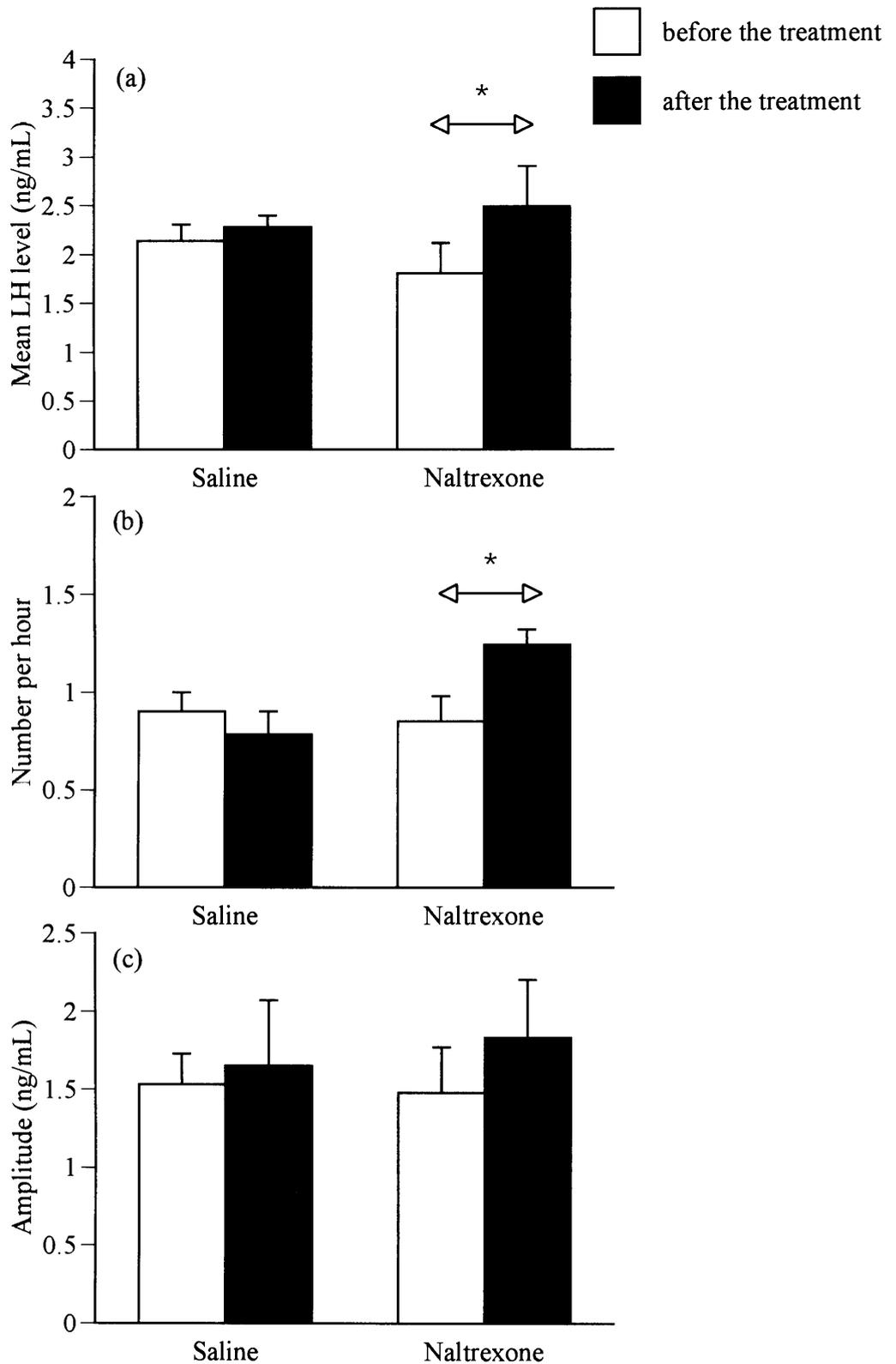


Fig. 3-16. The mean LH level (a), the number of LH peaks per hour (b), and the amplitude of the LH peaks (c) before (white column) and after (black column) the treatment with saline (Saline) or naltrexone (Naltrexone) at early postpartum phase in the Holstein dairy cows. Bars represent the mean \pm SEM. *: Significant difference ($P < 0.05$) between before and after the treatment.

