

ウシ発情周期中に発育する
第1卵胞波主席卵胞の生理学的性質
—発育動態、機能および受胎性に及ぼす影響—

2014年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科
(帯広畜産大学)

三浦 亮太郎

目次

第1章 緒言	1
第2章 第1 卵胞波主席卵胞 (W1DF) の発育動態, 排卵前後の機能および排卵後に 形成される黄体の性質	9
2-1. 序論	10
2-2. 試験1: 卵胞波発現から7日目までの W1DF と W2DF の発育動態および 卵胞壁血流の比較	10
2-3. 試験2: 発情および排卵誘起時における W1DF と W2DF の発育動態, 卵胞壁血流および血中 E ₂ 濃度の比較	14
2-4. 試験3: W1DF と W2DF における排卵前の卵胞内ステロイドホルモン濃度 および顆粒層細胞で発現している因子の比較	16
2-5. 試験4: W1DF と W2DF の排卵後に形成される黄体の形態, 黄体血流 および血中 P ₄ 濃度推移の比較	21
2-6. 結果	23
2-7. 考察	26
2-8. 小括	32
図・表	33

第3章 第1 卵胞波主席卵胞 (W1DF) の発育を制御する要因	57
3-1. 序論	58
3-2. 試験1：卵胞波発現から7日目のW1DFの直径と血中P ₄ 濃度の相関関係 およびW1DFと黄体の共存または非共存関係がW1DFの直径に及ぼす 影響	58
3-3. 試験2：W1DFと黄体の共存または非共存関係が卵胞波発現日から5日目 までのW1DFと黄体の発育動態、血中P ₄ 濃度、および卵胞液ステロイドホ ルモン濃度に及ぼす影響	60
3-4. 結果	63
3-5. 考察	64
3-6. 小括	66
図・表	68
第4章 黄体と同一卵巣内に存在する第1 卵胞波主席卵胞 (W1DF) の性質および 受胎性に及ぼす影響	77
4-1. 序論	78
4-2. 試験1：泌乳牛におけるW1DFと黄体の共存および非共存関係がW1DFと 黄体の発育動態および血中P ₄ 濃度推移に及ぼす影響	78

4-3. 試験 2 : WIDF と黄体の共存および非共存関係が人工授精後の受胎率に 及ぼす影響	80
4-4. 結果	82
4-5. 考察	84
4-6. 小括	87
図・表	88
第 5 章 総合考察	92
謝辞	100
参考文献	101

略語

P₄ : Progesterone (プロジェステロン)

E₂ : Estradiol-17β (エストラジオール)

A₄ : Androstendion (アンドロステンジオン)

GnRH : Gonadotropin releasing hormone (性腺刺激ホルモン放出ホルモン)

FSH : Follicle stimulating hormone (卵胞刺激ホルモン)

LH : Luteinizing hormone (黄体形成ホルモン)

W1DF : The first follicular wave dominant follicle (第1卵胞波主席卵胞)

W2DF : The second follicular wave dominant follicle (第2卵胞波主席卵胞)

PG : Prostaglandin (プロスタグランジン)

BFA : Blood flow area (卵胞壁血流面積)

BF% : The percentage of follicle circumference with blood flow signals (血流分布割合)

EIA : Enzyme immuno assay (酵素免疫測定法)

BSA : Bovine serum albumin (牛血清アルブミン)

cDNA : complementary DNA (相補的DNA)

PCR : Polymerase chain reaction

LHr : LH receptor (LH受容体)

CYP19A1 : Aromatase (アロマターゼ)

COX-2 : Cyclooxygenase-2

NO : Nitric oxide (一酸化窒素)

iNOS : Inducible nitric oxide synthase (誘導型一酸化窒素合成酵素)

eNOS : Endothelial nitric oxide synthase (血管内皮型一酸化窒素合成酵素)

VEGF : Vascular endothelial growth factor (血管内皮増殖因子)

FGF : Fibroblast growth factor (線維芽細胞増殖因子)

StAR : Steroidogenic acute regulatory protein

P450-scc : Cytochrome P450 side chain cleavage enzyme (チトクローム P450 側鎖切断酵素)

3 β -HSD : 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -水酸基脱水素酵素)

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素)

W1CL : Corpus luteum formed after ovulation of W1DF (W1DF 排卵後黄体)

W2CL : Corpus luteum formed after ovulation of W2DF (W2DF 排卵後黄体)

TMR : Total mixed ration

BCS : Body condition score (ボディ・コンディション・スコア)

第1章

緒言

ウシの家畜化は約 9,000 年前から開始したと考えられており、地球上のいたるところに生息していた原牛（オーロックス、*Bos primigenius*）を基にして、西アジア地域を中心に家畜化が進行したとされる。初期において、ウシは肉の利用や宗教的儀式に用いることを目的に家畜化され、その後は農耕においても必要不可欠な家畜となっていった。しかしながら、古代遺跡から発見される野生動物の骨がウシの家畜化を境にして減少することから、家畜ウシの主要な目的が食料を確保するためであったと考えられている。FAO の 2007 年の統計によれば、世界で飼育されているウシの頭数は 13 億 6,000 万頭であり、その分布はアジア地域に 31%、中央および南アメリカ地域に 29%、アフリカに 19%、ヨーロッパに 10%、北アメリカに 8%、オセアニアに 3%となっている。国単位ではブラジルに 2 億頭、インドに 1 億 8,000 万頭、アメリカ合衆国に 9,700 万頭、中国に 8,200 万頭、アルゼンチンが 5,100 万頭と続き、日本には 440 万頭が存在する。このように世界中で多く飼養されているウシから、肉、生乳さらに加工乳製品などが生産され、ウシは現代において最も重要な家畜の一つであるとされている。

日本における家畜としてのウシの多くは、肉生産を行う肉用牛、あるいは生乳や乳製品を製造するための乳を生産する乳用牛として飼養されている。肉用牛の生産のため、また乳用牛が泌乳し乳生産をおこなうためには、雌牛が受胎し分娩する必要があり、畜産業が経済的に成立するためには、雌牛が効率的に順調なサイクルで受胎し分娩していく必要がある。

近年、日本を含む先進諸国では畜産農家、特に酪農家 1 戸当たりの飼養頭数が増加している。日本を例にあげると、1 戸当たりの乳牛飼養頭数は 1960 年には 2.0 頭であったのに対して、1980 年には 18.1 頭、1990 年には 32.5 頭、2000 年には 52.5 頭そして 2012 年には 72.1 頭となり、この 50 年で急激な飼養規模拡大がみられる（畜産統計調査、農林水産省）。また、ウシの遺伝改良や飼養管理技術の向上により、乳用牛の個体乳量は全世界的に増加傾向にある。アメリカ合衆国では 1951 年から 1996 年にかけて 5,000 kg か

ら 9,000 kg 以上へと年間平均個体乳量が増加している (18)。日本における乳用牛の年間平均個体乳量は、1975 年には 5,826 kg であったのに対して、1980 年には 6,339 kg、1990 年には 7,798 kg、2000 年には 8,794 kg そして 2010 年には 9,286 kg となり著しく増加している (乳用牛群能力検定成績のまとめ—平成 24 年度—, 家畜改良事業団)。また、肉用牛においても 1 戸当たりの飼養頭数は 1960 年では 1.2 頭であったのに対して、1980 年には 5.9 頭、1990 年には 11.6 頭、2000 年には 24.2 頭そして 2012 年には 41.8 頭となり、乳用牛と同様に飼養規模拡大が見受けられる (畜産統計調査, 農林水産省)。

現代において、多くの雌牛は人工授精により受胎、分娩していることが知られており、人工授精の普及率に関しては、アメリカ合衆国では乳用牛の 72% (92)、日本では乳用牛、肉用牛ともに 95%以上 (44) となっている。このため、効率的かつ適切な雌牛の発情発見が繁殖成績向上の重要な要因となっている。しかしながら、急激な飼養規模の拡大に伴う、発情発見率の低下が空胎期間の延長につながり、繁殖成績の低下をもたらしている。また、乳用牛に関しては高泌乳化に伴い、肝臓でのステロイド代謝亢進 (100) が指摘されており、それに伴う発情微弱化および発情発現時間の短縮 (55) に起因する発情発見率などの低下や、適期授精が実施できないことによる受胎性の低下が大きな問題となっている。

そのため、アメリカ合衆国を中心とした先進国では、繁殖成績向上を目的に各種ホルモン製剤を用いて、オブシンク法 (72) など発情発見を必要としない定時人工授精プログラムの開発と改良を行ってきた (32, 50, 60, 77, 90)。しかしながら、これらのプログラムを用いることで、授精率を向上させることには成功したが、受胎率の向上に関しては現在に至るまでに十分に達成できていない。このことは、ウシの繁殖生理に対する理解や、妊娠成立に関わる要因の解明さらには受胎率の向上をもたらす内分泌状態を作出する授精プログラムの開発が確立していないことを示唆している。そのため、ウシの繁殖生理に対して今まで注目されていなかった点についての基礎的な調査や研究を行っ

ていく必要がある。

雌が交配のために雄を許容する状態が発情と定義され、この発情は周期的に繰り返されており、この周期を発情周期という。ウシは周年繁殖の多発情動物であり、6~12 ヶ月齢で性成熟に達した後(30)、妊娠しない限り1年を通して周期的に発情を繰り返すようになる。発情周期中には卵巣内構造物である黄体と卵胞の発育と閉鎖・退行の周期的変化がみられる。ウシの発情周期の平均日数は21日である(30)が、発情周期の日数には18~24日と幅のあることが知られている(30)。発情周期は大きく黄体期(14~18日間)と卵胞期(4~6日間)の2つに分類される(30)。黄体期は発情後に卵巣内で成熟卵胞が排卵した直後から始まり、黄体が成熟した後、黄体退行が開始するまでの期間であり、黄体退行が開始してから排卵に至るまでの期間を卵胞期という(30)。卵胞期の成熟卵胞からエストラジオール(E_2)が産生および分泌される(30)ことで血中 E_2 濃度が上昇し、正のフィードバック作用により視床下部で性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)のサージ状分泌が誘起され、それが脳下垂体前葉に作用することで、黄体形成ホルモン(LH)のサージ状の放出が起こり(80)、成熟卵胞の排卵を誘導する(94)。成熟卵胞を構成している顆粒層細胞と内卵胞膜細胞がLHサージにより刺激され、それぞれ大型黄体細胞と小型黄体細胞に変化し、それらが増殖することで急速に黄体が形成されていく(8)。黄体は、発情周期の7日目ごろまで発育、成長していき、その後は黄体退行開始まで機能的黄体として存在する。妊娠が成立しない場合、子宮からプロスタグランジン(PG) $F_{2\alpha}$ が放出される(54)ことで黄体退行が開始され、黄体は急激に縮小する(11, 51, 67)。黄体からは、プロジェステロン(P_4)が産生、分泌されており(68)、黄体の発育に伴い血中 P_4 濃度は上昇していき、黄体形成が完了すると黄体退行開始まで血中 P_4 濃度は高く維持され、黄体退行開始に伴い急激に血中 P_4 濃度は低下していく(57)。

このような黄体の発育、維持および退行、卵胞の成熟と排卵が繰り返され、発情周期が営まれる。この発情周期期間中には卵巣内では2~3回の卵胞群の発育が観察され、そ

それぞれの卵胞群から排卵に至らない卵胞が1~2つ発育することが知られており、この卵胞発育の一群を卵胞波という(41)。

ウシにおいて発情周期中に発現する最初の卵胞波は、発情終了後の卵巣内で3~4mm程の小卵胞の一群(8~41個)の発育が開始され、これを第1卵胞波という(41)。その一群の卵胞の中で最大の卵胞が1つだけ選抜され、それ以外の小卵胞は閉鎖する。この選抜された卵胞を主席卵胞といい、第1卵胞波の主席卵胞を第1卵胞波主席卵胞(W1DF)という。W1DFは発情周期の8~11日頃まで発育するが、黄体からP₄が産生分泌されている時期に当たるため、成熟することができず、このW1DFは排卵に至らず閉鎖してしまう(41)。それに伴い新たな卵胞波の発現が開始され、これを第2卵胞波という。ウシには卵胞波を2つ持つものと、3つ持つものが存在し、それぞれの発生率は試験に用いるウシの品種および年齢により異なることが報告されている(7, 16, 17, 19, 28, 39, 69, 74, 88, 108)。卵胞波を3つ持つウシの比率は低栄養状態(66, 76)やヒートストレス条件下(10)で増加するという報告がある。W1DFの生存期間が卵胞波の数に影響を与える可能性を推測している報告(48)もあるが、詳細は明らかにされていない。卵胞波を2つ持つウシでは、第2卵胞波の発現日は発情周期の9~11日頃であり、卵胞波を3つ持つウシでは8~9日頃であるとされている(4)。卵胞波を3つ持つウシでは、第3卵胞波の発現日が15~16日頃である(4)。また、卵胞波を2つ持つウシと3つ持つウシで黄体退行開始時期と発情周期日数を比較したところ、黄体退行開始時期は卵胞波を2つ持つウシで早期に開始され(2卵胞波 vs. 3卵胞波=16日目 vs. 19日目)、その結果、発情周期日数が短縮する(2卵胞波 vs. 3卵胞波=19~20日目 vs. 22~23日目)(4)。卵胞波を2つあるいは3つ持つウシのどちらの場合においても、第1卵胞波の発現時期は排卵直後であり、選抜された主席卵胞は排卵せず、閉鎖するという点で共通しているため、第1卵胞波を用いた卵胞発育に関する研究は多い。しかし、この第1卵胞波がウシの繁殖生理において果たす役割や意義に関する研究は少ない。

雌の生殖内分泌系は視床下部—下垂体—卵巣軸を中心に構成されており、視床下部では GnRH の分泌が行われ、下垂体前葉では卵胞刺激ホルモン (FSH) と LH が分泌される (80)。視床下部の正中隆起部から放出された GnRH は下垂体門脈に入り (65)、下垂体前葉に作用し、FSH および LH の合成と分泌が促進される。FSH は卵胞の発育や卵胞数の調節に関与するホルモンであり、卵胞波発現に関わる (6)。LH のパルス状分泌は GnRH の拍動性分泌と連動しており (107)、LH は主席卵胞の選抜と主席卵胞の発育、さらに成熟に関わるホルモンである (36)。視床下部の活動は、卵巣から分泌される性ステロイドホルモン (E_2 および P_4) によりフィードバック調節されている。過去の報告において、血中 P_4 濃度が低い時に LH のパルス頻度が増加すること、一方で血中 P_4 濃度が高い時に LH のパルス頻度が減少することが知られている (15, 52)。LH のパルス状分泌は主席卵胞の発育に必要であるため、血中 P_4 濃度が高濃度になる黄体期では、主席卵胞の発育は抑制され排卵に至ることはなく閉鎖していく。しかしながら、黄体が退行し血中 P_4 濃度が低い状況では、LH パルス頻度が上昇することで、卵胞の発育が促され、成熟卵胞で産生された E_2 が分泌され、血中 E_2 濃度が上昇する。血中 E_2 濃度の上昇に視床下部が反応し GnRH サージが引き起こされ、それに呼応して下垂体前葉では LH サージが誘起され、成熟卵胞は排卵する (81)。

胎生期および春機発動前のウシの卵巣において一次卵母細胞の周囲に卵胞上皮細胞で被われた原始卵胞が形成される。その後、春機発動に伴い、原始卵胞は発育を開始し、この発育を開始した卵胞は一次卵胞とよばれる。一次卵母細胞を取り囲んでいる卵胞上皮細胞は体積が増し立方状となる (63)。さらに立方化した上皮細胞が増殖、重層化することで顆粒層細胞となり、さらにその外側を内卵胞膜細胞が取り囲んだ状態となり二次卵胞となる (49)。この段階までは、卵胞は性腺刺激ホルモン (FSH および LH) に依存することなく発育が進行する。大型卵胞の機能の消失、つまり発情後の排卵や第 1 あるいは第 2 卵胞波主席卵胞 (W2DF) の閉鎖が起こると、主席卵胞の顆粒層細胞で産生さ

れるインヒビンの血中濃度が低下する。インヒビンは下垂体前葉に作用し FSH の放出を抑制するため、排卵後や主席卵胞閉鎖開始とともに FSH のサーージ状分泌が起こる (62)。それを受けて二次卵胞の中から数にして 8~41 個、直径 3~4mm 程の卵胞の発育が開始され、卵胞波の発現となる (17, 34)。卵胞波として動員された卵胞は性腺刺激ホルモン依存的に発育を続ける。この一群の卵胞は 1 日当たり 1.5~2.0 mm の速度で発育していく (37)。卵胞波の発現から 2~3 日経過すると、一群の中で最大卵胞の顆粒層細胞にて LH 受容体が発現し、E₂ 産生が行われるようになる (13)。E₂ は下垂体前葉に作用し FSH の放出を抑制する (38)、その結果、卵胞波の卵胞群の中で主席卵胞として選抜されなかった次席以下の FSH 依存性の卵胞は発育が維持できず閉鎖していく。しかしながら、最大卵胞は顆粒層細胞に LH 受容体を発現することで、その発育を FSH 依存性から LH 依存性にシフトするため、LH パルスの刺激を受けて、閉鎖することなく発育が維持される。この過程を選抜といい、選抜された最大卵胞を主席卵胞という (43)。この選抜時における最大卵胞の平均直径は 8.5mm であり、次席卵胞の平均直径は 7.7mm とされている (35)。W1DF は、黄体が形成され、血中 P₄ 濃度が上昇する時期に発育するため、ほとんどが排卵に至ることなく閉鎖してしまう。一方で、W2DF では、発育している期間に黄体の退行が起こり血中 P₄ 濃度が低下し、LH パルス頻度が上昇することで主席卵胞の発育が維持され、卵胞から多量の E₂ が産生および分泌される。その結果、LH サージが引き起こされ、W2DF は成熟し排卵に至る。

この第 1 卵胞波において、その発育動態やホルモン動態に関して詳細に調査されていないが、W1DF 自身の性質や、それが繁殖生理や受胎性に及ぼす影響に関しては十分に検討されてはいない。既に述べたように、第 1 卵胞波は黄体形成と共に発育するため、W1DF は血中 P₄ 濃度が低値から徐々に上昇する時期に成長する。一方、第 2 卵胞波は黄体が十分に成熟してから発育を開始するため、W2DF は血中 P₄ 濃度が高値な時期に成長する。主席卵胞の発育には脳下垂体前葉から分泌される LH のパルス状の分泌が必須で

あるため、W1DF と W2DF が発育する期間での血中 P₄ 濃度推移が異なることによる、LH パルス頻度の違いが発育する主席卵胞の形態や機能に差異をもたらすと考えられる。過去の研究をみても、W1DF と W2DF の性質や機能の違いを十分に比較した研究はほとんど行われてこなかった。そこで、W1DF の特有の性質や機能を明らかにするために、W1DF と W2DF の性質を比較した。

また、W1DF の発育を制御する要因を明らかにするために、第 1 卵胞波発育期間中における性ステロイドホルモン動態や、卵巣内で発育する黄体との位置関係などの要因と W1DF の性質を比較することにした。さらに、過去の報告から黄体が存在する卵巣と同側の子宮角の内膜中の P₄ 濃度が高いこと (20)、排卵前卵胞が存在する卵巣と同側の卵管中の E₂ 濃度が高いこと (99) が知られており、局所での卵巣と子宮角の密接な関連性が存在することが示唆される。しかしながら、W1DF が同一卵巣内の黄体や子宮角に対して局所的にどのような影響を与えるのかを調査した研究は見当たらない。

本研究において、第 2 章では、W1DF の性質および機能を明らかにするため、非泌乳牛を用いて、卵胞の発育動態と黄体退行誘起後の卵胞の成熟および排卵に至る過程の卵胞壁血流、ステロイド濃度および顆粒層細胞で発現している因子、さらには排卵後に形成される黄体発育を W2DF と比較した。

第 3 章では、W1DF の発育を制御する要因を明らかにするため、W1DF の発育が、発育期間中の血中 P₄ 濃度および同一卵巣内での黄体の有無による卵巣局所内での影響を受けるのかを調べた。

第 4 章では、泌乳牛を用い、W1DF が繁殖生理にどのような影響を与えるかを目的に、主席卵胞が黄体と同側の卵巣に存在する場合と反対側に存在する場合の受胎性を比較した。

第2章

第1 卵胞波主席卵胞（W1DF）の発育動態，排卵前後の 機能および排卵後に形成される黄体の性質

2-1. 序論

ウシの第1卵胞波は発情・排卵終了直後から卵巣内で発現することが知られており、通常は、黄体が存在する条件下で発育するため、W1DFは発情周期の8~10日までに閉鎖し、排卵に至ることはない(41)。ウシの卵胞の発育動態、発育および選抜に関わる内分泌ホルモン動態を明らかにすることを目的に、これまでW1DFに注目して詳細に研究が行われてきた(9, 53, 93, 103)が、W1DF自身の性質、機能および排卵誘起時の特徴については十分に検討されてこなかった。第2卵胞波は発情周期の9~10日に発現・発育し、黄体の退行に伴い主席卵胞は成熟、発情を誘起し排卵に至る(88)。第1卵胞波は黄体形成と共に発育するため、W1DFはP₄濃度が低値から徐々に上昇する時期に成長する。一方、第2卵胞波は黄体が十分に成熟してから発育を開始するため、W2DFは血中P₄濃度が高値な時期に成長する。つまり、両者は血中P₄濃度推移が異なる状況下で発育するため、それぞれの主席卵胞の発育動態、ステロイド産生能、排卵に伴う変化および排卵後に形成される黄体の形態や機能が異なる可能性がある。

そこで、本章では、W1DFの性質および機能を明らかにするため、非泌乳牛を用いて、卵胞の発育動態と黄体退行誘起後の成熟、排卵に至る過程の卵胞壁血流、ステロイド濃度および顆粒層細胞で発現している因子さらには排卵後に形成される黄体発育をW2DFと比較し調べた。

2-2. 試験1：卵胞波発現から7日目までのW1DFとW2DFの発育動態および

卵胞壁血流の比較

2-2-1. 供試動物

臨床的に健康で、正常な発情周期を有するホルスタイン種非泌乳牛 8 頭（平均年齢： 5.0 ± 1.8 歳，平均±標準誤差）を用いた。対象牛は帯広畜産大学畜産フィールド科学センター内のパドックにて，コーンサイレージ，乾草および濃厚飼料が混合された TMR が給与され，自由飲水できる状況で飼養されていた。実験内容は帯広畜産大学の実験倫理委員会にて承認されている。

2-2-2. 実験方法

8 頭のウシは第 1 卵胞波試験群 ($n=4$) と第 2 卵胞波試験群 ($n=4$) に分けた。それぞれの群は試験終了 2 か月後に，ラテン格子法を用いてクロスオーバー試験を行った。そのため，それぞれの群には 8 頭のウシが全て含まれている ($n=8$)。

第 1 卵胞波試験群では，自然発情開始後 12 時間ごとに超音波画像診断装置を用いて卵巣を観察した。排卵前卵胞の消失を確認した時点を Day 0 とした。卵胞選抜が終了したと考えられる Day 3 から 5 までの期間，超音波画像診断装置を用いて主席卵胞の観察を行った。また Day 6 にはカラードプラ画像診断装置を用いて主席卵胞の平均直径および卵胞壁血流を測定した。また Day 0~6 の間，1 日に 1 回正中尾静脈より採血を行った。

第 2 卵胞波群では，自然発情終了後の排卵確認日を Day -7 とした。第 2 卵胞波発現を誘起するために，Day -2 に WIDF の排卵誘起を目的に GnRH (100 μ g 酢酸フェルチレリン，筋肉内投与；コンセラル；インターベット株式会社，大阪，日本) を投与した。GnRH 投与 36 時間後に超音波画像診断装置を用いて WIDF が排卵していることを確認し，その時点を Day 0 とした。その後，第 1 卵胞波群と同様に卵胞選抜が終了したと考えられる Day 3 から 5 までの期間，超音波画像診断装置を用いて主席卵胞の平均直径を測定した。また Day 6 にはカラードプラ画像診断装置を用いて主席卵胞の平均直

径および卵胞壁血流の測定を行った。また Day 0~6 の間、1 日に 1 回正中尾静脈より採血を行った。試験 1 のプロトコールの模式図を Fig. 2.1.に示した。

2-2-3. 卵胞形態の観察

Day 3から5までの主席卵胞の平均直径は、5.0MHzのリニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置（HS - 101V, 本多電子, 愛知, 日本）を用いて測定した。プローブを手指とともに直腸内に挿入し、左右両側卵巣の断層像を観察した。主席卵胞の卵胞断層画像が最大になるよう静止画を記録し、パソコン上に静止画を移動させ、主席卵胞は長径と短径の平均値を平均直径とし、データとして用いた。

Day 6における主席卵胞の直径および卵胞壁血流は、8.0MHzのリニアプローブ（1739 - RSプローブ；GE横河メディカルシステム, 東京, 日本）を接続したカラードプラ超音波画像診断装置（LOGIQ Book XP, GEメディカルシステム, 東京, 日本）を用いてカラーモードにより観察を行った。卵胞壁血流の検査方法はプローブを手指とともに直腸内に挿入し、主席卵胞の断層像を観察した。卵胞直径が最大でかつ血流面積が最大になるような静止画を記録し、平均直径、卵胞壁血流面積（BFA）および血流分布割合（BF%）を算出した。

BFAの算出は、記録した撮影画像をパソコン内に取り込み、Photoshop 5.5（Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA）を用いて血流領域を白黒画像に変換し、Pop Imaging（デジタル・ビーイング・キッズ, 神奈川, 日本）を用いて血流面積を算出し、BFAとしてデータを用いた（Fig. 2.2.）。

BF%は、撮影した画像を用いて、卵胞円周に対する血流分布の割合を評価するものであり、卵胞壁内での血管分布の程度を示す指標として用いた。Photoshop 5.5を用いて卵胞円

周と血流分布がみられる卵胞壁の長さを算出し、血流分布がみられる卵胞壁の長さを卵胞円周で除したものをBF%としてデータを用いた。

2-2-4. 採血

試験期間中のDay 0から6に21G採血針とヘパリン加真空採血管（ベノジェクトII真空採血管，TERUMO，東京）を用いて尾静脈より10mlの採血を行った。採取した血液は氷水中にて急冷後，4℃で2,000 g，20分間遠心し，血漿分離後，血中P₄濃度測定まで-30℃にて凍結保存した。

2-2-5. 血中P₄濃度の測定

血中P₄濃度の測定は2抗体法による酵素免疫測定法（EIA）により測定した。EIAの手順は以前の報告に基づいて行った（64）。血漿よりP₄を抽出するために，血漿200μlにジエチルエーテル（関東化学，東京，日本）1.0mlを加え，攪拌機（Mix-EVR，タイテック，埼玉，日本）を用いて30分間ボルテクスし，その後室温にて40分間静置した。その後，-30℃の冷凍庫に移動し，24時間かけて完全に凍結させた。凍結後，液相部分を5ml試験管にデカントし，ドラフト内のウォーター・バスに浸し，40℃まで上昇させながらジエチルエーテルを揮発させた後，50℃まで上昇させ無臭になるまで完全に揮発させた。揮発後，試験管にアッセイ・バッファー（7.12g；NA₂HPO₄，8.5g；NaCl，1.0g；BSA，pH 7.2；1N-HCLで調整）を200μl加え，20分間ボルテクスした。この測定法によるP₄の抽出効率84%であった。EIAは抗ウサギIgG抗体（12.5μg/ml；生化学工業株式会社，東京，日本）で被われた96穴ELISAプレート（Corning Glass Works，Corning，New York，USA）を用いて行った。濃度測定は，スタンダードおよびサンプル15μlと100μlのP₄ポリクローナル抗体溶液（OK-1）（1：300,000）と100μlのhorseradish peroxidase（1：50,000）を混和し，4℃にて20時間以

上振盪させた。P₄の標準曲線は0.05～50ng/mlの範囲で、測定内変動および測定間変動はそれぞれ5.2%および7.4%であった。

2-2-6. 統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差で示した。血中 P₄濃度推移の差の検定を行うに当たって、2 元配置分散分析を行い、全体の変化の有意性を調べ、交互作用が有意であった場合、Bartlett 検定を行い分散の均一性を検定した後、Post-hoc 検定として Scheffe の多群比較検定を用いた。Day 6 における卵胞壁血流の比較には、F 検定を行い分散の均一性を確認した後、Student の t 検定を用いた。危険率 10%未満 ($P < 0.1$) を傾向ありとし、危険率 5%未満 ($P < 0.05$) で有意差ありとした。統計処理には統計処理ソフトである StatView (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA) を用いた。

2-3. 試験 2 : 発情および排卵誘起時における W1DF と W2DF の発育動態, 卵胞壁血流 および血中 E₂濃度の比較

2-3-1. 供試動物

2-2. 章と同様の動物を供試した。

2-3-2. 実験方法

試験 1 と同じプロトコールで第 1 卵胞波試験群と第 2 卵胞波試験群を準備した。

その後、発情および排卵誘起を行うことを目的に、Day 6 に PGF_{2α} (25 mg トロメタミンジノプロスト, 筋肉内投与, プロナルゴン F, ゴエティス, 東京, 日本) を投与し黄体退行を誘起し, 48 時間後の Day 8 に GnRH を投与し排卵誘起を行った。Day 6, 8

および9にカラードプラ画像診断装置を用いて主席卵胞の平均直径および卵胞壁血流の測定を行った。またDay 6~9の間、1日に1回正中尾静脈より採血を行った。試験2のプロトコールの模式図をFig. 2.5.に示した。

2-3-3. 卵胞形態の観察

Day 6, 8および9における主席卵胞の直径および卵胞壁血流は、8.0MHzのリニアプローブ（1739 - RSプローブ；GE横河メディカルシステム，東京，日本）を接続したカラードプラ超音波画像診断装置（LOGIQ Book XP，GEメディカルシステム，東京，日本）を用いてカラーモードにより観察を行った。卵胞壁血流の検査方法はプローブを手指とともに直腸内に挿入し，主席卵胞の断層像を観察した。卵胞直径が最大でかつ血流面積が最大になるような静止画を記録し，試験1と同様の方法で平均直径，BFAおよびBF%を算出した。

2-3-4. 採血

試験期間中のDay 6~9に21G採血針とヘパリン加真空採血管（ベノジェクトII真空採血管，TERUMO，東京，日本）を用いて尾静脈より10mlの採血を行った。採取した血液は氷水中にて急冷後，4°Cで2,000 g，20分間遠心し，血漿分離後，血中P₄濃度および血中E₂濃度測定まで-30°Cにて凍結保存した。

2-3-5. 血中P₄およびE₂濃度の測定

血中P₄濃度は試験1と同様の手法でEIAにより測定した。この測定法によるP₄の抽出効率は80%であった。測定内変動および測定間変動はそれぞれ4.7%および6.5%であった。血中E₂濃度はDay 8のみ測定を行った。血漿よりE₂を抽出するために，血漿2.0mlにジエチルエーテル（関東化学，東京，日本）6.0mlを加え，攪拌機（DM-301，アズワン，大阪，日

本) を用いて60分間ボルテクスし、その後室温にて60分間静置した。その後 -30°C の冷凍庫に移動し、24時間かけて完全に凍結させた。凍結後、液相部分を10ml試験管にデカントし、ドラフト内のウォーター・バスに浸し、 40°C まで上昇させながらジエチルエーテルを揮発させた後、 50°C まで上昇させ無臭になるまで完全に揮発させた。揮発後、試験管にアッセイ・バッファーを200 μl 加え、20分間ボルテクスした。この手法により血漿中の E_2 を10倍濃縮した。この測定法による E_2 の抽出効率は80%であった。濃度測定は、スタンダードおよびサンプル15 μl と100 μl の E_2 ポリクローナル抗体溶液 (AS-A) (1 : 20,000) を混和し 4°C にて24時間振盪させた。その後、100 μl のhorseradish peroxidase (1 : 150,000) を混和し、 4°C にて2時間振盪させた。 E_2 の標準曲線は2~2,000 pg/mlの範囲で、測定内変動および測定間変動はそれぞれ6.5%および7.6%であった。

2-3-6. 統計処理

結果はすべて平均値 \pm 標準誤差で示した。血中 P_4 濃度、主席卵胞の平均直径および卵胞壁血流推移の比較には、2 元配置分散分析を行い、全体の変化の有意性を調べ、交互作用が有意であったものに対して、Bartlett 検定を行い分散の均一性を検定した後、Post-hoc 検定として Scheffe の多群比較検定を行った。Day 8 における血中 E_2 濃度の検定には F 検定により分散の均一性を検定し、Student の t 検定を行った。 $P < 0.1$ を傾向ありとし、 $P < 0.05$ で有意差ありとした。統計処理には統計処理ソフトである StatView (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA) を用いた。

2-4. 試験 3 : W1DF と W2DF における排卵前の卵胞内ステロイドホルモン濃度および顆粒層細胞で発現している因子の比較

2-4-1. 供試動物

臨床的に健康で、正常な発情周期を有するホルスタイン種非泌乳牛7頭（平均年齢： 4.0 ± 1.1 歳，平均±標準誤差）を用いた。ウシは帯広畜産大学畜産フィールド科学センター内のパドックにて、コーンサイレージ，乾草および濃厚飼料が混合された TMR が給与され，自由飲水できる状況で飼養されていた。実験内容は帯広畜産大学の実験倫理委員会にて承認されている。

2-4-2 . 実験方法

実験のプロトコールは試験2と同様である。本試験では LH サージ直前（PGF_{2α} 投与 40 時間後：Day 8）および LH サージ後（GnRH 投与 24 時間後：Day 9）の主席卵胞の性質を詳細に評価するため，卵胞液および顆粒層細胞を採取し評価した。本試験では以下4試験群を設けた，1）LH サージ曝露前第1卵胞波群（n=7），2）LH サージ曝露前第2卵胞波群（n=7），3）LH サージ曝露後第1卵胞波群（n=6），4）LH サージ曝露後第2卵胞波群（n=6）である。1）と2）の群にはクロスオーバー試験により7頭のウシが全て含まれている。3）と4）の群に関しては1頭のウシで，顆粒層細胞の回収量が少なく，そのウシを試験より除外したため，6頭を用いたクロスオーバー試験となっている。また，それぞれの群のウシの主席卵胞は全て別の発情周期で採材を行なっている。試験3のプロトコールの模式図を Fig. 2.9. に示した。

2-4-3. 主席卵胞の吸引と顆粒層細胞の回収

主席卵胞の吸引は，超音波画像診断装置（HS-1500，本多電子，東京，日本）を用いて超音波画像観察下での経膣卵胞穿刺により行った。超音波画像観察には，7.5MHzの膣用プローブ（HCV-3710MV，本多電子，東京，日本）を用いて行った。プローブの上部には，

約40cmの穿刺用の針（ディスポーザブル採卵針 A-タイプ、ミサワ医科工業、茨城、日本）を装着できるようになっている。卵胞吸引の前準備として、腔内および外陰部周辺をよく洗浄した。次にプローブを膣より挿入し、卵巣を直腸より挿入した手で膣壁越しに押し当てた。超音波画像診断装置の画面上には、採卵針のガイドラインが示されているので、このガイドライン上に吸引する卵胞が描写されるようにした。画像を観察しながら、18Gの針を膣壁を介して卵胞腔へと刺入し、卵胞液および顆粒層細胞を採卵針に連結させたシリンジにより吸引した。卵胞液は5.0mlチューブに入れ、氷水中にて急冷後、実験室内の実体顕微鏡下で顆粒層細胞を回収した。顆粒層細胞はTriPure Isolation Reagent（Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany）1.0mlを加えて完全に溶解させ、 -80°C にてmRNA抽出まで保存した。顆粒層細胞回収後、卵胞液は 4°C 、500 gで10分間遠心を行い上清を分離した後、EIAによる P_4 、 E_2 およびアンドロステジオン（ A_4 ）濃度測定まで -30°C にて凍結保存した。

2-4-4. 卵胞液 P_4 、 E_2 および A_4 濃度の測定

卵胞液よりステロイドホルモンを抽出するために、血漿40 μl にジエチルエーテル（関東化学、東京、日本）1.0mlを加え、攪拌機（Mix-EVR、タイテック、埼玉、日本）を用いて30分間ボルテクスし、その後室温にて40分間静置した。その後 -30°C の冷凍庫にて移動し24時間かけて完全に凍結させた。凍結後、液相部分を5ml試験管にデカントし、ドラフト内のウォーター・バスに浸し、 40°C まで上昇させながらジエチルエーテルを揮発させた後、 50°C まで上昇させ無臭になるまで完全に揮発させた。揮発後、試験管にアッセイ・バッファーを200 μl 加え、20分間ボルテクスした。この手法により卵胞液中のステロイドホルモンを5倍に希釈した。この測定法による P_4 、 E_2 および A_4 の抽出効率はいずれも82%、81%および85%であった。 P_4 および E_2 の濃度測定は章の2-2-5.および2-3-5.で記したとおり

である。P₄の測定内変動および測定間変動はそれぞれ5.5%および7.4%、E₂の測定内変動および測定間変動は6.2%および8.6%であった。A₄の濃度測定はスタンダードおよびサンプル15 μ lと100 μ lのA₄ポリクローナル抗体溶液（A-3-CMO-BSA, コスモ・バイオ, 東京, 日本）（1 : 750,000）と100 μ lのA-3-CMO-horseradish peroxidase（コスモ・バイオ, 東京, 日本）（1 : 500,000）を混和し4 $^{\circ}$ Cにて24時間振盪させた。A₄の標準曲線は7.8~8,000 pg/mlの範囲で、測定内変動および測定間変動はそれぞれ4.3%および5.2%であった。

2-4-5. RNA抽出とリアルタイムPCR

Total RNAの抽出は以下の手順で行った。解凍したサンプルにクロロホルム溶液を200 μ l加えて、15秒間ボルテクスし3分間室温で静置した後、4 $^{\circ}$ C, 36,000 gにて15分間遠心分離を行った。クロロホルム液相とTriPure Isolation Reagent 溶液相に分離していることを確認し、クロロホルム層を別の1.5mlチューブに移す。これに500 μ lのイソプロパノール溶液（3-Propanol）を加え、15秒間ボルテクスし、10分間室温にて静置した後、4 $^{\circ}$ C, 36,000 gにて15分間遠心分離を行った。RNAのペレットの存在を確認した後、イソプロパノール溶液を除去し、500 μ lの80%エタノールを加え、洗浄し、4 $^{\circ}$ C, 36,000 gにて5分間遠心分離を行った。エタノールを除去後、室温で5分間ペレットを乾燥させ、6 μ lのジエチルピロカーボネート（DEPC）処理水を加えた。

逆転写はSuperscript VIRO Reaction Mix（Invitrogen., Carlsbad, CA, USA）を用いた。まず、Nano-Drop 2000（Thermo scientific, Wilmington, DE, USA）を用いてRNA濃度を算出した。次に、RQ1 RNase-Free DNase（Promega, Madison, WI, USA）を用いてDNase処理を行った。RNAが1 μ g含まれるRNA溶液、1 μ lのDNase 10 \times Reaction Bufferおよび2 μ lのRNase-Free DNaseを混和し、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。その後、1 μ lのDNase Stop Solutionを加え65 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートした。DNase処理したサンプルに5 \times VILO

Reaction Mixを4 μ l, 10 \times Super Script Enzymeを2 μ l加え, 総量が20 μ lになるようにDEPC処理水を加えた後, 25 $^{\circ}$ Cで10分間, 42 $^{\circ}$ Cで60分間および85 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートし, cDNAを作成した。

2-4-6. リアルタイムPCRによるmRNA発現量の測定

リアルタイムPCRはTli RNaseH Plus (キアゲン, 東京, 日本) を使用し, Roter-Gene Q (キアゲン, 東京, 日本) を用いて行った。7.5 μ lのSYBR Green Master Mix, 5.75 μ lのDEPC処理水, ForwardとReverseのプライマーを各0.375 μ l加え, 最後に1.0 μ lのサンプルを加えて反応させた。測定するmRNAは, LH受容体 (LHr), アロマトラーゼ (CYP19A1), シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2), PGE₂合成酵素 (PGES), PGF_{2 α} 合成酵素 (PGFS), 誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS), 血管内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS), 血管内皮増殖因子 (VEGF) 120, VEGF164, 線維芽細胞増殖因子 (FGF) -2, Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), チトクロームP450側鎖切断酵素 (cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzymes; P450-scc), 3 β -水酸基脱水素酵素 (3 β -hydroxy steroid dehydrogenase; 3 β -HSD) およびグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) である。GAPDHは内部標準遺伝子として用い, その発現との割合で求めた。プライマーはPrimer-3を用いて作成した。リアルタイムPCRの反応条件は94 $^{\circ}$ Cで10分間処理した後, 94 $^{\circ}$ Cで30秒, 各々のアニーリング温度で30秒および72 $^{\circ}$ Cで30秒のサイクルを40回行った。それぞれのmRNAのプライマーのシーケンスを示した表をTable 2.3.に示した。LHサージ曝露前の顆粒層細胞に対してはLHrおよびCYP19A1 mRNA発現量を測定した。LHサージ曝露後の顆粒層細胞に対してはCOX-2, PGES, PGFS, iNOS, eNOS, VEGF120, VEGF164, FGF-2, StAR, P450-sccおよび3 β -HSD mRNA発現量を測定した。

2-4-7. 統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差で示した。卵胞液中の性ステロイドホルモン濃度および顆粒層細胞で発現する mRNA 発現量の比較に関しては、まず F 検定により分散の均一性を検定し、等分散が認められた場合、Student の t 検定を行い、等分散が認められなかった場合は Mann-Whitney の U 検定を行った。P < 0.1 を傾向ありとし、P < 0.05 で有意差ありとした。統計処理には統計処理ソフトである StatView (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA) を用いた。

2-5. 試験 4 : W1DF と W2DF の排卵後に形成される黄体の形態、黄体血流および血中 P₄ 濃度推移の比較

2-5-1. 供試動物

臨床的に健康で、正常な発情周期を有するホルスタイン種非泌乳牛 6 頭 (平均年齢 : 4.2 ± 2.1 歳, 平均±標準誤差) を用いた。ウシは帯広畜産大学畜産フィールド科学センター内のパドックにて、コーンサイレージ、乾草および濃厚飼料が混合された TMR が給与され、自由飲水できる状況で飼養されていた。実験内容は帯広畜産大学の実験倫理委員会にて承認されている。

2-5-2 . 実験方法

6 頭のウシは W1DF 排卵後黄体 (W1CL ; n=3) と W2DF 排卵後黄体 (W2CL ; n=3) に分けた。それぞれの群は試験終了 2 か月後に、ラテン格子法を用いてクロスオーバー試験を行った。そのため、それぞれの群には 6 頭のウシが全て含まれている (n=6)。

試験のプロトコールは試験 2 と同様であるが、本試験では主席卵胞を吸引せず、排卵させ、その後に形成される黄体を観察した。

W1DF と W2DF とともに、Day 8 に GnRH を投与し、その 24 時間および 36 時間後に超音波画像診断装置で排卵確認を行い、24 時間後に排卵せず、36 時間後までに排卵が確認された時点を Day 10 とした。Day 9 における主席卵胞の平均直径および卵胞壁血流、Day 12, 15, 18 および 21 における黄体の黄体断面積および黄体血流をカラードプラ超音波画像診断装置を用いて測定した。

また Day 10~21 の間、1 日に 1 回正中尾静脈より採血を行った。試験 4 のプロトコールの模式図を Fig. 2.15. に示した。

2-5-3. 卵胞および黄体形態の観察

Day 9 における主席卵胞の平均直径および卵胞壁血流、Day 12, 15, 18 および 21 における黄体の断面積および黄体血流は、8.0MHz のリニアプローブ (1739 - RS プローブ ; GE 横河メディカルシステム, 東京, 日本) を接続したカラードプラ超音波画像診断装置 (LOGIQ Book XP, GE メディカルシステム, 東京, 日本) を用いてカラーモードにより観察を行った。卵胞の評価は試験 1 と同様の方法で行い、卵胞壁血流の評価には BF% を用いた。黄体の断面積は、黄体の断層画像が最大になるよう静止画を記録し、パソコン上に静止画を移動させ、黄体の長径と短径の平均値から平均直径を算出し、 $(\text{平均直径}/2)^2 \times 3.14$ に当てはめ黄体断面積を算出し、データに用いた。

黄体血流の検査方法は、黄体の断層像を観察し、黄体断面積が最大でかつ血流面積が最大になるような静止画を記録し、黄体血流面積を算出した。

黄体血流面積の算出は、記録した撮影画像をパソコン内に取り込み、Photoshop 5.5 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) を用いて血流領域を白黒画像に変換し、Pop

Imaging (デジタル・ビーイング・キッズ, 神奈川) を用いて血流面積を算出し, 黄体血流面積としてデータを用いた。

2-5-4. 採血

試験期間中のDay 10~21に21G採血針とヘパリン加真空採血管 (ベノジェクトII真空採血管, TERUMO, 東京) を用いて尾静脈より10mlの採血を行った。採取した血液は氷水中にて急冷後, 4°Cで2,000 g, 20分間遠心し, 血漿分離後, 血中P₄濃度測定まで-30°Cにて凍結保存した。

2-5-5. 血中P₄濃度の測定

血中P₄濃度の測定は試験1と同様の方法で行った。測定内変動および測定間変動はそれぞれ6.4%および8.6%であった。

2-5-6. 統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差で示した。黄体断面積, 黄体血流面積および血中 P₄濃度推移を比較するに当たっては, 2元配置分散分析を行い, 全体の変化の有意性を調べ, 交互作用が有意であった場合, Bartlett 検定を行い分散の均一性を検定した後, Post-hoc 検定として Scheffe の多群比較検定を用いた。排卵前卵胞の平均直径を比較するには, まず F 検定により分散の均一性を確認した後, Student の t 検定を行った。P < 0.1 を傾向ありとし, P < 0.05 で有意差ありとした。統計処理には統計処理ソフトである StatView (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA) を用いた。

2-6. 結果

2-6-1. 試験1の結果

血中P₄濃度推移をFig. 2.3.に示した。全試験期間中においてW2群でW1群に比較して有意に高く推移した。

主席卵胞の平均直径の推移をFig. 2.4.に示した。W1DFの平均直径は試験期間中、W2DFに比較して大きく発育し、特にDay 6に有意に大きかった。また、W1DF群内では、Day 3および4からDay 6にかけて有意に大きく発育したが、W2DF群内では、Day 3からDay 6にかけてのみ有意に大きくなった。

Day 6におけるBFAおよびBF%をTable 2.1.に示した。BFAおよびBF%はW1DFで高い傾向を示した。

2-6-2. 試験2の結果

主席卵胞の平均直径の推移をFig. 2.6.に示した。平均直径の推移は、W1DFがW2DFに比較して試験期間中を通して有意に高く推移した。試験期間中の血中P₄濃度推移をFig. 2.7.に示した。Day 6における血中P₄濃度はW2DFでW1DFに比較して有意に高かったが、その後の血中P₄濃度推移に両群間で差はなく、PGF_{2α}投与後急激に低下した。

試験期間中のBFAおよびBF%の推移をFig. 2.8.に示した。BFAは、W1DFにおいてDay 9でW2DFに比較して有意に高かったが、Day 6および8では両群間で差はなかった。また、BFAの推移を群内で比較したところW1DFおよびW2DFともにDay 6から9にかけて有意に増加した。また、W1DFにおいてのみDay 8から9にかけて有意に増加したが、W2DFでは有意な増加はみられなかった。BF%は、W1DFにおいてDay 9でW2DFに比較して有意に高かったが、Day 6および8では両群間で差はなかった。BF%推移を群内で比較したところ