小括

分娩後初回排卵に関連する血中マーカーの検討結果から、血中グルコースならびに FFA 濃度が LH 分泌調節中枢の末梢側信号物質と考えられた。しかしながら、グルコースあるいは FFA が LH 分泌にどのような影響を及ぼしているかは不明である。また分娩後早期の乳牛における LH 分泌反応についても末梢側信号物質ならびに LH 分泌調節中枢の観点からは検討されていない。そこで、まず分娩後早期の乳牛について、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 投与による分泌反応を、ついで糖源性物質と知られるプロピレングリコール投与による LH 分泌反応の変動、さらに FFA 投与による影響について検討した。一方、絶食ラットにおける LH 分泌の抑制ではオピオイド依存性やエストロゲン依存性の LH 分泌調節中枢の存在が示唆されていることから、乳牛にエストロゲンレセプターアンタゴニストならびにオピオイドレセプターアンタゴニストを投与し、LH 分泌反応について検討した。

1) GnRH 投与による LH 分泌反応

分娩後の乳牛における LH の分泌反応について、分娩後 10 日群(全例初回排卵前)、分娩後 30 日群(初回排卵前、ならびに初回排卵後)、分娩後 60 日群(全例初回排卵後)の 4 群にそれぞれ分娩後 10 日、30 日ならびに 60 日目に GnRH を投与し、投与後の最高 LH 濃度 (以下、pLH) ならびに、投与後 8 時間までの LH 放出反応曲線と X 軸に囲まれる面積 (以下、 Σ LH) を算出し検討した。10 日群における pLH と Σ LH は、他の 3 群に較べて有意 ($P < 0.05$) に低く、またエネルギー充足率ならびにグルコース濃度も、他群に較べて低かった。また GnRH 投与が初回排卵前であった分娩後 10 日群と初回排卵前の分娩後 30 日群の全例では GnRH 投与後数日以内に排卵した。したがって、卵巢は分娩後早期であっても LH 放出が起これば排卵が可能であることが明らかと

なった。すなわち分娩後早期の泌乳牛では、LH 分泌が抑制されており、またこの抑制は血中グルコース濃度に関連すると考えられた。

2) プロピレングルコール投与による血中 LH 濃度の変動

プロピレングルコールは糖源性物質として牛に投与される。そこで生理的な状態で血中グルコース濃度を増加させる方法としてプロピレングルコールを経口投与し、投与後の LH 分泌について検討した。すなわち分娩後 9 日目の初回排卵前の乳牛にプロピレングルコールを経口投与し、LH 分泌反応の指標である平均 LH 濃度、1 時間あたりの LH パルス数ならびにその振幅を投与前後で比較した。また血漿グルコース、FFA、インスリン濃度も測定した。プロピレングルコール群の投与後の平均 LH 濃度と LH パルス数は投与前に比較して有意($P < 0.05$)に高く、また投与後の血中グルコース濃度とインスリン濃度も増加したが、FFA の濃度に変化は認められなかった。したがって分娩後早期の乳牛では LH 分泌が抑制されており、その抑制の解除には血中グルコース濃度が関与すると考えられた。

3) FFA 投与による血中 LH 濃度の変動

分娩後早期の乳牛で増加している FFA 濃度も初回排卵日数に関連すると推測されたため、分娩後 13 日目の初回排卵前の乳牛に FFA を静脈内投与し、LH 分泌反応の変動について検討した。FFA 投与中の血中 FFA 濃度は有意な高値を示したが、平均 LH 濃度、1 時間あたりの LH パルス数ならびにその振幅のいずれについても差は認められなかった。また血中グルコースならびにインスリン濃度にも FFA 投与による影響は認められなかった。したがって分娩後早期の乳牛に認められる LH 分泌の抑制には、血中 FFA 濃度は関与していないことが明らかとなった。