W1DFではDay 6から9およびDay 8から9にかけて有意に増加したが、W2DFでは有意な増加はみられなかった。

Day 8における血中E₂濃度をTable 2.2.に示した。血中E₂濃度はW1DFで有意に高かった。

2-6-3. 試験3の結果

LHサージ曝露前における卵胞液中E₂およびA₄濃度は、W1DFで有意に高かったが、P₄濃度に差はなかった (Table 2.4.)。LHサージ曝露後における、卵胞液中P₄およびE₂濃度に差はなかった (Table 2.5.)。

LHrとCYP19A1 mRNA発現量の結果をFig. 2.10.に示した。LHrはW1DFでW2DFに比較して有意に高かったが、CYP19A発現量に差はなかった。COX-2, PGESおよびPGFS mRNA発現量に両群間で差はなかった (Fig. 2.11) 。iNOSおよびeNOS mRNA発現量をFig. 2.12.に示した。iNOS に差はなかったが、eNOSはW1DFで高い傾向を示した。VEGF120, VEGF164およびFGF-2 mRNA発現量の結果をFig. 2.13.に示した。W1DFにおいて、VEGF120およびFGF-2で高い傾向を示し、VEGF164は有意に高かった。StAR, P450-sccおよび3β-HSD mRNA発現量の結果をFig. 2.14.に示した。W1DFにおいてStARで高い傾向を示し、P450-sccおよび3β-HSD mRNAは有意に高かった。

2-6-4. 試験4の結果

Day 9におけるW1DFとW2DFの平均直径とBF%の結果をTable 2.6.に示した。W1DFにおいて平均直径およびBF%は大きかった。黄体断面積推移をFig. 2.16.に示した。黄体断面積はDay 15, 18および21でW1CLでW2CLに比較して有意に高かった。

黄体血流面積推移をFig. 2.17.に示した。黄体血流面積はDay 12および15でW1CLでW2CLに比較して有意に高かった。

血中P₄濃度推移をFig. 2.18.に示した。血中P₄濃度は全試験期間を通じてW1CLでW2CLに比較して有意に高かった。

2-7. 考察

本章での試験 1 および 2 から、W1DF は W2DF に比較して、主席卵胞の平均直径、卵胞壁血流、LH サージ曝露直前の血中 E₂ 濃度が高かった。また、試験 3 から、卵胞液 E₂ 濃度および卵胞液 A₄ 濃度、顆粒層細胞で発現している LHr、血管新生因子、ステロイド合成酵素の mRNA 発現量が W1DF で高かった。試験 4 から、W1DF 排卵後に形成される黄体の断面積、血流および血中 P₄ 濃度推移が高いことが明らかとなった。これらの結果から、W1DF は W2DF に比較して卵胞としてより機能的に活力が高いことが考えられる。また、これらの差異が生じる原因として、W1DF 発育期間中の低い血中 P₄ 濃度に伴う高い LH パルス頻度による卵胞細胞への刺激が推測された。

試験 1 より、卵胞波発現開始から 7 日目までの主席卵胞の発育を比較すると、卵胞選抜開始後から、発育率や主席卵胞の平均直径は W1DF で大きくなることが示された。また、W1DF および W2DF それぞれの発育期間中の血中 P₄ 濃度を比較すると、Day 0 から Day 6 にかけて W1DF で有意に低く推移することが明らかにされた。過去の研究において、黄体形成期は黄体開花期に比較して、LH パルス頻度が高くなることが報告されている (73)。また、腔内留置型 P₄ 製剤を用いて、血中 P₄ 濃度を高くすると LH パルス頻度は低下する一方で、血中 P₄ 濃度を低く維持すると LH パルス頻度は上昇することが知られている (15, 52)。また、Adams et al. (5) は、自然発情後の排卵確認時に腔内留置型 P₄ 製剤を挿入し、その後の卵巣内で発育する第 1 卵胞波の卵胞発育動態を観察したと

ころ、挿入しなかった牛に比べ主席卵胞の最大に達した平均直径が小さいことを報告している。卵胞波の中で卵胞が主席卵胞として選抜され、その後発育を継続するためには、顆粒層細胞で LHr の発現が必須である (13)。試験 1 でみられた、W1DF の W2DF に比べて平均直径が大きく推移したことから、W1DF の発育期間中の低い血中 P₄ 濃度推移に起因する高い LH パルス頻度により主席卵胞の発育が促されたと推測される。さらに、試験 1 では Day 6 に卵胞壁血流を観察したところ、W1DF は W2DF に比較して高い傾向を示した。卵胞の発育過程において、卵胞壁での血管形成は重要であることが知られている (95)。過去の研究において、選抜後の主席卵胞での卵胞壁血流が増加することが報告されている (42)。また、閉鎖前後の卵胞壁血流を比較すると閉鎖後に卵胞壁血流が観察されなくなるという報告もある (2)。これらのことから、カラードブラを用いた卵胞壁血流の評価は卵胞の活力や機能を評価するのに有効な指標となると考えられ、本研究でみられた W1DF と W2DF における卵胞壁血流の違いは卵胞の機能の差を示していると考えられる。本研究の結果において、W1DF では W2DF に比べ発育率、平均直径および卵胞壁血流が高かったことから、機能性が高い卵胞であることが推測された。

試験 2 では PGF_{2α} および GnRH を用いて、黄体退行誘起後の卵胞の成熟および排卵に至る過程の W1DF と W2DF の性質を調べ、比較した。主席卵胞の平均直径は Day 6 から Day 9 にかけて期間を通して W1DF で大きく推移した。卵胞壁血流の変化を比較したところ、W1DF において GnRH 投与前後で有意な増加が観察されたが、W2DF においては有意な増加は観察されず、Day 9 において W1DF で卵胞壁血流が W2DF に比べ有意に大きかった。ウシでは LH サージからおよそ 27 時間後に排卵することが知られている (24)。またウシでは、排卵直前 (LH サージ曝露およそ 19~21 時間後) の卵胞壁血流が増加することが報告されている (85)。卵胞が LH サージに曝露されると、卵胞内で PG 類、ヒスタミン、コラゲナーゼ、キニンおよびプラスミノゲンアクチベータなどの産生が

充進し卵胞血管網での透過性充進や卵胞壁の融解、菲薄化が起こることで排卵が進行し、その反応は炎症現象に類似していることが知られている (25)。そのため、LH サージ曝露後に増加する卵胞壁血流は、これらの炎症性変化に起因する血管機能の変化によると考えられる。しかしながら、本試験では GnRH 投与 24 時間後における卵胞壁血流の有意な増加は W1DF のみでしか観察されなかった。また、BF%においても Day 9 において W1DF で高いことから、W1DF の血流の増加および高値の原因として、卵胞壁内での血管の分布がより広範囲である可能性が考えられる。また、LH サージに対する反応性が高いことで卵胞壁での炎症性変化がより大きくなり、血管への血液還流量が増加している可能性が考えられる。未経産牛を用いて発情誘起を行なった試験において、GnRH 投与 26 時間後の卵胞壁血流とその時に実施した人工授精後の受胎の有無を比較したところ、妊娠した牛で卵胞壁血流が有意に高いことを報告している (84)。この現象は、ウマを用いた試験においても同様の結果が得られている (87)。また、発情を誘起し GnRH 投与 26 時間後の排卵前卵胞から回収した卵子に対して、体外受精を行いその後の胚発育を比較した研究では、卵子回収時の排卵前卵胞の卵胞壁血流が大きい場合、胚発育が良好であることも明らかにされている (86)。これらのことから、排卵前卵胞の卵胞壁血流は、その卵胞の活力の程度を示すことができると考えられる。また、本研究から、GnRH 投与時の Day 8 における血中 E₂ 濃度は W1DF で高いことが示された。過去の定時人工授精を用いた試験において、GnRH 投与時の血中 E₂ 濃度とその後の受胎可能性との間には正の相関関係が存在することが知られている (14)。また、定時人工授精時に発情徴候を示していたウシは、発情徴候を示していなかったウシに比較して受胎率が高いことが報告 (70) されており、排卵前の血中 E₂ 濃度は受胎性や卵胞の活力を示す指標となる。これらのことから、W1DF は卵胞壁血流が大きく、排卵直前の血中 E₂ 濃度が高いことから、W2DF に比べ活力が高いことが推測される。

試験 3 では、試験 2 で得られた、W1DF の性質をさらに詳細に比較するため、LH サージ曝露前後の卵胞液性ステロイドホルモンや顆粒層細胞で発現している mRNA 発現量を比較した。

LH サージ曝露前の成熟卵胞内で、ステロイドホルモン合成過程は、卵胞壁の内卵胞膜細胞において、ステロイドホルモンの基質となるコレステロールが細胞内に取り込まれることから始まり、このコレステロールは StAR によりミトコンドリア内に取り込まれ、続いてミトコンドリア内膜上に存在する P450-scc によりコレステロールからプレグネノロンに変換され、その後滑面小胞体上に存在している 3β -HSD によりプレグネノロンから P_4 へと変換される (22)。 P_4 は C17 水酸化酵素活性により 17α -ヒドロキシプロジェステロンへと変換され、C17-20 側鎖切断酵素活性により A_4 へと変換される (31, 59)。さらに A_4 は卵胞膜細胞から顆粒層細胞に移行しそこでアロマターゼ (CYP19A1) により E_2 へと変換される (12) ことで卵胞内でステロイドが産生されている。本試験において、卵胞液中 E_2 および A_4 濃度は W1DF で高かったが、CYP19A1 mRNA 発現量においては両群に差はなかった。過去に行われた研究において、卵胞内での E_2 産生の制限要因は、アロマターゼ活性ではなく、内卵胞膜で産生される A_4 によるところが大きいという報告がある (9)。これらのことから、W1DF における卵胞液 E_2 濃度の高値は W1DF の内卵胞膜での高い A_4 産生能によるものであると推測される。LH サージ曝露前の顆粒層細胞で発現している LHr mRNA 発現量を比較すると、W1DF が高いことが示された。ウシの顆粒層細胞において、LH は LHr mRNA 発現量を増加させることが知られており (56)、試験 1 において W1DF 発育期間中の血中 P_4 濃度が低かったことから、W1DF 発育期間中の高い LH パルス頻度が W1DF 顆粒層細胞中における LHr 発現量を高めたと考えられる。卵胞が LH サージに反応して排卵できるようになるためには、顆粒層細胞における LHr 発現が必須であることから、W1DF の顆粒層細胞は LH サージを受けて排卵へ向かう反

応性がより高いことが推測され、試験 2 における Day 9 での W1DF の卵胞壁血流の高値は、W1DF の LH サージに対する排卵前の卵胞壁血流増加における反応性の高さを反映している可能性が示唆される。

卵胞が LH サージに曝露されると、卵胞を構成する細胞である顆粒層細胞や卵胞膜細胞は黄体細胞へと変化することで、ステロイド合成は E₂ 合成から P₄ 合成へと急速に移行していく (89)。また、LH サージ曝露後の卵胞液中において、PG 類の濃度が急激に上昇していく (1, 3)。PG は局所における血管作動性作用 (21, 98) や血管透過性作用 (26) を持つことが知られており、排卵直前の卵胞体積増加 (61) とその後の卵胞破裂 (26) に関わるとされている。さらに、排卵直前における PGE₂ 合成を抑制すると、卵胞の破裂を抑制することが知られている (71)。ウシにおいて退行開始時の黄体における血流の増加には血管拡張因子である一酸化窒素 (NO) が関与することが報告されており (83)、マウスにおいて卵胞内でも発現が確認されている (104)。VEGF や FGF は卵胞発育 (82) や黄体形成 (105) における血管新生に重要な役割を果たすことが知られており、これらの因子の発現量を比較することで LH サージ前後に排卵に至る過程における卵胞機能を評価できると考えた。

本試験では、COX-2、PGES および PGFS mRNA 発現量に有意な差がなかったことから、排卵過程に必須なこれらの因子の発現量に及ぼす、LH サージに対する反応性が W1DF と W2DF との間で差異はないことを示唆していると考えられる。つまり、これらの因子の発現量の違いが、卵胞壁血流の差異をもたらした原因であるとは考えられない。一方で、eNOS mRNA 発現量は W1DF で高い傾向を示したことから、卵胞の血管拡張作用に W1DF と W2DF 間で差が生じている可能性も考えられる。しかしながら、卵胞壁の血管網は内卵胞膜に分布しており、顆粒層細胞には血管が侵入していない (29) ことから、内卵胞膜での血管網の分布や内卵胞膜細胞での iNOS および eNOS などの血管作動

性因子の発現量を比較することで、卵胞壁血流の差異をもたらした原因について追及していく必要があると考える。

P₄産生に関わるステロイド合成酵素である StAR, P450-scc および 3β-HSD mRNA 発現量を W1DF と W2DF 間で比較したところ、P450-scc および 3β-HSD mRNA が W1DF で高く発現していた。また、血管形成因子である VEGF120, 164 および FGF-2 mRNA 発現量においても、VEGF164 mRNA 発現量が W1DF で高く発現していた。顆粒層細胞に対して、LH は VEGF (45) および P450-scc (106) の発現を上昇させると報告されており、W1DF の LH サージ曝露前の顆粒層細胞で LHr mRNA の発現が高かったことから、これらの因子の発現量が上昇したと推測される。このようにステロイド合成酵素および血管新生因子の発現が W1DF で高くなっていたことから、排卵後に形成される黄体の形態や機能が W1CL において高いことが推測された。

試験 4 において、W1DF 排卵後に形成される W1CL の黄体断面積、黄体血流面積および血中 P₄濃度は高かった。これまで、排卵前卵胞に VEGF のアンタゴニストを投与した場合、その後に形成される黄体の形態や機能を低下させることが報告されている (46)。また、FGFR1 に対するインヒビターを培養した黄体細胞に添加すると血管内皮細胞のネットワークや血管側枝を著しく減少させることが知られている (101)。これらのことから、W1DF における血管形成因子の高い発現により、黄体形成初期の血管形成の程度が W1CL で大きくなったと考えられる。これまで、排卵前卵胞の直径が大きい場合、その後に形成される黄体の直径も大きくなるという報告がある (97)。本試験においても排卵前卵胞は W1DF で大きく、その後の黄体断面積が大きいことから、過去の報告と一致する。さらに、W1CL では黄体形成初期での血管形成の程度が大きかったことから、血液還流量が増加し、黄体の発育がさらに促されて大きく発育したと考えられる。過去の報告において、黄体の直径と血中 P₄濃度には正の相関関係が存在することが知られている

(58)。本試験においても、血中 P_4 濃度が高く推移した原因に、W1CL のサイズが大き
いことも考えられるが、黄体形成初期に血流量が多いことで黄体細胞での P_4 産生の亢進
や、産生された P_4 をより効率良く全身循環に放出できたことが高い血中 P_4 濃度をもた
らしたのではないかと推測される。また、試験 3 から P_4 合成酵素の mRNA 発現量が高
かったことから、黄体細胞でのステロイド合成能の機能の高いことも要因の一つになる
と考えられる。これらのことから、W1DF は卵胞の機能だけでなく、その後に形成され
る黄体の活力も高いことが示された。また、黄体機能は排卵直前の卵胞機能に大きく影
響を受けることが示唆された。

以上のことから、W1DF の性質を明らかにする目的で W2DF と卵胞発育動態、排卵に
至るまでの卵胞壁血流や血中 E_2 濃度、LH サージ曝露前後における卵胞液性ステロイド
濃度、顆粒層細胞で発現している LHr、ステロイド合成酵素、血管作動性因子および血
管形成因子の mRNA 発現量、さらには排卵後に形成される黄体の形態および機能を比較
したところ、W1DF はサイズや機能性が高く、活力の高い卵胞であることが明らかにな
った。

2-8. 小括

黄体形成期に発育する W1DF は、黄体開花期に発育する W2DF に比べ卵胞の発育、卵胞
壁血流、排卵前卵胞の顆粒層細胞で発現している LHr、血管新生因子およびステロイド合
成酵素の mRNA 発現量、ステロイド合成能、黄体形成および黄体機能が強く、活力が高い
ことが示唆された。これらの W1DF の性質は、W1DF 発育期間中の血中 P_4 濃度の低い推移
によるものと推測された。

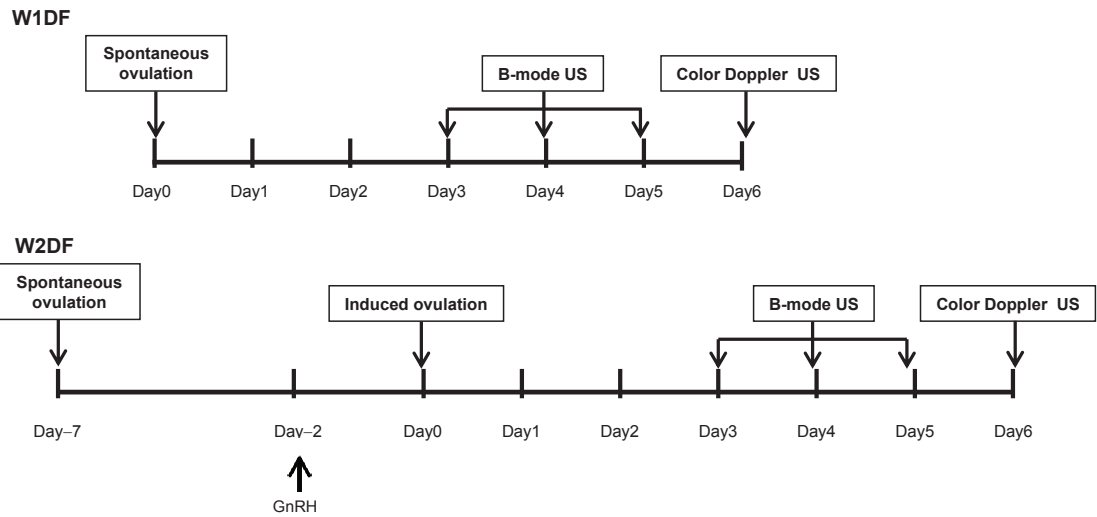


Fig. 2.1.

Schematic diagram of experimental model of W1DF and W2DF in Experiment 1. In the first follicular wave, the day of spontaneous ovulation was defined as Day 0. In the second follicular wave, the day of spontaneous ovulation was defined as Day -7. Ovulation of the first-wave dominant follicle (DF) was induced by GnRH treatment on Day -2 to induce a new follicular wave, and induced ovulation was confirmed 36 h after GnRH treatment on Day 0. W1DF; DF in the first follicular wave. W2DF; DF in the second follicular wave. B-mode US = trans-rectal ultrasonography. Color Doppler US = trans-rectal color Doppler ultrasonography.

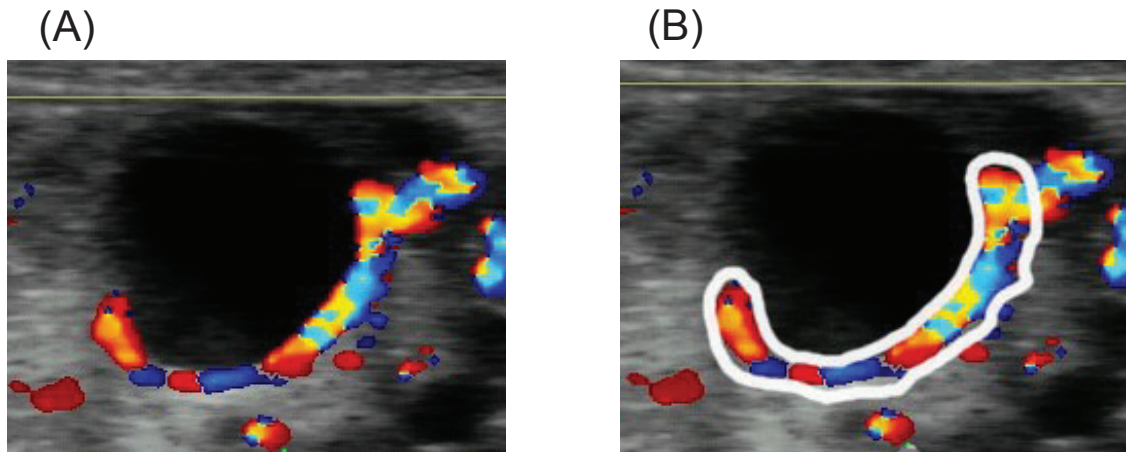


Fig. 2.2.

Measuring method of blood flow area (BFA). Image of (A) is dominant follicle with blood flow signals in the follicular wall using color Doppler ultrasonography. The area of blood flow signals which is enclosed by white line is measured as BFA (image B).

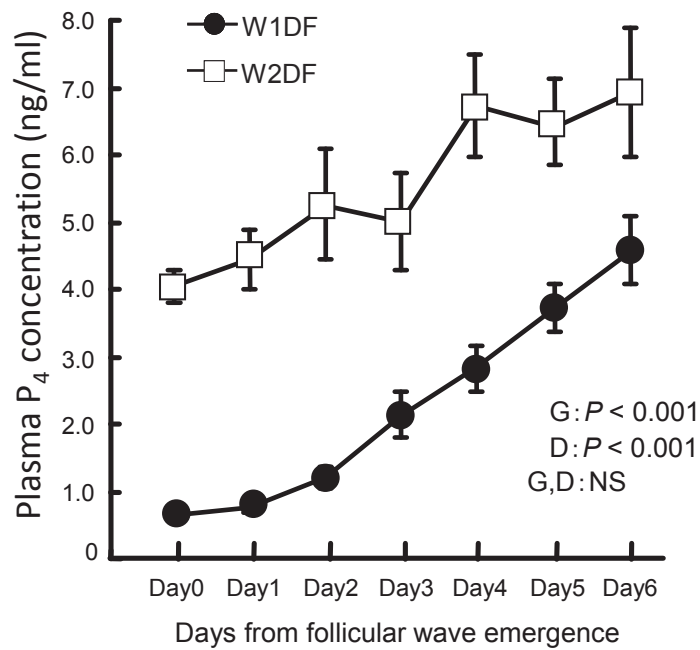


Fig. 2.3.

Comparative changes of plasma P₄ concentration of W1DF and W2DF from Day 0 to 6. Day 0 = The day of follicular wave emergence. W1DF; Dominant follicle (DF) in the first follicular wave. W2DF; DF in the second follicular wave. Effect of group (G) ($P < 0.001$), day (D) ($P < 0.001$) and interaction between group and day (G,D) (NS). Values are mean \pm SEM of each point.

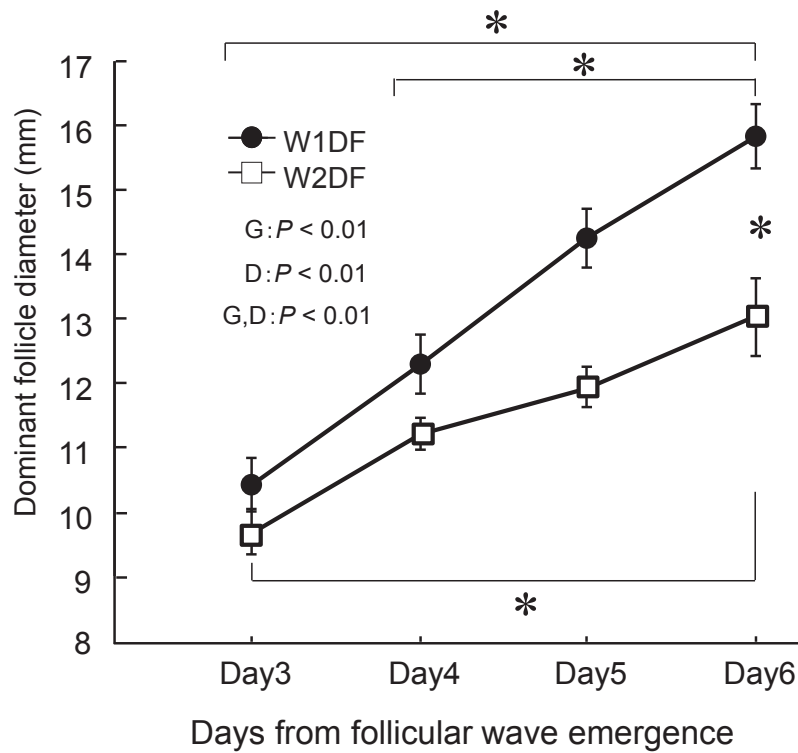


Fig. 2.4.