4) エストロジェンレセプターアンタゴニスト投与による血中 LH 濃度の変動

絶食ラットに認められる LH 分泌抑制はエストロジェン依存性の LH 分泌

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

5) オピオイドレセプターアンタゴニスト投与による血中 LH 濃度の変動

絶食ラットに認められる LH 分泌抑制はオピオイド依存性の LH 分泌調節中枢を介することも示唆されている。そこで分娩後 10 日目の乳牛に持続型オピオイドレセプターアンタゴニストであるナルトレキソンを投与し、LH 分泌反応を検討した。投与前の平均 LH 濃度と LH パルス数に群間の差は認められなかったが、ナルトレキソン投与後、平均 LH 濃度と LH パルス数の有意な増加が認められた。したがって、分娩後早期の乳牛では血中グルコース濃度の低下にともなう LH 分泌抑制にはオピオイドが関与するものと推測された。

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

第4章

総括ならびに結論

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

1. 分娩後の初回排卵に関連する血中マーカー

グルコースをはじめとする血中マーカーが分娩直後の濃度域から健常域に回復するために要した分娩後日数と分娩から初回排卵までの日数（以下、初回排卵日数）との関連を検討した。すなわち、初回排卵後 2 週間における各血中成分の濃度の平均±2 標準偏差の範囲（健常域）内に、各個体の血中因子の濃度が達するに要した分娩後からの日数と初回排卵日数との相関関係について検討した。13 頭のホルスタイン種乳牛から分娩前 14 日から分娩後約 60 日まで週に 4 回採血し、血漿中のグルコース、遊離脂肪酸（FFA）、ケトン体、尿

素体窒素 (UN)、ならびにプロジェステロン濃度を測定した。初回排卵後 2 週間のグルコース、UN、フリーコレステロール、コレステロールエステルの濃度は分娩前 2 週間から分娩後初回排卵までの期間の濃度と比較して有意に高く、また初回排卵後 2 週間の FFA 濃度は初回排卵前のそれと比較して有意に低かった。しかしながらケトン体の濃度については、初回排卵前と初回排卵後との間に有意差は認められなかった。さらにこのうち、血中グルコースと FFA 濃度については健常域内に復帰するまでに要した日数と初回排卵日数との間に有意な正の相関が認められた。したがって、血中グルコースと FFA 濃度が分娩後の初回排卵に関連する因子、末梢側信号物質と考えられた。

2. 分娩後早期の乳牛における性腺刺激ホルモン分泌調節

1) 性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 投与による LH 分泌反応

分娩後の乳牛における LH の分泌反応について、GnRH 投与によって検討した。分娩後のホルスタイン種経産牛 24 頭を以下の 4 群に無作為に選択した。すなわち分娩後 10 日群(9 頭、全例初回排卵前)、分娩後 30 日群(初回排卵前 30 日群 4 頭、ならびに初回排卵後 30 日群 6 頭)、分娩後 60 日群(5 頭、全例初回排卵後)の 4 群にそれぞれ分娩後 10 日、30 日ならびに 60 日目に GnRH を投与し、15~30 分間隔で投与後 8 時間まで頸静脈より血液検体を採取した。採取した各検体について LH 濃度を測定し、投与後の最高 LH 濃度(以下、pLH)ならびに、投与後 8 時間までの LH 放出反応曲線と X 軸に囲まれる面積(以下、 Σ LH)を算出した。また投与前の血液検体について血漿グルコース濃度を測定し、GnRH 投与日におけるエネルギー充足率を日本飼養標準に基づき算出した。10 日群における pLH と Σ LH は、他の 3 群に較べて有意 ($P < 0.05$) に低く、またエネルギー充足率ならびにグルコース濃度も、他群に較べて低かった。また GnRH 投与が初回排卵前であった分娩後 10 日群と初回

排卵前の分娩後 30 日群の全例では GnRH 投与後数日以内に排卵した。したがって、卵巢は分娩後早期であっても LH 放出が起これば排卵が可能であることが明らかとなった。すなわち分娩後早期の泌乳牛では、LH 分泌が抑制されており、またこのような抑制は血中グルコース濃度に関連すると考えられた。

2) プロピレングルコール投与による血中 LH 濃度の変動

プロピレングルコールは糖源性物質として牛に投与される。そこで生理的な状態で血中グルコース濃度を増加させる方法としてプロピレングルコールを経口投与し、投与後の LH 分泌について検討した。すなわち分娩後 9 日目の初回排卵前の乳牛 7 頭から、10 分間隔で 4 時間血液検体を頸静脈より採取した後、プロピレングリコール(プロピレングリコール群、n=7)を経口投与し、投与後さらに 10 分間隔で 4 時間血液検体を採取した。なお対照 (対照群、n=7)として水を経口投与した。採取した全検体について血漿 LH 濃度を測定し、LH 分泌反応の指標である平均 LH 濃度、1 時間あたりの LH パルス数ならびにその振幅を投与前後で比較した。また血漿グルコース、FFA、インスリン濃度も測定した。投与前の LH 分泌反応の指標いずれにも群間の差は認められなかった。プロピレングリコール群の投与後の平均 LH 濃度と 1 時間あたりの LH パルス数は投与前に比較して有意($P < 0.05$)に増加したが、対照群では投与前後の変動は認められなかった。またプロピレングリコール群では投与後、血中のグルコース濃度とインスリン濃度は有意に増加したが、FFA の濃度に変化は認められなかった。したがって分娩後早期の乳牛では LH 分泌が抑制されており、その抑制の解除には血中グルコース濃度が関与すると考えられた。

3) FFA 投与による血中 LH 濃度の変動

分娩後早期の乳牛で増加している FFA 濃度も初回排卵日数に関連すると

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

4) エストロジェンレセプターアンタゴニスト投与による血中 LH 濃度の変動

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

5) オピオイドレセプターアンタゴニスト投与による血中 LH 濃度の変動

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

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

謝辭

本論文を作成するにあたりまず最初に、乳牛における繁殖研究の重要性を教授し、様々な実験手法を伝授していただいた現・九州沖縄農業研究センターの仮屋堯由畜産飼料作研究部長に感謝します。また様々な御協力をいただいた北海道農業研究センター畜産草地部などに在籍していた諸氏や現在も在籍している諸氏、とくに長年にわたり供試牛の管理をしていただいた業務三科の諸氏と、実験補助をしていただいた城良江氏に深く感謝します。またパルス解析方法を教授していただき、オーストラリア留学滞在中に公私にわたって面倒を見ていただき、論文作成に際しても重要なアドバイスをしていただいた西オーストラリア大学の G. B. マーチン教授とオーストラリア連邦科学技術研究機構の N. アダムス博士に感謝します。また抗プロジェステロン血清を寄贈していただいた東北農業研究センターの竹ノ内直樹氏、抗牛 LH 血清を寄贈していただいた NIDDK ナショナルホルモン&下垂体プログラムと A. F. パーロー博士に感謝します。最後に本論文執筆にあたり重要な指導をいただいた東京大学大学院獣医臨床病理学講座の小野憲一郎教授に深く感謝します。

引用文献

Ahmadzadeh, A., Barnes, M. A., and Pearson, R. E. (1998). Effect of naloxone on serum luteinizing hormone concentration in anovulatory holstein cows during the early postpartum period. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 15: 177-181.

Barb, C. R., Kraeling, R. R., Rampacek, G. B., and Whisnant, C. S. (1986). Opioid inhibition of luteinizing hormone secretion in the post-partum lactating sow. *Biol. Reprod.*, 35: 368-376.