Comparative changes of dominant follicle (DF) of W1DF and W2DF from Day 3 to 6. Day 0 = The day of follicular wave emergence. W1DF; DF in the first follicular wave. W2DF; DF in the second follicular wave. Effect of group (G) ($P < 0.01$), day (D) ($P < 0.01$) and interaction between group and day (G,D) ($P < 0.01$). The asterisk denotes difference between each point, *: $P < 0.05$. Values are mean \pm SEM of each point.

Table 2.1. Blood flow in the follicular wall on Day6.

	W1DF	W2DF	<i>P</i> -value
BFA(cm ²)	0.32±0.05	0.21±0.05	<i>P</i> < 0.1
BF% (%)	24.37±2.64	18.35±3.17	<i>P</i> < 0.1

Values are mean ± SEM.

W1DF = Dominant follicle (DF) in the first follicular wave.

W2DF = DF in the second follicular wave.

BFA = Blood flow area.

BF% = The percentage of follicle circumference with blood flow signals.

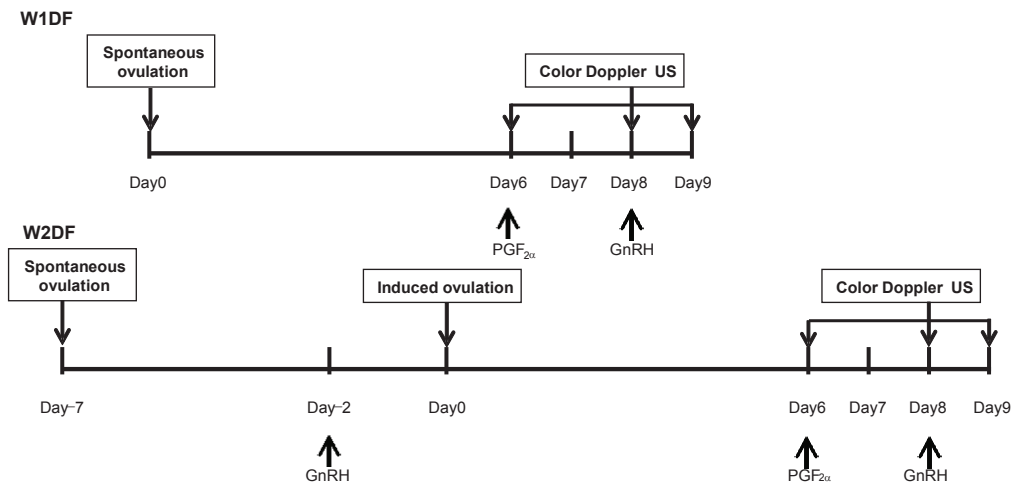


Fig. 2.5.

Schematic diagram of experimental model of W1DF and W2DF in Experiment 2. In the first follicular wave, the day of spontaneous ovulation was defined as Day 0. To induce follicular maturation, PGF_{2α} and GnRH were administered on Day 6 and 8, respectively. In the second follicular wave, the day of spontaneous ovulation was defined as Day -7. Ovulation of the first-wave dominant follicle (DF) was induced by GnRH treatment on Day -2 to induce a new follicular wave, and induced ovulation was confirmed 36 h after GnRH treatment on Day 0. PGF_{2α} and GnRH were administered on Day 6 and 8, respectively. W1DF; DF in the first follicular wave. W2DF; DF in the second follicular wave. Color Doppler US = trans-rectal color Doppler ultrasonography.

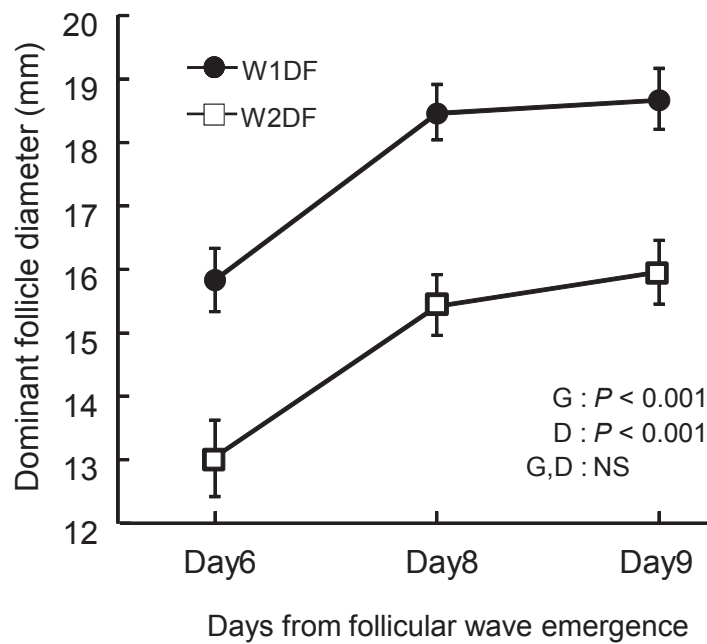


Fig. 2.6.

Comparative changes of dominant follicle (DF) of W1DF and W2DF from Day 6 to 9. Day 0 = The day of follicular wave emergence. W1DF; DF in the first follicular wave. W2DF; DF in the second follicular wave. Effect of group (G) ($P < 0.001$), day (D) ($P < 0.001$) and interaction between group and day (G,D) (NS). Values are mean \pm SEM of each point.

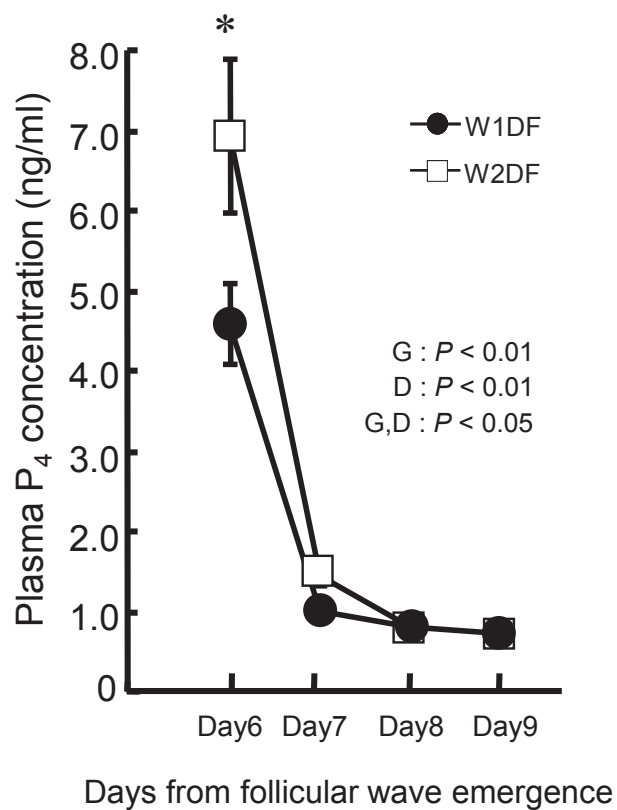


Fig. 2.7.

Comparative changes of plasma P_4 concentration of W1DF and W2DF from Day 6 to 9. Day 0 = The day of follicular wave emergence. W1DF; Dominant follicle (DF) in the first follicular wave. W2DF; DF in the second follicular wave. Effect of group (G) ($P < 0.01$), day (D) ($P < 0.01$) and interaction between group and day (G,D) ($P < 0.05$). The asterisk denotes difference between each point, *: $P < 0.05$. Values are mean \pm SEM of each point.

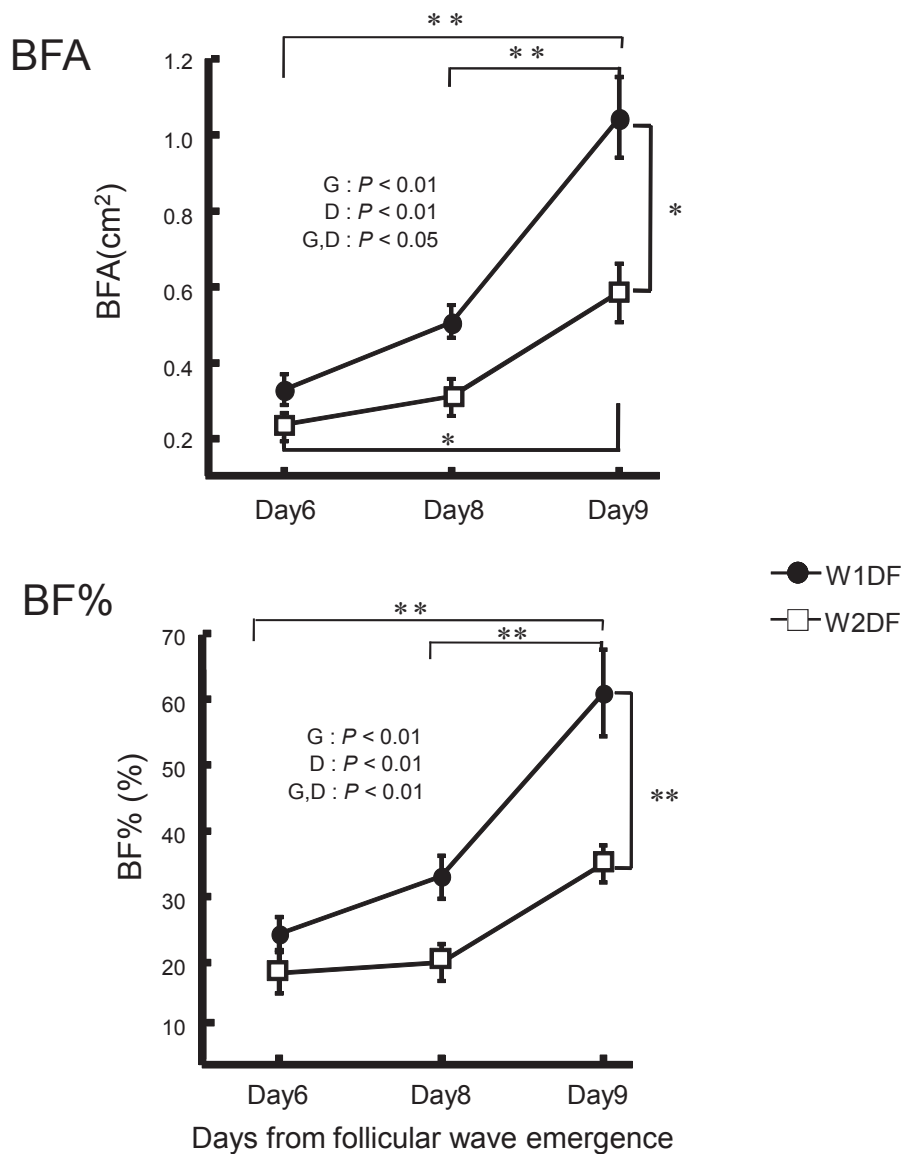


Fig. 2.8.

Comparative changes of blood flow area (BFA) and the percentage of follicle circumference with blood flow signals (BF%) of W1DF and W2DF on Day 6 to 9. Cows were treated with PGF_{2α} and GnRH on Day 6 and Day 8, respectively. Day 0 = day of follicular wave emergence. W1DF; Dominant follicle (DF) in the first follicular wave. W2DF; DF in the second follicular wave. For BFA, effect of group (G) ($P < 0.01$), day (D) ($P < 0.01$) and interaction between group and day (G,D) ($P < 0.05$). For BF%, effect of group (G) ($P < 0.01$), day (D) ($P < 0.01$) and interaction between group and day (G,D) ($P < 0.01$). The asterisk denotes difference between each points, * : $P < 0.05$, * * : $P < 0.01$. Values are mean \pm SEM of each point.

Table 2.2. Plasma E₂ concentration on Day 8.

	W1DF	W2DF	<i>P</i> -value
E ₂ (pg/ml)	7.5±0.9	4.4±0.5	<i>P</i> < 0.01

Values are mean ± SEM.

Day8 = The day of after 48h of PGF_{2α} treatment.

W1DF = Dominant follicle (DF) in the first follicular wave.

W2DF = DF in the second follicular wave.

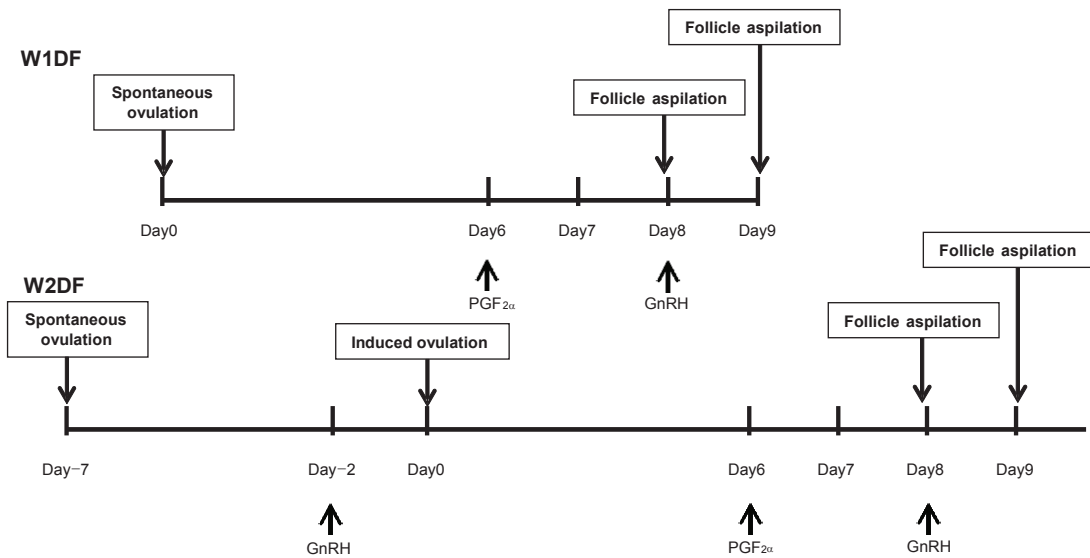


Fig. 2.9.

Schematic diagram of experimental model of W1DF and W2DF in Experiment 3. In the first follicular wave, the day of spontaneous ovulation was defined as Day 0. To induce follicular maturation, $\text{PGF}_{2\alpha}$ and GnRH were administered on Day 6 and 8, respectively. In the second follicular wave, the day of spontaneous ovulation was defined as Day -7. Ovulation of the first-wave dominant follicle (DF) was induced by GnRH treatment on Day -2 to induce a new follicular wave, and induced ovulation was confirmed 36 h after GnRH treatment on Day 0. $\text{PGF}_{2\alpha}$ and GnRH were administered on Day 6 and 8, respectively. W1DF; DF in the first follicular wave. W2DF; DF in the second follicular wave. DF were aspirated by transvaginal ultrasonography in different estrous cycle.

Table 2.3. Primers used in real-time PCR.

Gene		Sequence of nucleotide(5' -3')	Size(bp)	Annealing temperature(°C)	Accession No.
LHr	F ^a R ^b	GCATCCACAAGCTTCCAGATGTTACGA GGGAAATCAGCGTTGTCCCATTGA	204	62	NM 174381
CYP19A1	F R	TTGCAAAGCATCCCCAGGTT AGGTCCACAACGGGCTGGTA	151	60	Z32741
COX-2	F R	TCCTGAAACCCACTCCCAACA TGGGCAGTCATCAGGCACAG	241	60	AF031698
PGFS	F R	GATCAAAGCGATTGCAGACA CAATGCGTTCAGGTGTCCT	113	59	S54973
PGES	F R	CGCTGCTGGTCATCAAAAT GGAAGGGGTAGATGGTCTCC	186	60	AY032727
iNOS	F R	TCATCTTCGCCACCAAGCAG CAGTGATGGCCGACCTGATG	180	60	U14640
eNOS	F R	GGAAATCGGGGGTCTGGAGT TTGGCGAGCTGAAAGCTGTG	219	60	M89952
VEGF120	F R	CCCAGATGAGATTGAGTTCATTTT GCCTCGGCTTGTCACATTTT	377	56	M32976
VEGF164	F R	CCCAGATGAGATTGAGTTCATTTT AGCAAGGCCACAGGGATTT	245	58	M32976
StAR	F R	GTGCATTTTGCCAATCACCT TTATTGAAAACGTGCCACCA	203	54.3	M174189
P450-scc	F R	CTGCAAATGGTCCCCTTCT CACCTGGTTGGGTCAAACCTT	209	56.3	K02103
3β-HSD	F R	TCCACACCAGCACCATAGAA AAGGTGCCACCATTTTTCAG	118	56.3	X17614
GAPDH	F R	CTCTCAAGGGCATTCTAGGC TGACAAAGTGGTCGTTGAGG	160	60	NM001034034

^a F, forward

^b R, reverse

Table 2.4. Sex steroids concentration in follicular fluid on Day 8.

	W1DF	W2DF	<i>P</i> -value
P ₄ (ng/ml)	37.4±8.5	34.6±2.2	NS
E ₂ (ng/ml)	1,942.4±247.9	1,169.3±90.9	<i>P</i> < 0.05
A ₄ (ng/ml)	161.8±26.2	104.6±12.7	<i>P</i> < 0.05

Values are mean ± SEM.

Day 8 = The day of after 40h of PGF_{2α} treatment.

W1DF = Dominant follicle (DF) in the first follicular wave.

W2DF = DF in the second follicular wave.

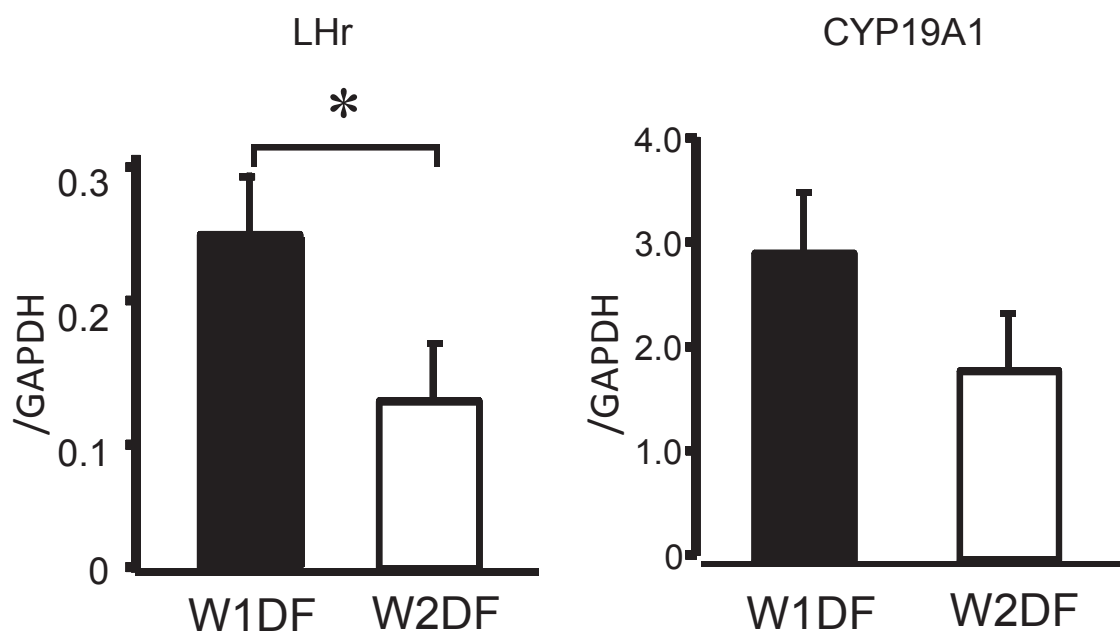


Fig. 2.10.

The relative amounts of mRNA of LHr and CYP19A1 in W1DF and W2DF granulosa cells on Day 8. In each figure, the black bar indicates W1DF and the white bar indicates W2DF. W1DF; Dominant follicle (DF) in the first follicular wave. W2DF; DF in the second follicular wave. Day 8 = the day of after 40h of $\text{PGF}_{2\alpha}$ treatment. The asterisk denotes differences, *: $P < 0.05$. Values are shown as mean \pm SEM.

Table 2.5. Follicular fluid sex steroids concentration on Day 9.

	W1DF	W2DF	<i>P</i> -value
P ₄ (ng/ml)	90.1 ± 11.8	91.4 ± 7.7	NS
E ₂ (ng/ml)	82.5 ± 20.7	64.1 ± 8.7	NS

Values are mean ± SEM.

Day 9 = The day of after 24h of GnRH treatment.

W1DF = Dominant follicle (DF) in the first follicular wave.

W2DF = DF in the second follicular wave.

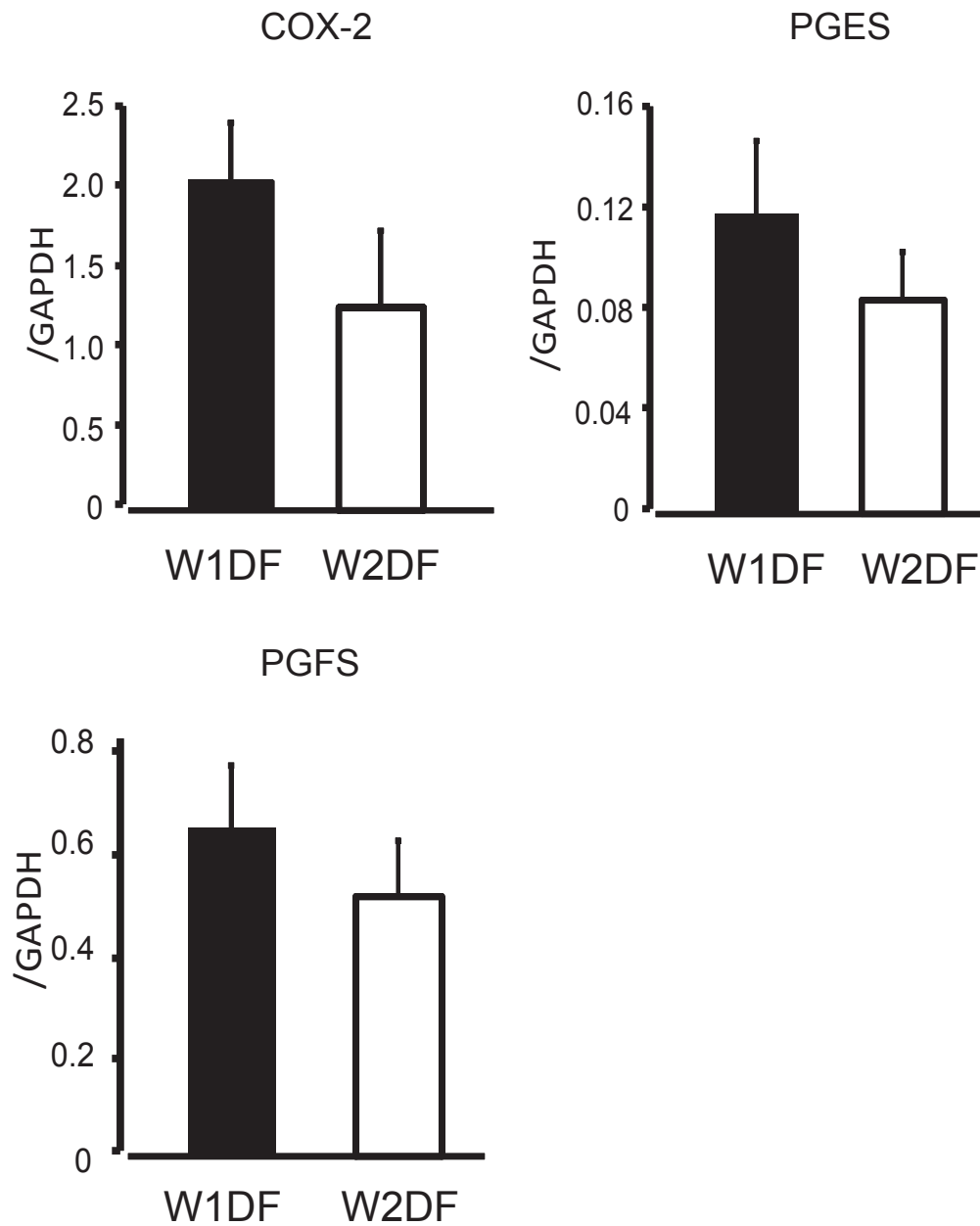


Fig. 2.11.