Barr, G. W., Wangsness, P. J., Irish, W. W., Lean, I. J., Morrill, J. L., and Albright J. L. (1988). Guide for dairy cattle. pp. 1-48. In: Guide for the care and use of agricultural animals in agricultural research and teaching. 畜産技術協会 東京

Bell, A.W. (1995). Regulation of organic nutrient during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.*, 73: 2804-2819.

Beam, S. W., and Butler, W. R. (1998). Energy balance, metabolic hormones, and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. *J. Dairy Sci.*, 81: 121-131.

Beam, S. W., and Butler, W. R. (1999). Effect of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fertil. Supple.*, 54: 411-424.

Blache, D., Chagas, L. M., Blackberry, M. A., Vercoe, P. E., and Martin, G. B. (2000). Metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 120: 1-11.

Bucholtz, D. C., Chiesa, A., Pappano, W. N., Nagatani, S., Tsukamura, H., Maeda, K-I., and Foster, D. L. (2000). Regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion by insulin in the diabetic male lamb. *Biol. Reprod.*, 62: 1248-1255.

Butler, W. R. (2000). Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61:449-457.

Cagampang, F. R. A., Maeda, K-I., Tsukamura, H., Ohkura, S., and Ota, K. (1991). Involvement of ovarian steroids and endogenous opioids in the fasting-induced suppression of pulsatile LH release in ovariectomized rats. *J. Endocrinol.*, 129: 321-328.

Cagampang, F. R. A., Cates, P. S., Sandhu, S., Strutton, P. H., McGarvey, C., Coen, C. W., and O-Byrne, K.T. (1997). Hypoglycemia-induced inhibition of pulsatile luteinizing hormone secretion in female rats: role of oestradiol, endogenous opioids and the adrenal medulla. *J. Neuroendocrinol.*, 9: 867-872.

Canfield, R. W., and Butler, W. R. (1990). Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 7:

323-330.

Canfield, R. W., and Butler, W. R. (1991). Energy balance, first ovulation and the effects of naloxone on LH secretion in early postpartum dairy cows. *J. Anim. Sci.*, 69: 740-746.

Canteros, G., Rettori, V., Franchi, A., Genardo, A., Cebal, E., Faletti, A., Gimeno, M., and McCann, S. M. (1995). Ethanol inhibits luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) secretion by blocking the response of LHRH neuronal terminals to nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92: 3416-3420.

Cicero, T. J., Newman, K. S., Gerrity, M., Schmoeker, P. F., and Bell, R. D. (1982). Ethanol inhibits the naloxone-induced release of luteinizing hormone-releasing hormone from the hypothalamus of the male rat. *Life. Sci.*, 31:1587-1596.

Clarke, I. J., Horton, R. J. E., and Doughton, B. W. (1990). Investigation of the mechanism by which insulin-induced hypoglycemia decreases luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinol.*, 127: 1470-1476.

Cross, J., Rutter, L. M., and Manns, J.G. (1987). Effects of progesterone and weaning on LH and FSH response to naloxone in postpartum beef cows. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 4: 111-122.

Crowe, M. A., Padmanabhan, V., Mihm, M., Beitins, I. Z., and Roche, J. F. (1998). Resumption of follicular waves in beef cows is not associated with periparturient changes in follicle-stimulating hormone heterogeneity despite major changes in steroid and luteinizing hormone concentrations. *Biol. Reprod.*, 58:1445-1450.

Darwash, A. O., Lamming, G.E., and Royal, M. D. (2001). A protocol for initiating oestrus and ovulation early post partum in dairy cows. *Anim. Sci.*, 72: 539-546.

Dekkers, J. C. M., Ten-Hag, J.H., and Weersink, A. (1998). Economic aspects of persistency of lactation in dairy cattle. *Livestock Prod. Sci.*, 53: 237-252.

Dyer, R. G., Mansfield, S., Corbet, H., and Dean, A. D.P. (1985). Fasting impairs LH secretion in female rats by activating an inhibitory opioid pathway. *J. Endocrinol.*, 105: 91-97.

Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T., and Webster, G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 72: 68-78.