The relative amounts of mRNA of COX-2, PGES and PGFS of W1DF and W2DF granulosa cells on Day 9. In each figure, the black bar indicates W1DF and the white bar indicates W2DF. W1DF; Dominant follicle (DF) in the first follicular wave. W2DF; DF in the second follicular wave. Day9 = the day of after 24h of GnRH treatment. Values are shown as mean ± SEM.

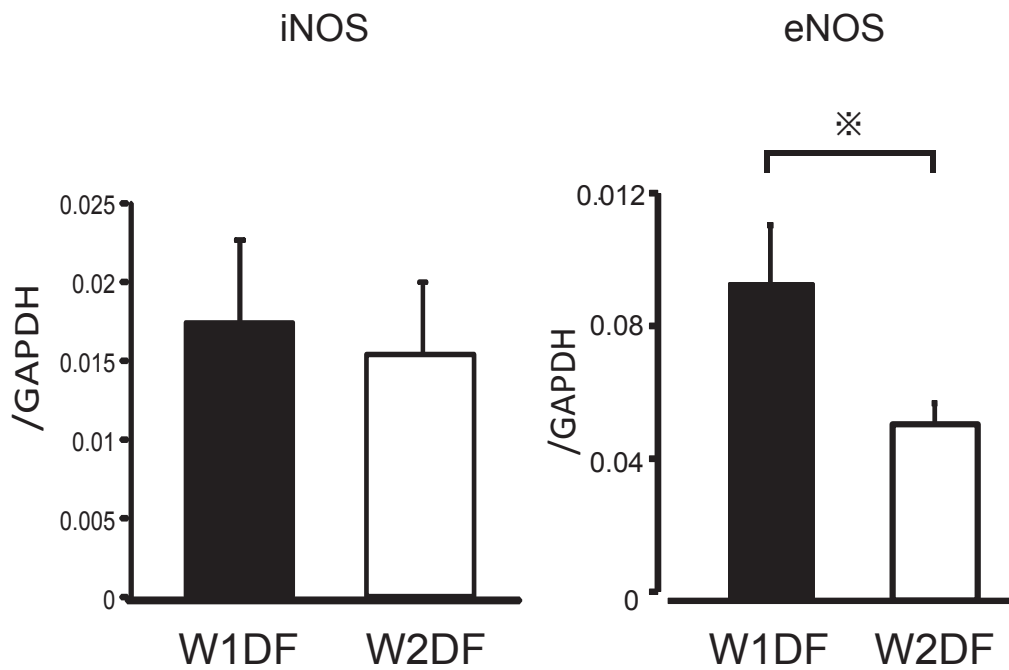


Fig. 2.12.

The relative amounts of mRNA of iNOS and eNOS in W1DF and W2DF granulosa cells on Day 9. In each figure, the black bar indicates W1DF and the white bar indicates W2DF. W1DF; Dominant follicle (DF) in the first follicular wave. W2DF; DF in the second follicular wave. Day9 = the day of after 24h of GnRH treatment. The asterisk denotes differences, *: $P < 0.1$. Values are shown as mean \pm SEM.

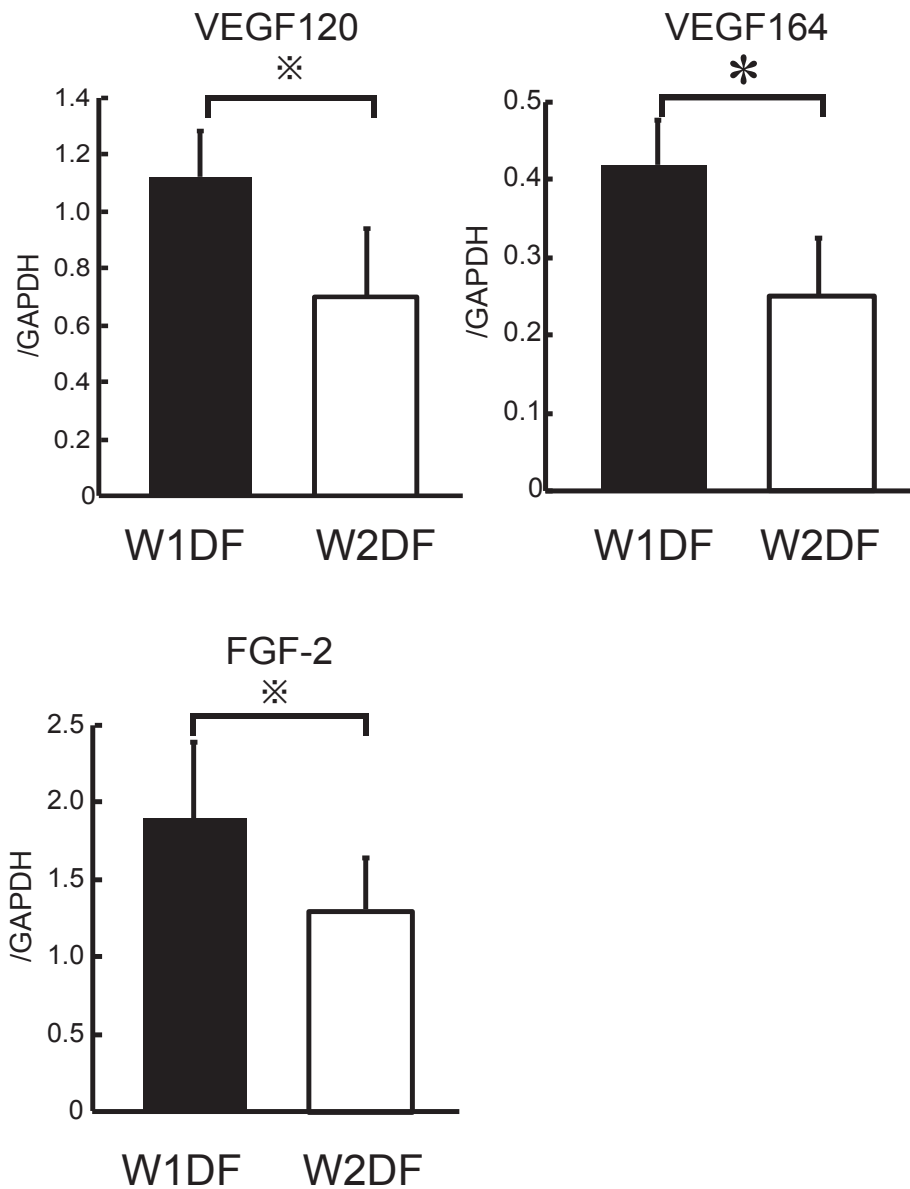


Fig. 2.13.

The relative amounts of mRNA of VEGF120, VEGF164 and FGF-2 in W1DF and W2DF granulosa cells on Day 9. In each figure, the black bar indicates W1DF and the white bar indicates W2DF. W1DF; Dominant follicle (DF) in the first follicular wave. W2DF;DF in the second follicular wave. Day9 = the day of after 24h of GnRH treatment. The asterisk denotes differences, ※: $P < 0.1$, *: $P < 0.05$. Values are shown as mean \pm SEM.

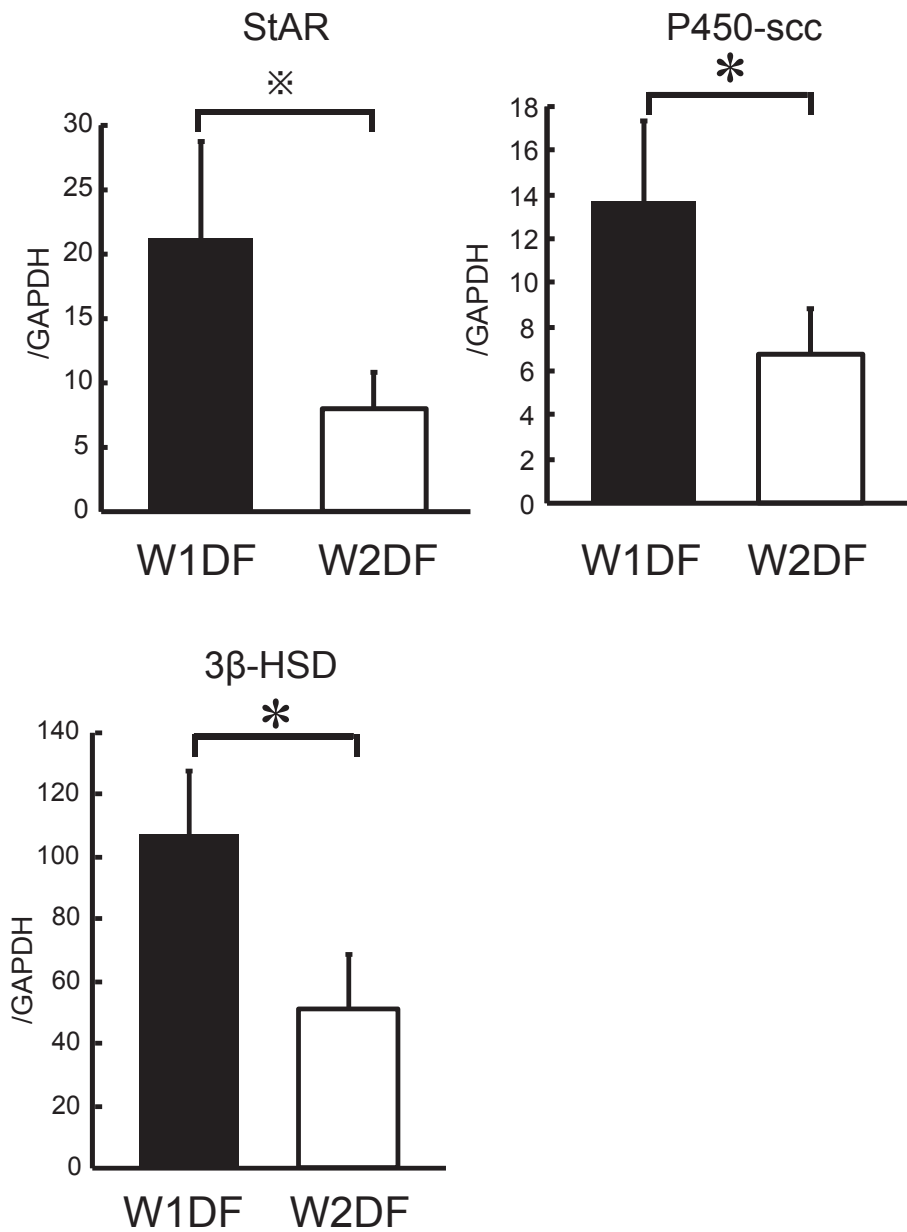


Fig. 2.14.

The relative amounts of mRNA of StAR, P450-scc, and 3β-HSD in W1DF and W2DF granulosa cells on Day 9. In each figure, the black bar indicates W1DF and the white bar indicates W2DF. W1DF; Dominant follicle (DF) in the first follicular wave. W2DF; DF in the second follicular wave. Day9 = the day of after 24h of GnRH treatment. The asterisk denotes differences, ※: $P < 0.1$, *: $P < 0.05$. Values are shown as mean \pm SEM.

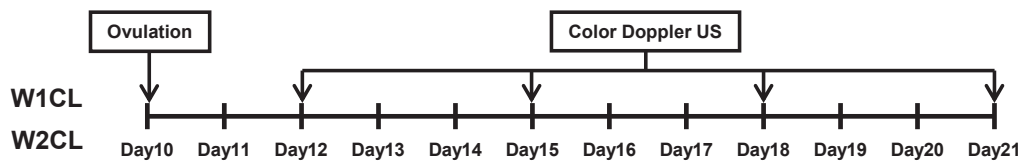


Fig. 2.15.

Schematic diagram of experimental model of W1CL and W2CL in Experiment 4. Day 0 = The day of spontaneous ovulation. Day10 = The day of W1DF or W2DF ovulation. W1DF; Dominant follicle (DF) in the first follicular wave. W2DF; DF in the second follicular wave. W1CL; Corpus luteum (CL) formed after ovulation of W1DF. W2CL; CL formed after ovulation of W2DF. B-mode US = trans-rectal ultrasonography. Color Doppler US = trans-rectal color Doppler ultrasonography.

Table 2.6. Diameter and blood flow in the follicular wall on Day 9.

	W1DF	W2DF	<i>P</i> -value
Diameter (mm)	17.7±0.3	15.7±0.5	<i>P</i> < 0.01
BF%(%)	55.3±4.0	36.1±2.3	<i>P</i> < 0.01

Values are mean ± SEM.

Day 9 = The day of after 24h of GnRH treatment.

W1DF = Dominant follicle (DF) in the first follicular wave.

W2DF = DF in the second follicular wave.

BF% = The percentage of follicle circumference with blood flow signals.

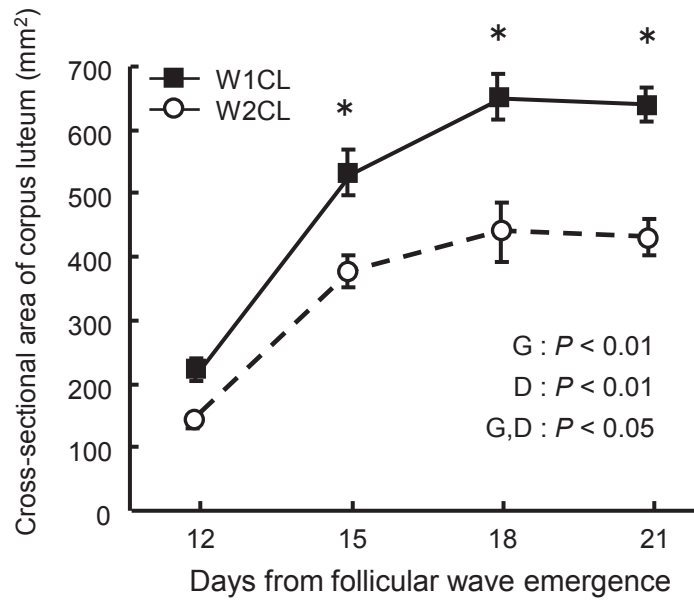


Fig. 2.16.

Comparative changes of cross-sectional area of corpus luteum (CL) of W1CL and W2CL on Day 12, 15, 18 and 21. Day 10 = ovulation day of W1DF and W2DF. W1DF; Dominant follicle (DF) in the first follicular wave. W2DF; DF in the second follicular wave. W1CL; CL formed after ovulation of W1DF. W2CL; CL formed after ovulation of W2DF. Effect of group (G) ($P < 0.01$), day (D) ($P < 0.01$) and interaction between group and day (G,D) ($P < 0.05$). The asterisk denotes difference between each point, *: $P < 0.05$. Values are mean \pm SEM of each point.

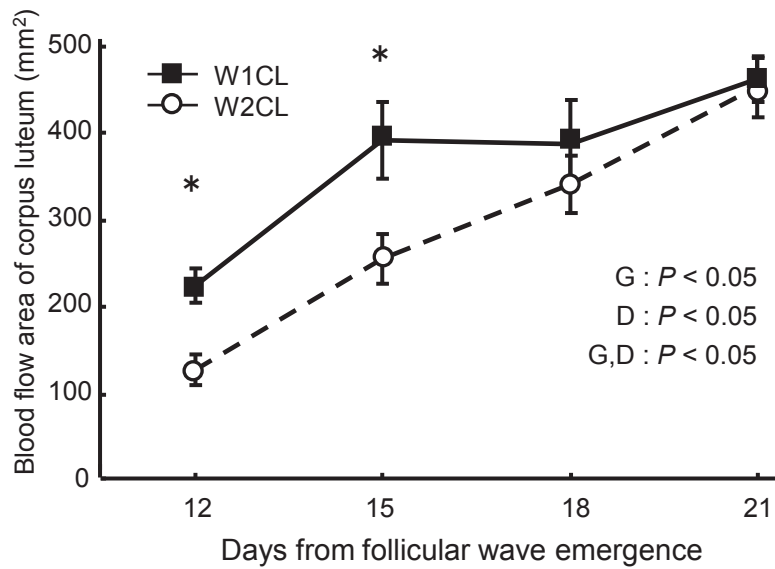


Fig. 2.17.

Comparative changes of blood flow area in the corpus luteum (CL) of W1CL and W2CL on Day 12, 15, 18 and 21. Day 10 = ovulation day of W1DF and W2DF. W1DF; Dominant follicle (DF) in the first follicular wave. W2DF; DF in the second follicular wave. W1CL; CL formed after ovulation of W1DF. W2CL; CL formed after ovulation of W2DF. Effect of group (G) ($P < 0.05$), day (D) ($P < 0.05$) and interaction between group and day (G,D) ($P < 0.05$). The asterisk denotes difference between each point, *: $P < 0.05$. Values are mean \pm SEM of each point.

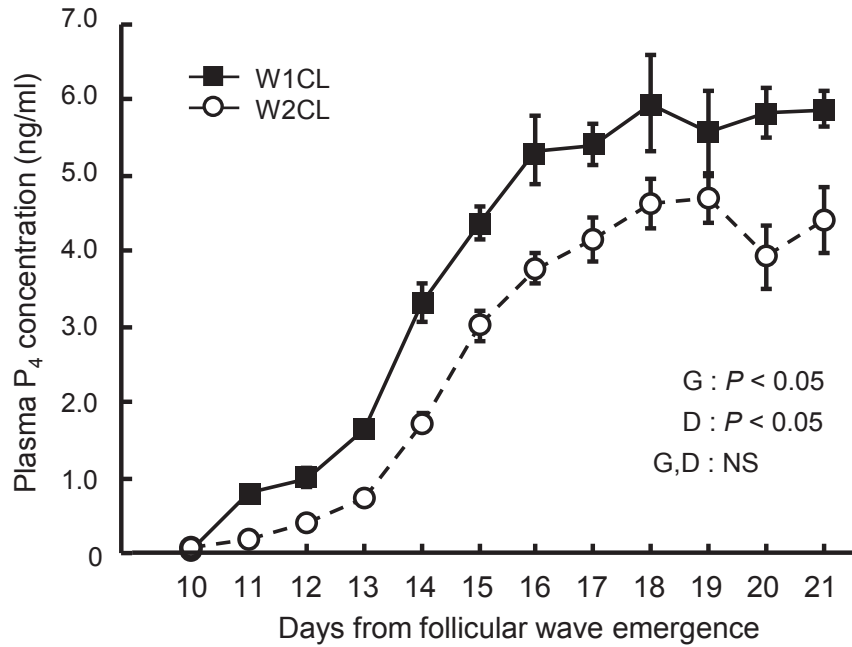


Fig. 2.18.

Comparative changes in the plasma P₄ concentration of W1CL and W2CL. Blood samples were collected daily from Day 10 to 21. Day 10 = ovulation day of W1DF and W2DF. W1DF; Dominant follicle (DF) in the first follicular wave. W2DF; DF in the second follicular wave. W1CL; Corpus luteum (CL) formed after ovulation of W1DF. W2CL; CL formed after ovulation of W2DF. Effect of group (G) ($P < 0.05$), day (D) ($P < 0.05$) and interaction between group and day (G,D)(NS). Values are mean \pm SEM of each point.

第3章

第1 卵胞波主席卵胞 (W1DF) の発育を制御する要因

3-1. 序論

第2章より，W1DFの発育動態，機能，排卵前後の性質および排卵後に形成される黄体の性質をW2DFと比較することで明らかにした。また，両者の性質の違いをもたらす要因として，末梢血中の P_4 濃度の違いによるLHパルス頻度の違いが推測された(15, 52)。Adamsら(5)は発情直後のウシに腔内留置型 P_4 製剤を挿入したとき，W1DFの最大直径が無処置群と比較して小さいことを示している。このことから，W1DFの性質を左右する要因として，発育期間中の血中 P_4 濃度による影響が考えられる。しかしながら，無処置状態でのW1DFの発育を制御する要因は，過去において十分に明らかにされてはいない。そこで，本章では卵胞発育期間中の血中 P_4 濃度が卵胞の発育に及ぼす影響を調べた。さらに，W1DFは黄体と同一卵巢内で発育する(共存)か，反対側の卵巢で発育する(非共存)かのどちらかである。これまで，W1DFと黄体の共存または非共存の発生率は変わらないという報告があり(40)，一方で共存の発生率が高いという報告もある(33)。しかしながら，W1DFと黄体の共存または非共存がW1DFの発育動態や卵胞の機能に与える影響は十分には検討されていない。そこで，本章では，卵巢内局所環境が卵胞の性質に影響を与える可能性を探るため，共存と非共存との間でのW1DFの発育動態，卵胞液中ステロイドホルモンを測定し，比較した。

3-2. 試験1：卵胞波発現から7日目のW1DFの直径と血中 P_4 濃度の相関関係およびW1DFと黄体の共存または非共存関係がW1DFの直径に及ぼす影響

3-2-1. 供試動物

臨床的に健康で、正常な発情周期を有するホルスタイン種非泌乳牛 30 頭（平均年齢： 6.1 ± 0.4 歳，平均 \pm 標準誤差）を用いて，延べ 44 頭のデータを解析に利用した。ウシは帯広畜産大学畜産フィールド科学センター内のパドックにて，コーンサイレージ，乾草および濃厚飼料が混合された TMR を給与され，自由飲水できる状況で飼養されていた。実験内容は帯広畜産大学の実験倫理委員会にて承認されている。

3-2-2. 実験方法

自然発情開始後，12 時間ごとに超音波画像診断装置を用いて卵巣を観察し，排卵前卵胞の消失を確認した時点を Day 0 とした。Day 6 に超音波画像診断装置を用いて W1DF の観察を行った。この時，黄体と W1DF が同一卵巣内に存在する共存関係か，それぞれが別の卵巣に存在する非共存関係であるのかを確認した。また，29 頭から正中尾静脈より採血を行った。

3-2-3. 卵胞形態の観察

主席卵胞の平均直径は，5.0MHzのリニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置（HS - 101V，本多電子，愛知）を用いて測定した。プローブを手指とともに直腸内に挿入し，左右両側卵巣の断層像を観察した。主席卵胞の卵胞断層画像が最大になるよう静止画を記録し，パソコン上に静止画を移動させ，主席卵胞は長径と短径の平均値を平均直径とし，データとして用いた。

3-2-4. 採血

21G採血針とヘパリン加真空採血管（ベノジェクト II 真空採血管，TERUMO，東京，日本）を用いて尾静脈より 10ml の採血を行った。採取した血液は氷水中にて急冷後，4℃で 2,000 g，20 分間遠心し，血漿分離後，血中 P_4 濃度測定まで -30℃にて凍結保存した。

3-2-5. 血中P₄濃度の測定

Day 6における血中P₄濃度はEIAにより測定した。測定は第2章と同様の方法で行った。測定内変動および測定間変動はそれぞれ5.2%および7.4%であった。

3-2-6. 統計処理

Day 6における主席卵胞の平均直径と血中 P₄濃度の相関性を調べるためには、最小2乗法により回帰直線式を求め、Pearsonの相関係数を求めて相関の有意性を検定した。結果はすべて平均値±標準誤差で示した。共存群と非共存群の間でDay 6における主席卵胞の平均直径と血中 P₄濃度の比較には、F検定を行い分散の均一性を確認した後、Studentのt検定を用いた。P<0.05の場合を有意差ありとした。統計処理には統計処理ソフトであるStatView (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA)を用いた。

3-3. 試験2：W1DFと黄体の共存または非共存関係が卵胞波発現日から5日目までのW1DFと黄体の発育動態、血中P₄濃度、および卵胞液ステロイドホルモン濃度に及ぼす影響

3-3-1. 供試動物

臨床的に健康で、正常な発情周期を有するホルスタイン種非泌乳牛5頭（平均年齢：5.6±1.0歳、平均±標準誤差）を用いた。ウシは帯広畜産大学畜産フィールド科学センター内のパドックにて、コーンサイレージ、乾草および濃厚飼料が混合されたTMRを給与され、自由飲水できる状況で飼養されていた。実験内容は帯広畜産大学の実験倫理委員会にて承認されている。

3-3-2. 実験方法

自然発情開始後、12時間ごとに超音波画像診断装置を用いて卵巢を観察し、排卵前卵胞の消失を確認した時点を Day 0 とした。Day 0 から 4 にかけて超音波画像診断装置を用いて W1DF および黄体の観察を行った。また、Day 4 の時点で W1DF が黄体と同一卵巢内に存在する個体を共存群、W1DF が黄体と反対側の卵巢に存在する場合を非共存群と分類した。また、Day 0 から 4 にかけて連日正中尾静脈より採血を行った。そして、Day 4 に W1DF の卵胞液および顆粒層細胞の回収を経腔卵胞吸引法により行った。

5頭の供試牛は、ラテン格子法によるクロスオーバー試験を行ったため、共存群 (n=5) および非共存群 (n=5) にはそれぞれ5頭の供試牛が1回ずつ含まれている。

3-3-3. 卵胞および黄体形態の観察

主席卵胞の平均直径および黄体の断面積は、5.0MHzのリニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置 (HS - 101V, 本多電子, 愛知, 日本) を用いて測定した。プローブを手指とともに直腸内に挿入し、左右両側卵巢の断層像を観察した。主席卵胞の卵胞断層画像が最大になるよう静止画を記録し、パソコン上に静止画を移動させ、主席卵胞は長径と短径の平均値を平均直径とし、データとして用いた。黄体の断面積は、黄体の断層画像が最大になるよう静止画を記録した。パソコン上に静止画を移動させ、黄体の長径と短径の平均値から平均直径を算出し、 $(\text{平均直径}/2)^2 \times 3.14$ に当てはめ黄体断面積を算出し、データに用いた。

3-3-4. 採血

21G採血針とヘパリン加真空採血管 (ベノジェクト II 真空採血管, TERUMO, 東京, 日本) を用いて尾静脈より10mlの採血を行った。採取した血液は氷水中にて急冷後、4℃で

2,000 g, 20分間遠心し, 血漿分離後, 血中 P_4 および E_2 濃度測定まで -30°C にて凍結保存した。

3-3-5. 主席卵胞の吸引と卵胞液の回収

主席卵胞の吸引, 卵胞液の回収およびその後の処理と保存は, 第2章と同様の方法で行った。

3-3-6. 卵胞液 P_4 , E_2 および A_4 濃度の測定

卵胞液ステロイドホルモンの測定は第2章と同様の方法で行った。この測定法による P_4 , E_2 および A_4 の抽出効率はそれぞれ85%, 81%および84%であった。 P_4 の測定内変動および測定内変動はそれぞれ5.5%および7.4%, E_2 の測定内変動および測定間変動は6.2%および8.6%, A_4 の測定内変動および測定間変動はそれぞれ5.6%および7.8%であった。

3-3-7. 血中 P_4 および E_2 濃度の測定

Day 0から4における血中 P_4 濃度およびDay 4の血中 E_2 濃度はEIAにより測定した。測定方法は第2章と同様の方法で行った。 P_4 の測定内変動および測定間変動はそれぞれ5.2%および7.4%, E_2 の測定内変動および測定間変動はそれぞれ6.0%および8.4%であった。

3-3-8. 統計処理

結果はすべて平均値 \pm 標準誤差で示した。血中 P_4 濃度, 主席卵胞の平均直径および黄体断面積の推移の比較には, 2 元配置分散分析を行い全体の変化の有意性を調べ, 交互作用が有意であったものに対して, Bartlett 検定を行い分散の均一性を検定した後, Post-hoc 検定として Scheffe の多群比較検定を行った。Day 4 における共存群と非共存群間での血中 E_2 濃度および卵胞液中 P_4 , E_2 および A_4 濃度の検定には F 検定により分散の

均一性を検定し、Student の t 検定を行った。 $P < 0.05$ の場合を有意差ありとした。統計処理には統計処理ソフトである StatView (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA) を用いた。

3-4. 結果

3-4-1. 試験 1 結果

本試験で共存群は $n=22$ (平均年齢: 6.2 ± 0.6)、非共存群は $n=22$ (平均年齢: 6.2 ± 0.4) であった。採血を行ったウシ ($n=29$, 平均年齢: 6.1 ± 0.4) の血中 P_4 濃度の平均値は 3.0 ± 0.2 ng/ml であった。また、共存群 ($n=16$, 平均年齢: 6.0 ± 0.7) での血中 P_4 濃度の平均値は非共存群 ($n=13$, 平均年齢: 6.2 ± 0.6) での血中 P_4 濃度の平均値に比べて、有意に低かった (Table 3.1.)。

Day 6 における血中 P_4 濃度と主席卵胞直径との相関関係を調べた結果、有意な相関関係は観察されなかった (Fig. 3.1.)。また、共存群と非共存群をそれぞれ分けて相関関係を調べた場合、両群とも血中 P_4 濃度と主席卵胞直径との間に有意な相関関係は観察されなかった (Fig. 3.2.)。

共存群と非共存群で Day 6 における主席卵胞の平均直径を比較したところ共存群で有意に大きかった (Table 3.2.)。

3-4-2. 試験 2 結果

共存群と非共存群の主席卵胞の平均直径の推移を Fig. 3.3. に示した。共存群で Day 2 から 4 にかけて非共存群に比較して大きく推移していたが、有意な差はみられなかった。共存群と非共存群の黄体断面積および血中 P_4 濃度推移を Fig. 3.4. と Fig. 3.5. にそれぞれ示した。黄体断面積および血中 P_4 濃度推移共に両群間で差はなかった。

Day 4における血中 E₂濃度を比較したところ、共存群で高い傾向を示した。Day 4における卵胞液中の性ステロイドホルモン濃度を Table 3.4.に示した。卵胞液 E₂濃度および A₄濃度に差はみられなかったが、卵胞液 P₄濃度は共存群で有意に高かった。

3-5. 考察

本試験において、試験 1 から Day 6 の血中 P₄濃度は W1DF の直径に影響を与えないことを示したが、W1DF と黄体との卵巣内での共存または非共存関係が主席卵胞の直径や血中 P₄濃度に影響を与えることが示された。さらに、試験 2 では共存群において、血中 E₂濃度および卵胞液中 P₄濃度が高値を示したことから、W1DF の発育や性質を制御する要因として、卵巣内での黄体との共存または非共存状態が大きく影響を及ぼすことが明らかになった。

第 2 章において、W1DF と W2DF の比較では主席卵胞の発育には血中 P₄濃度が大きく関与することを示したが、Day 6 における W1DF の平均直径と血中 P₄濃度に相関関係はみられなかった。自然発情後の排卵確認時に腔内留置型 P₄製剤を挿入したときの、卵巣内で発育する W1DF の発育動態を観察した研究では、挿入しなかった牛に比べ最大に達したときの平均直径が小さいことを報告している (5)。このことは、主席卵胞発育期間中の血中 P₄濃度により主席卵胞の発育が制御されることを意味している。しかしながら、上記の報告は、腔内留置型 P₄製剤を挿入したウシを用いた試験であり、W1DF の発育期間中を通して常に血中 P₄濃度は高値であることから、第 2 章における W2DF の高い血中 P₄濃度条件下での発育環境に類似したものであると考えられる。そのため、自然発育条件下での Day 6 における血中 P₄濃度は、W1DF に大きな影響を与えないと推測された。Ginther ら (42) は未経産牛を用いた試験において、黄体と同一卵巣内で共存する W1DF は反対側の卵巣に存在する W1DF と比較して平均直径が小さいことを報告している。経産非泌乳牛を用いた本試験においても、同様の結果が得られた。カラードプラを用いた

研究で、黄体と W1DF が同一卵巣内で発育した場合、W1DF が黄体と反対側の卵巣で発育した場合に比べ、卵巣内の血管抵抗値が低下しており、W1DF の卵胞壁血流が高いことが示されている (42)。本試験においても同様の現象が生じていたと推測される。過去の報告において、卵胞壁血流は、卵胞の機能を評価するのに有用であるとされているため (2, 42, 84, 86)、共存群の W1DF により多く血液が供給されることは、酸素、栄養さらには LH などの性ホルモンの供給量 (109) を増やし、その結果、卵胞内の細胞の増殖やホルモン産生が増加して、主席卵胞の発育を促進したと考えられる。一方で、本試験では、Day 6 における血中 P₄ 濃度を共存群と非共存群で比較したところ、非共存群で有意に高いことが示された。この結果をもたらした原因は不明であり、本試験では黄体の平均直径のデータを示していないため、黄体の発育に差異が生じたことによる結果であるのか、W1DF が卵巣内に存在することで黄体機能に負の影響を与えた結果なのか、明らかにできなかった。

そこで、試験 2 では、共存群と非共存群での W1DF の性質を詳細に検討するため、経産泌乳牛を用いて、共存群と非共存群の W1DF と黄体の発育動態、血中 P₄ 濃度および卵胞液ステロイドホルモン濃度を比較した。試験 2 では、Day 0 から 4 までの黄体の発育動態および血中 P₄ 濃度推移は共存群と非共存群間で差はなく、血中 P₄ 濃度に関しては、試験 1 と同様の結果は得られなかった。また、W1DF の平均直径推移においても共存群で高めの推移を示していたが、有意な差はみられなかった。この原因として、本試験では卵胞波発現後 5 日目までしか動態を追跡しておらず、試験 1 では 7 日目に焦点を当てていたため、同様の結果が得られなかったと考えられる。Day 4 での W1DF の卵胞液中ステロイドホルモンを測定したところ、共存群で P₄ 濃度が有意に高値を示した。しかしながら、卵胞液 E₂ 濃度や A₄ 濃度に有意な差はみられなかった。卵胞内でステロイドホルモンが合成される過程は、卵胞壁の内卵胞膜細胞において、ステロイドホルモンの基質となるコレステロールが細胞内に取り込まれることから始まり、このコレステロール

はプレグネロンに変換され、その後プレグネロンから P_4 へと変換される (22)。その後、卵胞膜細胞内で P_4 は A_4 に変換される (31, 59)。さらに A_4 は卵胞膜細胞から顆粒層細胞に移行しそこで E_2 に変換される (12) ことで卵胞内でステロイドホルモンが産生されている。今回の結果では、 A_4 および E_2 濃度に差はみられなかったことから、共存群および非共存群それぞれの主席卵胞の卵胞膜細胞および顆粒層細胞のステロイドホルモン産生能に差はないことが推測される。そのため、卵胞液 P_4 濃度が共存群で高い理由として、卵胞での P_4 産生能が高かったためと推測することは難しい。過去の報告で、卵巣内での一つの動脈から黄体とその近隣の卵胞に動脈枝を伸ばしている可能性が、ヒトの卵巣を用いた研究で示されている (75)。このことは、黄体からの血管が同一卵巣内に存在する卵胞壁に存在する毛細血管と吻合することで、黄体から放出された高濃度の P_4 が卵胞に供給され、卵胞液内に浸透している可能性が考えられる。本試験では、その仮説を証明するデータを示していないが、本試験で得られた結果は、この仮説の可能性を示唆するものと考えられる。また、血中 E_2 濃度は共存群で高い傾向を示した。これは、Ginther ら (42) が未経産牛を用いて行った研究で報告しているように、黄体と WIDF が同一卵巣内で共存する場合、WIDF の卵胞壁血流が非共存の場合に比べて大きいことから、本試験においても、共存群での WIDF への血液還流がより大きく、主席卵胞内で産生された E_2 の放出が亢進したことが原因と考えられる。しかしながら、本試験では卵胞壁血流の評価は行っておらず、十分に検証できるデータはない。非泌乳経産牛を用いての卵胞壁血流評価を行い、この原因を明らかにする研究を行っていく必要があると考える。

3-6. 小括

本実験では、非泌乳経産牛を用いて WIDF の発育や性質を制御する要因、また共存群と非共存群での WIDF の性質について調べた。その結果、試験 1 において排卵確認日か

ら7日目のW1DFの平均直径と血中P₄濃度との間に相関関係はないことが示されたが、W1DFが黄体と同一卵巣内で共存すると、共存しないW1DFに比べて排卵確認日から7日目の平均直径が大きくなり、血中P₄濃度も高値を示すことが示された。これらのことから、W1DFの形態には血中P₄濃度ではなく、卵巣内での黄体との位置関係が大きく関与することが示唆された。試験2において、排卵確認日から5日目までの主席卵胞の平均直径および血中P₄濃度に共存群と非共存群との間で差はみられなかったが、卵胞液中のP₄濃度が共存群で高いという結果が得られた。この現象が生じた原因として、卵巣内での近隣の黄体から産生されたP₄が血管を通じて主席卵胞の卵胞壁毛細血管に侵入し、P₄が卵胞液内に浸透したという可能性も考えられるが、卵巣内の血管走行や形成の状況の解明も含めて更なる研究を行っていく必要があると考えられる。

Table 3.1. Plasma P₄ concentration on Day 6.

	IG	CG	<i>P</i> -value
P ₄ (ng/ml)	2.7 ± 0.3	3.5 ± 0.3	<i>P</i> < 0.05

Values are mean ± SEM.

IG; Ipsilateral group: Dominant follicle (DF) ipsilateral to the corpus luteum (CL).

CG; Contralateral group: DF contralateral to the CL.

Day0 = The day of the first follicular wave emergence.

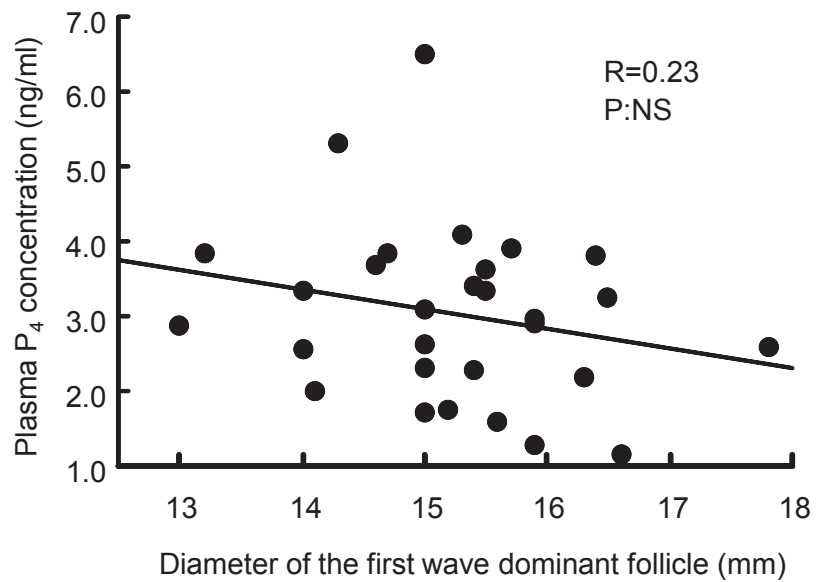


Fig. 3.1.

The linear relationship between plasma P₄ concentration and diameter of the first wave dominant follicle on Day 6. Day 0 = The day of the first follicular wave emergence.

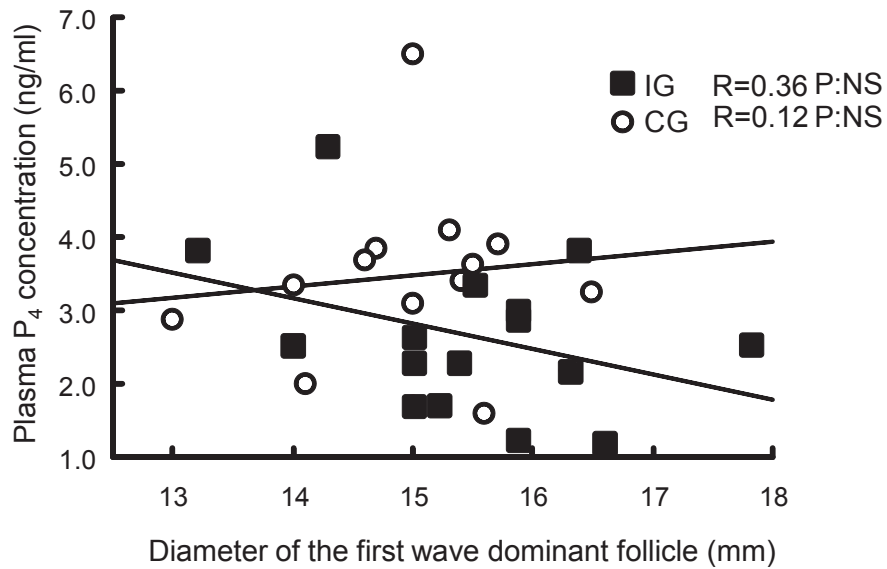


Fig. 3.2.

The linear relationship between plasma P₄ concentration and diameter of the first wave dominant follicle (DF) on Day6 in IG and CG. Day0 = The day of the first follicular wave emergence. IG; Ipsilateral group: DF ipsilateral to the corpus luteum (CL). CG; Contralateral group: DF contralateral to the CL.

Table 3.2. Diameter of the first follicular wave dominant follicle on Day6.

	IG	CG	<i>P</i> -value
Diameter (mm)	15.5 ± 0.2	14.7 ± 0.2	<i>P</i> < 0.01

Values are mean ± SEM.

IG; Ipsilateral group: Dominant follicle (DF) ipsilateral to the corpus luteum (CL).

CG; Contralateral group: DF contralateral to the CL.

Day0 = The day of the first follicular wave emergence.

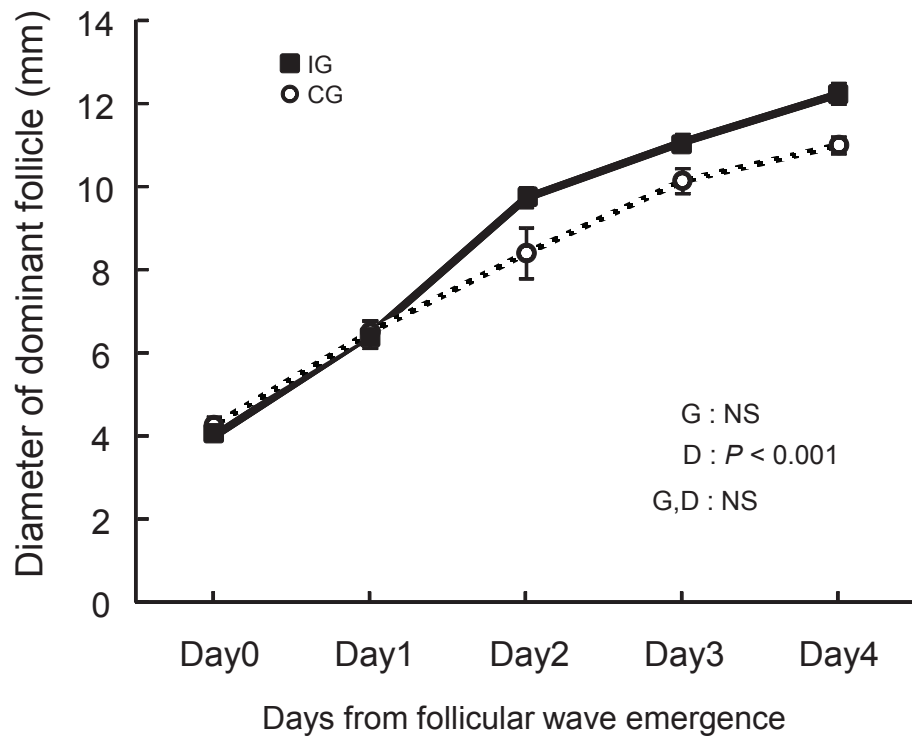


Fig. 3.3.

Comparative changes of the first follicular wave dominant follicle (DF) of IG and CG from Day 0 to 4. Day 0 = The day of the first follicular wave emergence. Effect of group (G) (NS), day (D) ($P < 0.01$) and interaction between group and day (G,D) (NS). IG; Ipsilateral group: DF ipsilateral to the corpus luteum (CL). CG; Contralateral group: DF contralateral to the CL. Values are mean \pm SEM of each point.

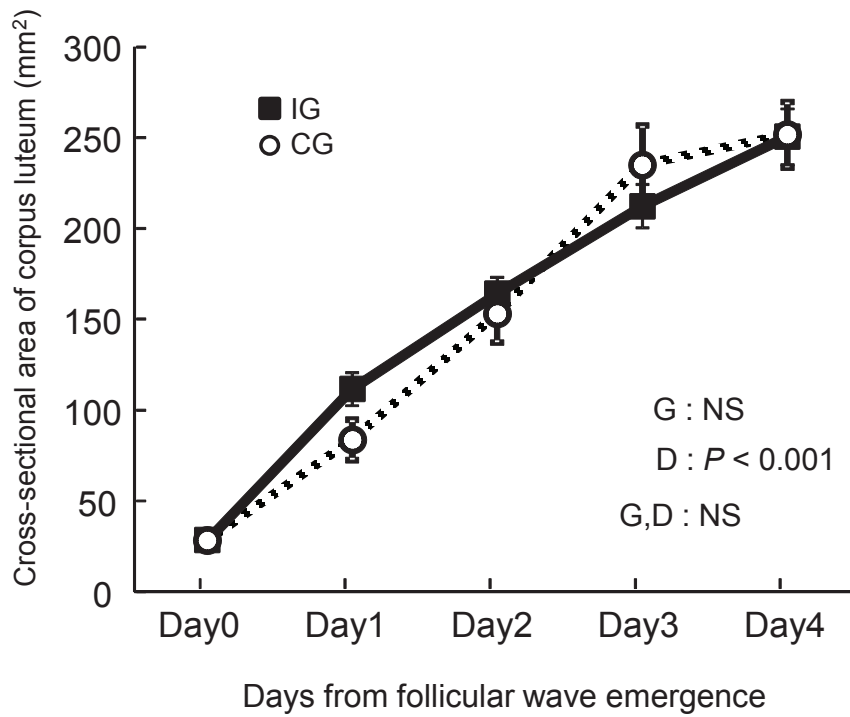


Fig. 3.4.

Comparative changes of cross-sectional area of corpus luteum (CL) of IG and CG from Day 0 to 4. Day 0 = The day of the first follicular wave emergence. Effect of group (G) (NS), day (D) ($P < 0.001$) and interaction between group and day (G,D) (NS). IG; Ipsilateral group: Dominant follicle (DF) ipsilateral to the CL. CG; Contralateral group: DF contralateral to the CL. Values are mean \pm SEM of each point.