Ellingboe, J., Shaw, D. G., Skupny, A. S., and Sikorski, M. A. (1987). Does ethanol inhibit LH secretion in the rat? *Alcohol*, Suppl 1: 539-543.

Estienne, M. J., Schillo, K. K., Green, M. A., and Boling, J. A. (1989). Free fatty acids suppress growth hormone, but not luteinizing hormone, secretion in sheep. *Endocrinol.*, 125: 85-91.

Estienne, M. J., Schillo, K. K., Hileman, S. M., Green, M. A., Hayes, S. H., and Boling, J. A. (1990). Effects of free fatty acids on luteinizing hormone and growth hormone secretion in ovariectomized lambs. *Endocrinol.*, 126: 1934-1940.

Filley, S.J., Turner, H.A., and Stormshak, F. (1999). Prostaglandin F2a concentrations, fatty acid profiles, and fertility in lipid-infused postpartum beef heifers. *Biol. Reprod.*, 61: 1317-1323.

Formigoni, A., Cornil, M-C., Prandi, A., Mordenti, A., Rossi, A., Portetelle, D., and Renaville, R. (1996). Effect of propylene glycol supplementation around parturition on milk yield, reproduction performance and some hormonal and metabolic characteristics in dairy cows. *J. Dairy Res.*, 63: 11-24.

Foster, J. P., Lamming, G.E., and Peters, A. R. (1980). Short-term relationships between plasma LH, FSH and progesterone concentrations in post-partum dairy cows and the effect of Gn-RH injection. *J. Reprod. Fertil.*, 59: 321-327.

Funston, R. N., Roberts, A. J., Hixon, D. L., Hallford, D. M., Sanson, D. W.,

and Moss, G. E. (1995). Effect of acute glucose antagonism on hypophyseal hormones and concentrations of Insulin-like Growth Factor (IGF)-1 and IGF-binding proteins in serum, anterior pituitary, and hypothalamus of ewes. *Biol. Reprod.*, 52: 1179-1186.

Gauter, D., and Mauleon, P. (1983). Influence of dietary intake and weight variation on LH release after a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) injection during the post-partum period of the nursing cow. *Reprod. Nutr. Dev.*, 23: 829-835.

Genazzani, A.D., Volpogni, C., Petraglia, F., Gamba, O., Gastaldi, M., and Genazzani, A. R. (1995). Naltrexone treatment restores menstrual cycles in patients with weight loss-related amenorrhea. *Fertil. Steril.*, 64: 951-956.

Gregg, D.W., Moss, G. E., Hudgens, R. E., and Malven, P. V. (1986). Endogenous opioid modulation of luteinizing hormone and prolactin secretion in postpartum ewes and cows. *J. Anim. Sci.*, 63: 838-847.

Grimard, B., Humblot, P., Ponter, A. A., Mialot, J. P., Sauvant, D., and Thibier, M. (1995). Influence of postpartum energy restriction on energy status, plasma LH and oestradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. *J. Reprod. Fertil.*, 104: 173-179.

Grummer, R. R., Winkler, J. C., Bertics, S. J., and Studer, V. A. (1994).

Effect of propylene glycol dosage during feed restriction on metabolites in blood of prepartum Holstein heifers. *J. Dairy Sci.*, 77: 3618-3623.

Jacobs, A. L., Edgerton, L. A., Silvia, W. J., and Schillo, K. K. (1988). Effect of an estrogen antagonist (Tamoxifen) on cloprostenol-induced luteolysis in heifers. *J. Anim. Sci.*, 66: 735-742.

Kamimura, S., Ohgi, T., Takahashi, M., and Tsukamoto, T. (1993). Postpartum resumption of ovarian activity and uterine involution monitored by ultrasonography in Holstein cows. *J. Vet. Med. Sci.*, 55: 643-647.

Kestler, D.J., Garverick, H.A., Youngquist, R.S., Elmore, R.G., and Bierschwal, C. J. (1977). Effect of days postpartum and endogenous reproductive hormones on GnRH-induced LH release in dairy cows. *J. Anim. Sci.*, 46: 797-803.