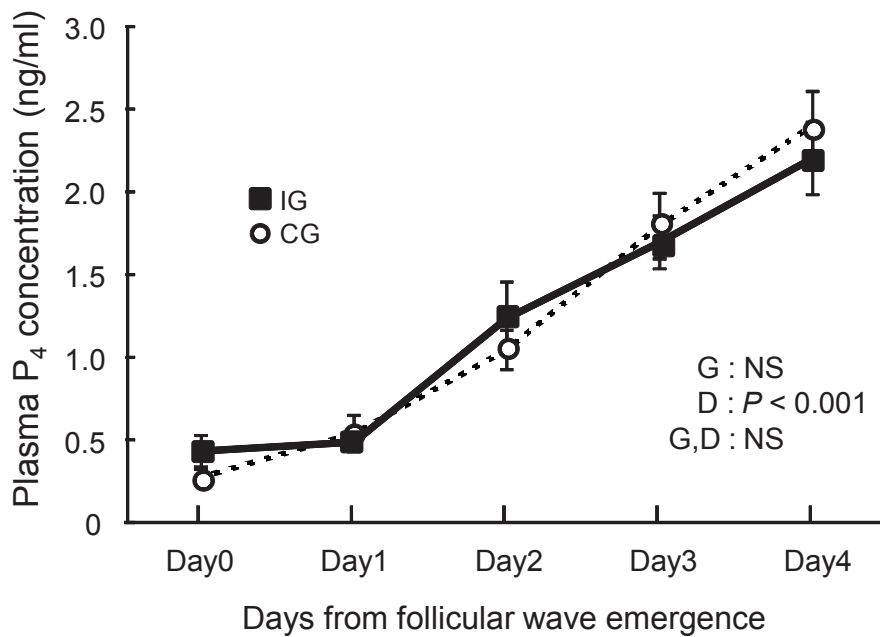


Fig. 3.5.

Comparative changes of plasma P₄ concentration of IG and CG from Day 0 to 4. Day 0 = The day of the first follicular wave emergence. Effect of group (G) (NS), day (D) ($P < 0.001$) and interaction between group and day (G,D) (NS). IG; Ipsilateral group: Dominant follicle (DF) ipsilateral to the corpus luteum (CL). CG; Contralateral group: DF contralateral to the CL. Values are mean \pm SEM of each point.

Table 3.3. Plasma E₂ concentration on Day4.

	IG	CG	<i>P</i> -value
E ₂ (pg/ml)	1.69 ± 0.12	1.51 ± 0.15	<i>P</i> < 0.1

Values are mean ± SEM.

IG; Ipsilateral group: Dominant follicle (DF) ipsilateral to the corpus luteum (CL).

CG; Contralateral group: DF contralateral to the CL.

Day0 = The day of the first follicular wave emergence.

Table 3.4. Sex steroids concentration in follicular fluid on Day4.

	IG	CG	<i>P</i> -value
P ₄ (ng/ml)	48.8 ± 12.7	16.2 ± 3.2	<i>P</i> < 0.05
E ₂ (ng/ml)	419.2 ± 33.2	339.4 ± 53.5	NS
A ₄ (ng/ml)	84.6 ± 23.1	102.7 ± 40.2	NS

Values are mean ± SEM.

IG; Ipsilateral group: Dominant follicle (DF) ipsilateral to the corpus luteum (CL).

CG; Contralateral group: DF contralateral to the CL.

Day0 = The day of the first follicular wave emergence.

第4章

黄体と同一卵巣内に存在する第1卵胞波主席卵胞(W1DF)
の性質および受胎性に及ぼす影響

4-1. 序論

第3章より、W1DFの発育制御に卵巣内での黄体との共存の有無が重要であることが明らかとなった。そこで、本章ではこの現象が泌乳牛においても同様に起こる現象であるのかを明らかにするために、W1DFと黄体の位置関係がW1DFに与える影響を調べた。これまで、黄体が存在する卵巣と同側の子宮角における子宮内膜の組織中 P_4 濃度は、反対側の子宮角における子宮内膜に比べ高いことが報告されている(20)。また、排卵前卵胞が存在する卵巣と同側の卵管内 E_2 濃度は、反対側のものに比較して高いことが報告されている(99)。これらの事実から、卵巣と同側の子宮角との間には密接な局所のつながりが存在し、子宮が同側の卵巣から分泌される性ステロイドホルモンの影響を強く受けている可能性が示唆される。そこで、人工授精後の受胎率について、共存群と非共存群とで比較し、W1DFと黄体との位置関係がウシの繁殖生理に与える影響を調査した。

4-2. 試験1：泌乳牛におけるW1DFと黄体の共存および非共存関係がW1DFと黄体の発育動態および血中 P_4 濃度推移に及ぼす影響

4-2-1. 供試動物

帯広畜産大学畜産フィールド科学センターにて飼養されている、臨床的に健康で発情周期が正常なホルスタイン種経産泌乳牛($n=30$, 平均産次: 2.2 ± 0.2 , 平均分娩後日数: 99.9 ± 8.0 , 平均日乳量: 37.6 ± 1.6 kg)を用いた。供試した個体は、分娩後に代謝性疾患や繁殖障害で治療歴のないものである。

4-2-2. 実験方法

自然発情発見後、24時間毎に直腸検査または超音波画像診断装置を用いて排卵の確認を行った。排卵確認日をDay 0とした。Day 2, 4, 6, 8および10の間に超音波画像診断

装置を用いて卵巢の観察を行った。この時、主席卵胞が2つある個体、または主席卵胞が確認されない個体は試験より除外した。また、同じ日に正中尾静脈より採血を行った。

4-2-3. 卵巢の観察

W1DF と黄体の共存または非共存関係の観察には、5.0MHz のリニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置 (HS - 101V, 本多電子, 愛知) を用いた。卵巢観察時に最大直径を有する卵胞を W1DF とし、W1DF が同一卵巢内に黄体と共存する場合を共存群、黄体が存在する卵巢とは反対側の卵巢に存在する場合を非共存群とした。

4-2-4. 卵胞および黄体形態の観察

主席卵胞および黄体の断面積は、5.0MHzのリニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置 (HS - 101V, 本多電子, 愛知) を用いて測定した。プローブを手指とともに直腸内に挿入し、左右両側卵巢の断層像を観察し、主席卵胞および黄体の断層画像が最大になるよう静止画を記録し、パソコン上に静止画を移動させ、主席卵胞は長径と短径の平均値を平均直径とし、データとして用いた。黄体の断面積は、黄体の断層画像が最大になるよう静止画を記録し、パソコン上に静止画を移動させ、黄体の長径と短径の平均値から平均直径を算出し、 $(\text{平均直径}/2)^2 \times 3.14$ に当てはめ黄体断面積を算出し、データに用いた。

4-2-5. 採血

21G採血針とヘパリン加真空採血管 (ベノジェクト II 真空採血管, TERUMO, 東京) を用いて尾静脈より10mlの採血を行った。採取した血液は氷水中にて急冷後、4°Cで2,000 g, 20分間遠心し、血漿分離後、血中P₄濃度測定まで-30°Cにて凍結保存した。

4-2-6. 血中P₄濃度の測定

Day 2, 4, 6, 8および10における血中P₄濃度の測定はEIA法により測定した。測定方法は第2章と同様の方法で行った。血中P₄の測定内変動および測定間変動はそれぞれ5.2%および7.4%であった。

4-2-7. 統計処理

結果はすべて平均±標準誤差で示した。血中 P₄ 濃度, 主席卵胞の平均直径および黄体断面積の推移の比較には, 2 元配置分散分析を行い, 全体の変化の有意性を調べ, 交互作用が有意であったものに対して, Bartlett 検定を行い分散の均一性を検定した後, Pos-hoc 検定として Sheffe の多群比較検定を行った。P < 0.05 の場合を有意差ありとした。統計処理には統計処理ソフトである StatView (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA) を用いた。

4-3. 試験 2 : W1DF と黄体の共存および非共存関係が人工授精後の受胎率に及ぼす影響

4-3-1. 供試動物

帯広畜産大学畜産フィールド科学センターにて飼養されている, 臨床的に健康で発情周期が正常なホルスタイン種経産泌乳牛 (153 頭) と未経産牛 (75 頭) を用いた。試験期間は 2008 年 3 月~2013 年 9 月である。供試した個体は, 分娩後に代謝性疾患や繁殖障害で治療歴のある個体を除いた。解析には, 延べ 238 頭の泌乳牛 [平均分娩後日数 : 119.8 ± 5.2 日, 平均産次 : 2.2 ± 0.1, 平均泌乳量 : 33.9 ± 0.5 kg/日, 平均ボディ・コンデ

イシオン・スコア (BCS) : 2.91 ± 0.02 , 平均体重 : 637.4 ± 4.6 kg; 平均 \pm 標準誤差] および延べ 112 頭の未経産牛 (平均月齢 : 14.2 ± 0.3 ヶ月齢, 平均体重 : 440.6 ± 5.0 kg) を供試した。泌乳牛および未経産牛はコーンサイレージ, グラスサイレージ, 大豆粕, トウモロコシ穀粒および配合飼料を混合した TMR を給与されており, 自由飲水できるフリーストールにて飼養されていた。また, 泌乳牛は 1 日 2 回搾乳されていた。人工授精は, 泌乳牛においては分娩後 60 日から, 未経産牛においては体重が 350 kg 以上になった時点から開始された。

4-3-2. 実験方法

外部発情徴候, テールペイント消失の有無, 膣鏡検査および直腸検査による排卵前卵胞の存在や退行黄体の確認による自然発情発見後に人工授精を実施した。人工授精実施 24 時間後に直腸検査または超音波画像診断装置を用いて排卵の確認を行った。排卵していない場合, 再度人工授精を実施し, 24 時間後に再度排卵確認を行った。この時, 2 回の人工授精実施後に, 排卵していなかった個体は試験より除外した。排卵確認日を Day 0 とし, Day 4 から 8 の間に直腸検査を行い, W1DF および黄体の位置関係を超音波画像診断装置を用いて確認した。この時主席卵胞が 2 つある個体, または主席卵胞が確認されない個体は試験より除外した。人工授精後 40 日目に超音波画像診断装置を用いて妊娠診断を行い, 受胎率を算出した。

4-3-3. 卵巣の観察

W1DF と黄体の共存・非共存関係の観察には, 5.0MHz のリニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置 (HS - 101V, 本多電子, 愛知) を用いた。卵巣観察時に最大直径を有する卵胞を W1DF とし, W1DF が同一卵巣内に黄体と共存する場合を共存群,

黄体が存在する卵巣とは反対側の卵巣に存在する場合を非共存群とした。

4-3-4. 受胎率の算出

人工授精した延べ頭数に対する、その人工授精で妊娠した頭数の割合として、受胎率を算出した。

4-3-5. 統計処理

受胎率の評価には χ 二乗検定およびロジスティック回帰分析を用いた。全てのウシに対する受胎率の評価には χ 二乗検定を用いた。経産泌乳牛と未経産牛の受胎率に及ぼす影響を詳細に評価するために、ロジスティック回帰分析を用いた。経産牛と未経産牛ともに受胎率を従属変数とした。経産牛と未経産牛に共通の独立変数には、同一卵巣内での黄体と W1DF の共存の有無（共存、非共存）、季節（温暖：6～9月、冷涼：10～5月）である。加えて、未経産牛では体重（<441kg, \geq 441kg）を独立変数として、ロジスティック回帰分析を行った。経産泌乳牛では分娩後日数（<120日, \geq 120日）、泌乳量（<34kg/日, \geq 34kg/日）、産次（1, 2, \geq 3）、ボディ・コンディション・スコア（BCS；<3, \geq 3）（27）および体重（<637kg, \geq 637kg）を独立変数に追加してロジスティック回帰分析を行った。泌乳量は月1回行われる牛群検定のデータを使用し、BCSおよび体重は畜産フィールド科学センターで毎月行われる測定で得られたもののうち、人工授精から直近で得られたデータを使用した。泌乳量、BCSおよび体重は正規分布に従っていたため、平均値で2群に分けクラス分けを行った。 $P < 0.05$ を有意差ありとした。全ての検定にはRソフトウェア（version 2.14.0 for Mac OS X.）を用いた。

4-4. 結果

4-4-1. 試験 1 結果

本試験で共存群は $n=16$ (平均分娩後日数 : 104.8 ± 10.5 , 平均産次 : 1.9 ± 0.2 , 平均泌乳量 : 35.5 ± 2.1 kg/日), 非共存群は $n=14$ (平均分娩後日数 : 94.4 ± 12.4 , 平均産次 : 2.6 ± 0.4 , 平均泌乳量 : 39.9 ± 2.3 kg/日) であった。黄体の断面積の推移を Fig. 4.1. に示した。共存群と非共存群間で黄体断面積の推移に差はなかった。主席卵胞の平均直径の推移を Fig. 4.2. に示した。Day 8 で共存群は非共存群に比較して有意に大きく発育していた。また, それぞれの群内での推移を比較したところ, 共存群では Day 4 から 6 および 8 にかけて有意に大きく発育したが, 非共存群では Day 4 から 8 にかけてはじめて有意に大きく発育した。共存群と非共存群で血中 P_4 濃度の推移を比較したところ, 差はみられなかった (Fig. 4.3)。

4-4-2. 試験 2 結果

本試験で, 供試牛全ての総受胎率は 54.0% (189/350), 経産牛での総受胎率は 48.9% (122/238), 未経産牛での総受胎率は 58.9% (67/112) であった。

本試験で経産牛と未経産牛を合わせたときの共存群は $n=184$, 非共存群は $n=166$ であった。経産牛における共存群は $n=129$ (平均分娩後日数 : 115.4 ± 5.7 , 平均産次 : 2.4 ± 0.1 , 平均泌乳量 : 34.9 ± 0.7 kg/日, 平均体重 : 646.7 ± 6.3 kg, 平均 BCS : 2.91 ± 0.03), 非共存群は $n=109$ (平均分娩後日数 : 118.3 ± 5.6 , 平均産次 : 2.1 ± 0.1 , 平均泌乳量 : 32.7 ± 0.7 kg/日, 平均体重 : 626.6 ± 6.5 kg, 平均 BCS : 2.92 ± 0.03) であり, 未経産牛における共存群は $n=55$ (平均体重 : 434.1 ± 6.3 kg, 平均月齢 : 14.1 ± 0.6), 非共存群では $n=57$ (平均体重 : 446.9 ± 8.0 kg, 平均月齢 : 14.2 ± 0.5) であった。

経産牛および未経産牛を合わせ, 共存群と非共存群で受胎率を比較したところ, 共存群で有意に低い受胎率であった [共存群 vs. 非共存群 = 40.2% (74/184) vs. 69.3% (115/166) ; Fig. 4.4.]。また, 経産牛と未経産牛でそれぞれ共存群と非共存群の受胎率を

比較したところ、経産牛と未経産牛ともに共存群で低い受胎率であった〔経産牛；共存群 vs. 非共存群=38.0% (49/129) vs. 67.0% (73/109), 未経産牛；共存群 vs. 非共存群=45.5% (25/55) vs. 73.7% (42/57)〕。また、ロジスティック回帰分析の結果から、本試験では、季節、体重、分娩後日数、乳量、BCSおよび産次は受胎率に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

4-5. 考察

試験1において経産泌乳牛を用いて、WIDFと黄体が同一卵巢内に存在する共存関係の場合と、それぞれが左右の異なる卵巢に存在する非共存関係の場合についてWIDFと黄体の発育動態および血中P₄濃度推移を比較した。その結果、黄体の発育動態と血中P₄濃度動態に差はみられなかったが、共存群のWIDFは大きく発育することが明らかとなった。また、経産泌乳牛および未経産牛を用いて、人工授精後の受胎率を共存群と非共存群で比較したところ、共存群で低下することを明らかにした。

第3章では、非泌乳牛を用いてDay6におけるWIDFの平均直径と血中P₄濃度について共存群と非共存群で比較したところ、共存群で平均直径は大きく、血中P₄濃度は低いという結果を得られた。泌乳牛を用いた本試験では血中P₄濃度に差はなかったが、WIDFの平均直径は共存群で大きくなり、平均直径に関しては同様の結果が得られた。さらに、黄体の平均直径に差はなく、第3章の試験2と同様の結果が得られた。これまで、高泌乳牛の血中P₄濃度は未経産牛に比べて低くなる(78)ことが報告されているが、一方で、非泌乳牛と泌乳牛の発情周期中の血中P₄濃度推移を比較したところ、泌乳牛で黄体期中期において高く推移する(23)という報告もあり、このことは泌乳牛の乳生産に伴う肝臓でのステロイド代謝の違い(100)や排卵前卵胞のサイズが異なることで形成される黄体のサイズが大きくなること(23, 97)に由来すると考えられている。本試験では共存群、非共存群ともに様々な乳量を持った泌乳牛が試験に供試されたため、血中P₄濃度に

関して第3章の試験1と異なる結果が得られたのではないかと推測される。しかし、上記で述べたように本試験では、共存群と非共存群間で血中P₄濃度に差はないにも関わらずW1DFの平均直径が共存群で大きく発育した。未経産牛を用いた試験において、W1DFのサイズは黄体と同一卵巣内に共存する場合と共存しない場合で差はないという報告(40)が存在する。しかし、共存群で大きく発育する(42)という報告も存在し、本試験では後者の結果と一致する結果となった。第3章の試験2では、Day4までの主席卵胞の平均直径の推移に共存群と非共存群で有意な差はないという結果が示され、本試験1で得られた結果と矛盾する結果である。しかし本試験での主席卵胞の平均直径の推移をみるとDay4までは両群間で差がないことから、第3章の試験2においてもDay6以降において共存群で大きく発育した可能性が考えられる。事実、第3章の試験1でDay8において共存群でのW1DFの平均直径が大きかったことからこの仮説は裏付けられる。本試験では、共存群と非共存群との間で血中P₄濃度に差はないにも関わらず、W1DFの平均直径に差が生じたことから、W1DFの直径の差異は血中P₄濃度ではなく、黄体との位置関係に起因することが推測される。カラードプラ画像診断装置を用いた過去の試験では、黄体とW1DFが同一卵巣内で発育している場合、卵巣の血管抵抗値が低く、卵胞壁血流が大きいことを報告している(42)。卵胞壁血流は、選抜される卵胞や閉鎖していく卵胞を評価する指標として用いられており(2, 42)、また、排卵前卵胞の卵胞壁血流と、その後の受胎性(84)や体外受精後の胚の発育率(86)には正の関係が存在することから、卵胞壁血流は卵胞の活力を評価する指標とされている。本試験においても、共存群のW1DFの卵胞壁血流が大きかったことが推測され、共存群のW1DFへ酸素、栄養さらにはホルモンがより多く供給される(109)ことで、発育が大きくなったと推察される。このことは、W1DFの発育や性質に及ぼす要因として、黄体と同一卵巣内で発育するか否かという位置的状況の影響が存在することを示唆している。

過去の報告において、W1DFの発育動態やそれに伴うホルモン動態は詳細に調べられ

てきた。しかしながら、W1DF が繁殖生理、特に受胎性に及ぼす影響に関しては十分に調査されてこなかった。第3章の試験1, 2および本章の試験1から、W1DFの性質は黄体と同一卵巣内で共存するか否かということで異なることが推測される。これまで、黄体が存在する卵巣と同側の子宮角における子宮内膜では、反対側の子宮角における子宮内膜に比べ組織中 P_4 濃度が高いことが報告されている (20)。また、排卵前卵胞が存在する卵巣と同側の卵管内 E_2 濃度は、反対側のものに比較して高いことが報告されている (99)。ウシでは、黄体が形成されている側と同側の子宮角で着床、妊娠しやすいことが知られている (91)。これらの事実から、卵巣と同側の子宮角には密接な局所のつながりが存在することが示唆される。ブタを用いた報告において、卵管に向かう血管の血中 P_4 , A_4 および E_2 濃度は末梢血中の濃度に比較して高いことから、卵巣静脈から子宮や卵管へ血液を供給する血管に連結している卵巣動脈へ性ステロイドホルモンが対向流交換により移行していることが推測されている (47)。試験2において、人工授精後の受胎率は経産牛と未経産牛共に共存群で低下することを示した。また、乳量、産次、分娩後日数、体重に関わらず、共存群で受胎性が低いことから、受胎性を決定する因子として W1DF と黄体での位置関係が大きく影響を与えている可能性が考えられる。発情周期中の血中 E_2 濃度を測定したところ、第1卵胞波が発育する期間に血中 E_2 濃度が上昇することが報告されていることから、W1DF は血中 E_2 濃度を上昇させるに十分な E_2 を産生していることがうかがえる (79)。そのため、W1DF が存在する卵巣と同側の卵管や子宮角では E_2 濃度が高くなると推測される。ウシの卵管上皮細胞を用いた *in vitro* の実験において、 E_2 はエストロゲン受容体 α と P_4 受容体の mRNA 発現量を上昇させるという報告がある (96)。また、ウシの子宮内膜細胞を用いた *in vitro* の実験において、 E_2 はエストロゲン受容体および P_4 受容体発現を上昇させる (102)。これらのことから、 E_2 は卵管や子宮内膜のステロイドホルモン受容体の発現を制御することが示唆される。W1DF が黄体と共存する場合、W1DF から産生、放出される E_2 が受精卵や胚が存在する同側の卵管や子宮

角に対して局所的に作用し妊娠成立に関わる機能に影響を与えることで、妊娠成立に対して負の影響を与えていることが推測される。また、同一卵巣内に存在する WIDF が黄体に対して、黄体形成や P₄ 産生能を抑制する、または黄体の存続期間を短くすることで受胎性が低下している可能性も考えられる。しかし、本章の試験 2 から黄体発育動態や血中 P₄ 濃度に共存群と非共存群で差がみられなかったことから、共存する WIDF による黄体への抑制作用の可能性は低いと考えられる。一方、非泌乳経産牛を用いた第 3 章の試験 1 では共存群で血中 P₄ 濃度が低かったことや、本試験においても発情周期全体を通しての黄体の存続期間を調査していないため、今後更なる研究を行う必要があると考える。

本章では、WIDF や黄体の発育動態および血中 P₄ 濃度を比較することで、黄体と WIDF とが同一卵巣内に共存または共存しないという卵巣内での位置関係が経産泌乳牛における WIDF の発育に関わる要因として重要であることを示した。さらに、その位置関係が受胎性にまで大きく影響を及ぼすことを明らかにし、WIDF の性質および繁殖生理に及ぼす影響を示した。

4-6. 小括

本章では、経産泌乳牛を用いて、WIDF が黄体と同一卵巣内で共存して発育する場合、WIDF の平均直径推移が非共存に比べて大きく発育するが、黄体の発育動態や血中 P₄ 濃度の推移に違いはみられないことを示した。また、人工授精後における WIDF が黄体と共存する場合と非共存の場合でのその後の受胎率を比較したところ、共存群で受胎率が低いことを示し、WIDF の繁殖生理に与える影響を明らかにした。

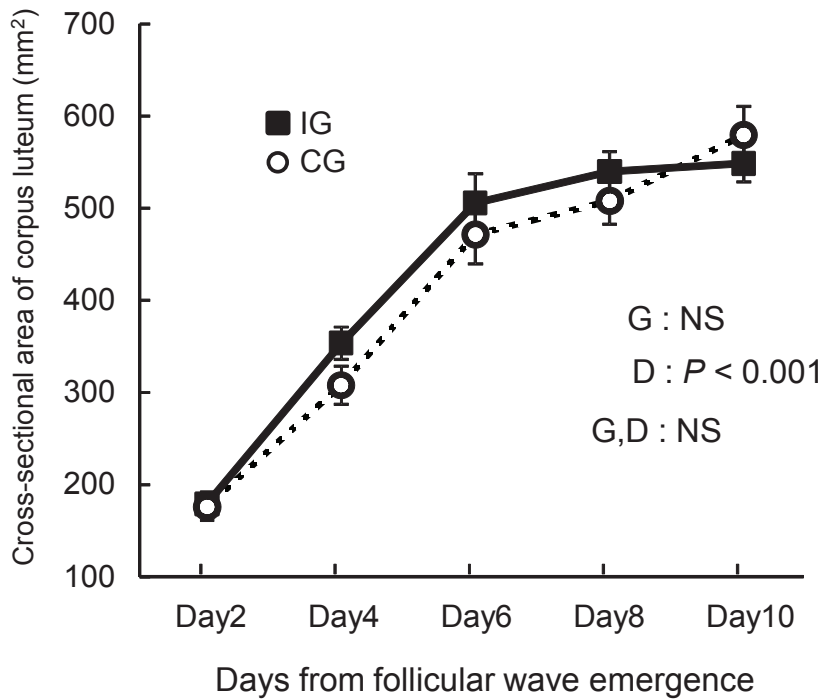


Fig. 4.1.