Kestler, D. J., Garverick, H. A., Bierschwal, C. J., Elmore, R. G., and Youngquist, R. S. (1979). Reproductive hormones associated with normal and abnormal changes in ovarian follicles in postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 62: 1290-1296.

Kestler, D. J., and Garverick, H. A. (1982). Ovarian cysts in dairy cattle: A Review. *J. Anim. Sci.*, 55: 1147-1159.

Lehman, M. N., and Karsch, F. J. (1993). Do gonadotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase-, and beta-endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen receptors? A double-label immunocytochemical study in the suffolk ewe. *Endocrinol.*, 133: 887-895.

Leshin, L. S., Rund, L. A., Kraeling, R. R., and Kiser, T. E. (1991). The bovine preoptic area and median eminence: sites of opioid inhibition of luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *J. Anim. Sci.*, 69: 3733-3746.

Martin, R.J., Wilson, L.L., Cowan, R.L., and Sink, J. D. (1973). Effects of fasting and diet on enzyme profiles in ovine liver and adipose tissue. *J. Dairy Sci.*, 36: 101-107.

McCann, J. P., and Hansel, W. (1986). Relationships between insulin and glucose metabolism and pituitary-ovarian functions in fasted heifers. *Biol. Reprod.*, 34: 630-641.

McDougall, S., Williamson, N. B., and Macmillan, K. L. (1995). GnRH induces ovulation of a dominant follicle in primiparous dairy cows undergoing anovulatory follicle turnover. *Anim. Reprod. Sci.*, 39: 205-214.

Meikle, A. W., Benson, S. J., Liu, X. H., Boam, W. D., and Stringham, J. D.(1989). Nonesterified fatty acids modulate steroidogenesis in mouse

Leydig cells. *Am. J. Physiol.*, 257: E937-E942.

Meijs-Roelofs, H. M. A., and Kramer, P. (1989). Advancement of first ovulation by the opioid antagonist naltrexone. *Biol. Reprod.*, 41: 842-847.

Merriam, G. R., and Watcher, K. W. (1982). Algorithms for the study of episodic hormone secretion. *Ame. J. Physiol.*, 243: E310-E318.

Miettinen, P. V. A. (1991). Correlation between energy balance and fertility in Finnish dairy cows. *Acta Vet. Scand.*, 32: 189-196.

Nagatani, S., Tsukamura, H., and Maeda, K-I. (1994). Estrogen feedback needed at the paraventricular nucleus or A2 to suppress pulsatile luteinizing hormone release in fasting female rats. *Endocrinol.*, 135: 870-875.

Nagatani, S., Bucholtz, D. C., Murahashi, K., Estacio, M. A. C., Tsukamura, H., Foster, D. L., and Maeda, K-I. (1996). Reduction of glucose availability suppresses pulsatile luteinizing hormone release in female and male rats. *Endocrinol.*, 137: 1166-1170.

Nett, T. M., Cermak, D., Braden, T., Manns, J., Niswender, G. (1988). Pituitary receptors for GnRH and estradiol, and pituitary content of gonadotropins in beef cows. II. Changes during the postpartum period.

Dom. Anim. Endocrinol., 5: 81-9.

農林水産省農林水産技術会議 日本飼養標準・乳牛. (1994). pp.19-25.中央畜産会, 東京.

農林水産省農林水産技術会議 日本飼養標準・乳牛. (1999). pp. 23-56. 中央畜産会, 東京.

Nyberg, C. L., Hiney, J. K., Minks, J. B., and Les, D. W. (1993). Ethanol alters N methyl-DL-aspartic acid-induced secretion of Luteinizing Hormone Releasing Hormone and the onset of puberty in the female rat. *Neuroendocrinol.*, 57: 863-868.

Peters, A. R., Lamming, G. E., and Fisher, M. W. (1981). A comparison of plasma LH concentrations in milked and suckling post-partum cows. *J. Reprod. Fertil.*, 62: 567-573.

Roche, J. F., Mackey, D., and Diskin, M. D. (2000). Reproductive management of postpartum cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 61: 703-712.

Rund, L. A., Leshin, L. S., Thompson, F. N., Rampacek, G. B., and Kiser, T. E. (1989). Influence of the ovary and suckling on luteinizing hormone response to naloxone in postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.*, 67: 1527-1531.

Sannella, M., and Petersen, S. L. (1997). Dual label in situ hybridization studies provide evidence that luteinizing hormone-releasing hormone neurons do not synthesize messenger ribonucleic acid for m, k, or d opiate receptors. *Endocrinology*, 138: 1667-1672.

Sasaki, Y., Kumazaki, K., and Ikeda, O. (1974). Relationship between plasma glucocorticoids and the maintenance of blood glucose level in the fasted animals. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 45: 81-87.

Sato, H. (1978). Plasma glucose, lipids and mineral levels from 3 weeks before to 10 weeks after parturition in dairy cows. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 49: 333-338.

Sato, H., Hanasaka, S., and Imamura, T. (1981). Changes in plasma glucose, lactate, lipids and urea levels during lactation period in dairy cows. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 52: 653-658.

Savio, J. D., Boland, M. P., Hynes, N., and Roche, J. F. (1990). Resumption of follicular activity in the early post-partum period of dairy cows. *J. Reprod. Fertil.*, 88: 569-579.

Schallenberger, E., Schams, D., Bullermann, B., and Walters, D. L. (1984). Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during prostaglandin-induced regression of the corpus luteum in the cow. *J. Reprod. Fertil.*, 71: 493-501.

Studer, V. A., Grummer, R. R., Bertics, S. J., and Reynolds, C. K. (1993). Effects of prepartum propylene glycol administration on periparturient fatty liver in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 76: 2931-2939.

竹ノ内直樹, 居在家義昭, 大島一修, 島田和宏, 高橋正義 (1993). 牛血漿中プロジェステロンの酵素免疫測定法 中国農業試験場研究報告, 12: 125-132.

Tanaka, T., Nagatani, S., Bucholtz, D. C., Ohkura, S., Tsukamura, H., Maeda, K-I., and Foster, D. L. (2000). Central action of insulin regulates pulsatile luteinizing hormone secretion in the diabetic sheep model. *Biol. Reprod.*, 62:1256-1261.

Temple, J. L., and Rissman, E. F. (2000). Acute re-feeding reverses food restriction-induced hypothalamic-pituitary-gonadal axis deficits. *Biol. Reprod.*, 63: 1721-1726.

Teoh, S. K., Mendelson, J. H. M., Mello, N. K., and Skupny, A. (1988). Alcohol effects on Naltrexone-induced stimulation of pituitary adrenal and gonadal hormones during the early follicular phase of the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 66: 1181-1186.

Thatcher, W. W., and Wilcox, C. J. (1973). Postpartum estrus as an indicator of reproductive status in the dairy cow. *J. Dairy Sci.*, 56: 608.

Tsukamura, H., and Maeda, K-I. (1992). Neuroendocrine mechanism for environmental regulation of the reproductive function. *Anim. Sci. Technolo.*, 63: 440-449.

Walters, D. L., and Schallenberger E. (1984). Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the periovulatory phase of the oestrous cycle in the cow. *J. Reprod. Fertil.*, 71: 503-512.

Walters, D. L. , Schams, D., and Schallenberger, E. (1984). Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the luteal phase of the oestrous cycle in the cow. *J. Reprod. Fertil.*, 71: 479-491.

Whisnant, C. S., Kiser, T. E., Thompson, F.N., and Barb, C. R. (1986). Influence of calf removal on serum luteinizing hormone response to naloxone in the postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.*, 63: 561-564.

Yatabe, K. (1990). Body condition scoring and feeding in dairy cattle. *J. Clinic. Vet. Med.*, 41-45.

Zurek, E., Foxcroft, G. R., and Kennelly, J. J. (1995). Metabolic status and interval to first ovulation in postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 78: 1909-1920.