Comparative changes of corpus luteum (CL) of IG and CG on Day 2, 4, 6, 8, 10. Day 0 = The day of the first follicular wave emergence. Effect of group (G) (NS), day (D) ($P < 0.001$) and interaction between group and day (G,D) (NS). IG; Ipsilateral group: Dominant follicle (DF) ipsilateral to the CL. CG; Contralateral group: DF contralateral to the CL. Values are mean \pm SEM of each point.

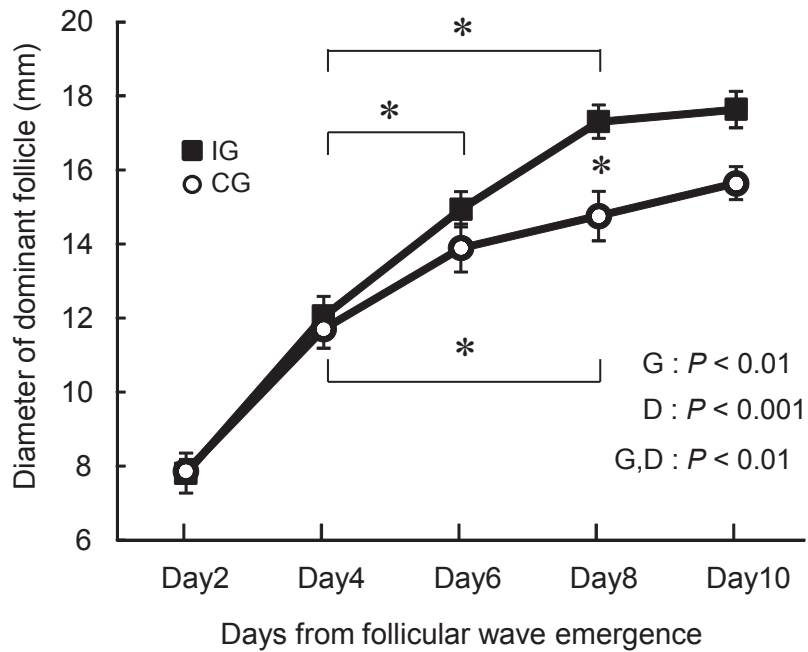


Fig. 4.2.

Comparative changes of the first follicular wave dominant follicle (DF) of IG and CG on Day 2, 4, 6, 8, 10. Day 0 = The day of the first follicular wave emergence. Effect of group (G) ($P < 0.01$), day (D) ($P < 0.001$) and interaction between group and day (G,D) ($P < 0.01$). IG; ipsilateral group: DF ipsilateral to the corpus luteum (CL). CG; contralateral group: DF contralateral to the CL. The asterisk denotes difference between each point, *: $P < 0.05$. Values are mean \pm SEM of each point.

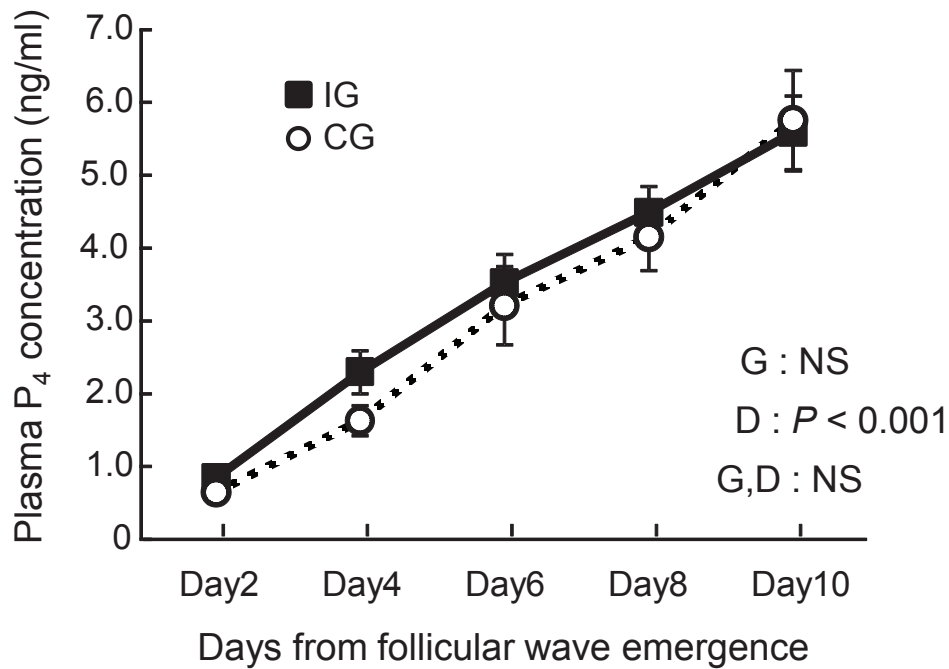


Fig. 4.3.

Comparative changes of plasma P_4 concentration of IG and CG on Day 2, 4, 6, 8, 10. Day 0 = The day of the first follicular wave emergence. Effect of group (G) (NS), day (D) ($P < 0.001$) and interaction between group and day (G,D) (NS). IG; ipsilateral group: Dominant follicle (DF) ipsilateral to the corpus luteum (CL). CG; contralateral group: DF contralateral to the CL. Values are mean \pm SEM of each point.

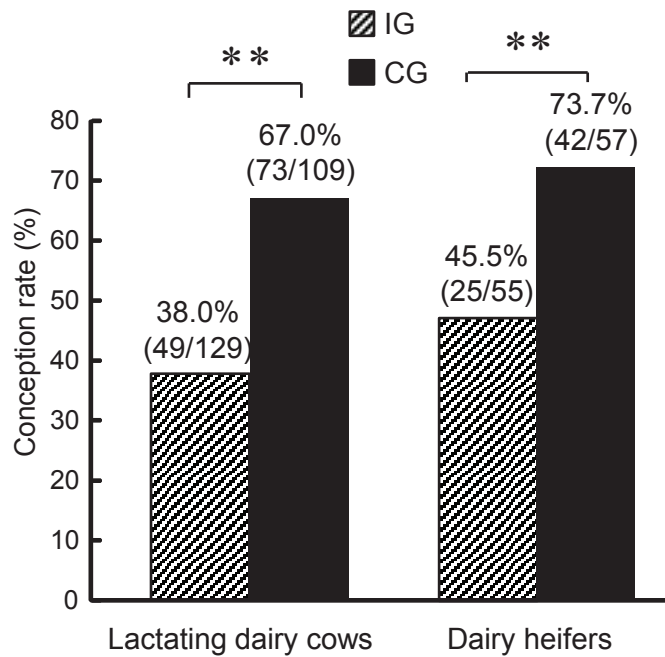


Figure 4.4.

Conception rates in IG and CG. Conception rates were different between IG and CG in both lactating dairy cows and dairy heifers. IG; ipsilateral group: Dominant follicle (DF) ipsilateral to the corpus luteum (CL). CG; contralateral group: DF contralateral to the CL. The asterisk denotes difference between each point, **: $P < 0.01$.

第5章 総合考察

近年の畜産現場における多頭化および乳牛における高泌乳化に伴い、発情発見率の低下および受胎率低下が問題となっている。この問題に対処するために、定時人工授精プログラムの開発を中心とする研究が盛んに行われているが、繁殖成績の向上は十分に達成できていない。このことは、ウシの受胎に関わる繁殖生理に対する理解が未だ不十分であることを示している。そこで、私は、未だ明らかにされていないウシの繁殖生理を明らかにすることを目的にウシの発情周期中に発育する卵胞波、特に、ほとんどが排卵することなく閉鎖してしまう第1卵胞波の主席卵胞に着目した。第1卵胞波は発情終了後の排卵直後から卵巣内で複数の小卵胞の発育が開始されることで発現し、発育開始から2~3日後にその中から最大の卵胞のみが選抜され、主席卵胞となり、それ以外の卵胞は全て閉鎖してしまう。この第1卵胞波主席卵胞（W1DF）について、卵胞の発育動態や選抜のメカニズムを明らかにするために、ホルモン動態を含めてこれまで多くの研究が行われてきたが、W1DF自体の性質の特徴や繁殖生理における意義についてはほとんど研究が行われてこなかった。そこで、このW1DFの性質、発育に関わる要因、さらに、受胎に与える影響を明らかにするために、主席卵胞の発育動態、卵胞壁血流の推移、排卵直前の血中 E_2 濃度、排卵前後における卵胞液中の P_4 、 E_2 および A_4 濃度、排卵後における黄体の発育動態および血中 P_4 濃度の推移、黄体との位置関係、そして受胎性を評価した。

第2章では、経産非泌乳牛を用いてW1DFの特有の性質を明らかにするため、第2卵胞波主席卵胞（W2DF）との比較を行った（W1DF：n=7、W2DF：n=7）。試験1では、Day 3から6（Day 0=卵胞波発現日）までの主席卵胞の発育動態と血中 P_4 濃度の推移、そしてDay 6における卵胞壁血流をカラードプラ画像診断装置を用いて測定した。その結果、W1DFはW2DFと比較して平均直径は大きく推移し、Day 6の平均直径は有意に大きかった。主席卵胞になってからの発育率がW1DFで大きいことが、平均直径の差異をもたらした原因であると考えられた。また、血中 P_4 濃度推移を両群間で比較したとこ

ろ、W1DF が発育する期間の血中 P₄濃度は、W2DF が発育する期間の血中 P₄濃度より低く推移することが示された。未経産牛を用いた試験において、W1DF が発育する時期に腔内留置型 P₄製剤を挿入したところ、挿入しなかった場合に比較して主席卵胞の最大直径が小さくなり、血中 P₄濃度が高い条件下では主席卵胞の発育が抑制されることが示されている。主席卵胞に選抜され、発育が維持されるためには顆粒層細胞で LHr の発現が必須であり、主席卵胞は LH 依存性に発育することが知られている。血中 P₄濃度が低いと、脳下垂体前葉から分泌される LH のパルス頻度が高くなることが知られており、本研究において W1DF の発育が大きいのは高い LH パルス頻度に起因すると推測される。また、本研究では卵胞壁血流において、W1DF で大きいことを示した。主席卵胞が選抜される前後で卵胞壁血流が増加すること、閉鎖する卵胞では卵胞壁血流が消失することから、卵胞壁血流は卵胞の活力の指標となるため、W1DF の活力は W2DF に比較して高いことが推測された。そこで、試験 2 では、PGF_{2α}を Day 6、GnRH を Day 8 に投与し、発情および排卵誘起を行ない、それに伴う W1DF と W2DF の性質を比較した。GnRH 投与時 (Day 8) の血中 E₂濃度を比較したところ、W1DF で有意に高かった。平均直径は W1DF で大きく推移した。また、卵胞壁血流の推移においては、GnRH 投与後の卵胞壁血流は W1DF で有意に高かった。これは GnRH 投与前後での血流増加が W1DF で大きかったことが原因であると考えられる。定時人工授精法の 1 つであるオブシンクを用いた試験において、GnRH 投与時の血中 E₂濃度とその後の受胎可能性に正の相関関係がみられている。さらに、GnRH 投与 26 時間後の卵胞壁血流と人工授精後の受胎の有無およびその排卵前卵胞から得られる卵子の体外受精後の胚発育を比較した研究では、不受胎牛に比較して受胎牛の卵胞壁血流が高く、さらに胚盤胞にまで発育した卵子を有した卵胞で卵胞壁血流が高かった。したがって、W1DF は受胎性の高い活力のある卵胞であると推測される。試験 3 では、W1DF の性質をさらに詳細に評価するために、GnRH 投与前 (W1DF : n=7, W2DF : n=7) と投与 24 時間後 (W1DF : n=6, W2DF : n=6) の卵

胞液中の性ステロイドホルモンと顆粒層細胞で発現する mRNA 発現量を比較した。GnRH 投与前の卵胞については、試験 2 における血中 E_2 濃度の差異に関わる卵胞機能を評価するために、卵胞液 E_2 , A_4 および顆粒層細胞での CYP19A1 mRNA 発現量を比較した。さらに、W1DF にみられた GnRH 投与 24 時間後の卵胞壁血流の高値が、LH サージに対する反応性の差異に起因するのかを調べるため、顆粒層細胞における LHr mRNA 発現量を比較した。その結果、卵胞液 E_2 および A_4 濃度は W1DF で高い値を示したが、アロマターゼ (CYP19A1) の mRNA 発現量に有意な差はなかった。 A_4 は内卵胞膜細胞で産生され、顆粒層細胞でアロマターゼにより E_2 へと変換される。アロマターゼ活性に差異がなかったことから、 E_2 の基質である A_4 を産生する内卵胞膜細胞の機能が高いことが、本研究での W1DF における GnRH 投与時の高い血中 E_2 濃度をもたらしたと推測された。また、LHr mRNA 発現量は W1DF で有意に高かった。ウシの顆粒層細胞において、LH は LHr mRNA 発現量を増加させると報告されている。W1DF は低い血中 P_4 濃度条件下で発育しているため、比較的高い頻度の LH パルスにさらされていることが予想され、このことが顆粒層細胞での高い LHr mRNA 発現量をもたらしたと考えられる。次に、GnRH 投与 24 時間後の顆粒層細胞で発現している mRNA を比較した。LH サージ曝露後の卵胞内では、顆粒層細胞および卵胞膜細胞は黄体細胞へと急速に変化し、 E_2 産生から P_4 産生へと機能がシフトしていく。加えて、黄体形成には血管形成が重要であり、VEGF や FGF は血管形成の中心的な役割を担っている。排卵前卵胞や黄体形成時に、これらの血管形成に関わる因子の機能を阻害するとその後に形成される黄体のサイズや機能が低下することが知られている。さらに、卵胞内では LH サージ曝露後、PG 類 ($PGF_{2\alpha}$, PGE_2 等) の濃度が上昇するが、この時 PGE_2 合成を阻害すると卵胞破裂が阻害されることが報告されている。また、血管拡張因子である NO の合成酵素である iNOS および eNOS は卵胞内で発現している。これらの因子を比較することで、LH サージに対する反応性や W1DF での卵胞壁血流の高値の原因、さらにはその後に形成される黄体の機能に与え

る影響について評価できると考えた。COX-2, PGES および PGFS mRNA 発現量に有意な差はなかった。このことは、排卵過程に必須なこれらの因子の発現量に及ぼす、LH サージに対する反応性に W1DF と W2DF との間で差異はないことを示していると考えられ、これらの因子の発現量の違いが卵胞壁血流の差異をもたらした原因であるとは考えられない。iNOS mRNA 発現量に両群間で差はなかったが、eNOS mRNA 発現量は W1DF で高い傾向を示した。このことから、卵胞の血管拡張作用に W1DF と W2DF との間で差が生じている可能性も考えられる。しかしながら、卵胞壁の血管は内卵胞膜に存在しており、内卵胞膜細胞で発現している血管作動性因子や血管網分布の程度を評価していく必要がある。P₄ 合成に関わるステロイド合成酵素である P450-scc と 3β-HSD mRNA 発現量および VEGF164 mRNA 発現量は W1DF で高かった。これは、排卵後に形成される黄体の血管形成および黄体細胞の P₄ 合成能が高くなる可能性を示している。これらのことから、W1DF の LH サージ曝露に伴う黄体化への反応性は高いことが示唆された。試験 4 では、W1DF と W2DF の排卵後に形成される黄体の形態および機能を評価した (W1DF 黄体 : n=6, W2DF 黄体 : n=6)。黄体断面積、黄体血流および血中 P₄ 濃度は W1DF 排卵後に形成される黄体で高かった。これまで、排卵前卵胞が大きいとその後に形成される黄体が大きくなること、黄体中期において血中 P₄ 濃度は黄体直径の影響を受けることが報告されている。本試験では、排卵前の W1DF の平均直径が W2DF に比べて大きいことから、W1DF の排卵後に形成される黄体の断面積が大きくなり、その結果、血中 P₄ 濃度が高くなったと考えられる。加えて、W1DF の排卵後に形成される黄体は、黄体形成初期における黄体の血流量が大きいことで、黄体形成が促され黄体断面積が大きくなり、さらに血液供給量が大きいことで黄体細胞の P₄ 合成能および黄体から血中への P₄ 放出の亢進が生じ、血中 P₄ 濃度が高く推移した可能性も考えられる。これらのことから、W1DF は W2DF と比べて、卵胞発育および排卵前後の機能が高いことが推測され、それは排卵後に形成される黄体の機能に至るまで影響を与えていることが明らかになった。

第3章では、経産非泌乳牛を用いて WIDF の発育や機能に影響を与える要因について調べた。試験1では、延べ44頭のウシを用いた。まず、Day 6の主席卵胞の平均直径と血中 P₄濃度の相関関係を調べた。次に、主席卵胞の発育が卵巣内の黄体による影響を受ける可能性を考え、主席卵胞と黄体が同一卵巣内で発育する共存群と反対側の卵巣で発育する非共存群の2つに分け、それぞれの群での主席卵胞の平均直径と血中 P₄濃度を比較した。その結果、Day 6の主席卵胞の平均直径は血中 P₄濃度とは相関関係がないことが示され、これは共存群と非共存群に群分けした場合でも同様の結果が得られた。これらのことから、Day 6の血中 P₄濃度は WIDF の発育に影響を与える要因ではないことが明らかとなった。一方で、主席卵胞の平均直径は共存群で非共存群に比べ有意に大きいことが示された。加えて、血中 P₄濃度は非共存群で高い値を示した。試験2では、5頭の経産非泌乳牛を用いて、共存群 (n=5) と非共存群 (n=5) 間での主席卵胞の性質を比較するため、Day 0 から 4 までの主席卵胞と黄体の発育動態、血中 P₄濃度および Day 4の血中 E₂および卵胞液中性ステロイドホルモン (E₂, A₄, P₄) 濃度を測定した。主席卵胞の平均直径は共存群で高く推移したが有意差はなかった。黄体の平均直径および血中 P₄濃度推移に差はなかった。主席卵胞の平均直径と血中 P₄濃度推移に差はなく試験1と異なる結果であった。これは試験1では Day 6 に主席卵胞の平均直径と血中 P₄濃度を測定したため、発育期間の違いによる影響があると考えられる。血中 E₂濃度は共存群で高い傾向を示したが、卵胞液中 E₂および A₄濃度に差はなかった。しかしながら、卵胞液中 P₄濃度は共存群で高かった。黄体と同一卵巣内で共存する WIDF は、卵巣内に単独で存在する WIDF に比べて、平均直径、卵巣への血流量および卵胞壁血流面積が大きいことが報告されていることから、本試験においても共存群での卵巣および卵胞への血流量が大きいことが推測され、酸素、栄養およびホルモンがより卵胞へ供給されることで平均直径が大きくなり、卵胞で産生された E₂がより全身循環中に放出されることで血中 E₂濃度が高くなったと考えられる。一方、血中 P₄濃度が共存群で低かったが、血中 P₄

濃度に差が生じた原因は本研究では明らかにできなかった。黄体機能の評価や共存する卵胞が黄体の機能に影響を与えている可能性も含めて、更なる研究を行う必要があると考えられる。卵胞液中 E_2 および A_4 濃度に差異がなかったことから、共存群と非共存の間で卵胞機能に差異はないと考えられるため、卵胞液 P_4 濃度の差異は近隣の黄体で産生された高濃度の P_4 が卵巣内の血管を介して主席卵胞に到達し侵入したと考えられる。しかしながら、この点に関しても推測の域を越えないため、卵胞機能の差異が存在する可能性も含め更なる研究を行う必要があると考えられる。第3章では、WIDFの性質に影響を及ぼす要因として、同一卵巣内で黄体と共存するか否かという位置関係の要因が大きかったことが明らかになった。

第4章では、第3章で明らかになった現象が、経産泌乳牛においても観察される現象であるか調べた。また、過去の報告から、黄体が存在する卵巣と同側の子宮角の子宮内膜での組織中 P_4 濃度は反対側の子宮内膜に比較して高いこと、排卵前卵胞が存在する側の卵管液中の E_2 濃度が高いことから、卵巣と同側の子宮角には局所的なつながりがあることが考えられる。ウシは排卵した側の子宮角で高率に着床し妊娠に至ることが知られており、人工授精後のWIDFが黄体と共存した場合、何らかの局所的な作用により、その後の受胎性に影響を与える可能性がある。そのため、人工授精後のWIDFと黄体の位置関係を調べ、その後の受胎率を比較した。試験1では、排卵確認日をDay 0とし、Day 2, 4, 6, 8 および 10 に主席卵胞および黄体の平均直径を計測し、さらに採血を行い血中 P_4 濃度の測定を行い、共存群と非共存群間で比較した。主席卵胞の平均直径は共存群でDay 6から大きくなり、Day 8には非共存に比較して有意に大きくなった。黄体の平均直径および血中 P_4 濃度の推移は両群間で差はなかった。血中 P_4 濃度に差がないにもかかわらず、共存群での主席卵胞の平均直径が大きくなったことから、第3章で考察したように、黄体が共存する卵巣で発育する主席卵胞は、卵巣への血流が大きくなることで酸素、栄養およびホルモンなどがより供給されることで発育が促されたと考えられる。試

験2において、人工授精後の受胎率は経産泌乳牛および未経産牛ともに共存群で低下することが明らかになった。さらに、この現象は、季節、分娩後日数、産次の影響を受けないことも明らかになった。この現象は、W1DFが繁殖生理に影響を与えることを明らかにした初めての報告である。第3章の試験2において、W1DFは卵胞内で十分量の E_2 を産生し血中 E_2 濃度に影響を与えることを示したが、ウシにおいて卵巣からの血管が卵管と子宮角先端に連結していることが分かっており、同側の卵管や子宮角に対してより高濃度で影響を与えることが考えられる。また E_2 は子宮内膜細胞に作用して E_2 および P_4 受容体発現に影響を与えることが報告されているため、受精卵が存在する卵管や子宮角内膜に対して高濃度の E_2 が作用することで、胚への発育や受容能に対して影響を与える可能性がある。しかしながら、本試験では受胎性に差異をもたらす機構までを示すことはできなかった。今後は受胎性低下のメカニズムと受胎性向上までを視野に入れた研究を行っていく必要があると考えられる。

以上より、第2章から第4章までに行った研究から、W1DFの発育動態、形態、卵胞壁血流、排卵前後の顆粒層細胞の性質および排卵後に形成される黄体の性質をW2DFと比較した結果、活力の高い卵胞であることが明らかとなり、W1DFが発育する期間の低い血中 P_4 濃度がその原因をもたらしたと推察される。さらに、W1DFについて、黄体と同一卵巣で共存する場合と単独で存在し共存しない場合では、主席卵胞の性質が異なることが示され、卵巣への血流の違いがその差異をもたらすと推測された。また、黄体と卵胞が共存することが人工授精後の受胎率を低下させたことから、ウシの繁殖生理におけるW1DFの新たな役割に関する知見が得られた。

謝辞

本稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導を賜りました帯広畜産大学畜産学科臨床獣医学研究部門 松井基純准教授，羽田真悟助教に心から拝謝し，本論文作成にあたり御校閲頂きました帯広畜産大学 宮原和郎教授，岩手大学 居在家義昭教授，東京農工大学 田中知己准教授，岐阜大学 村瀬哲磨教授に深謝いたします。また，研究遂行にあたり，御協力，御助言頂きました，帯広畜産大学 宮本明夫教授，清水隆准教授，茅野光範講師に深謝いたします。

そして，実験に協力して下さった獣医臨床繁殖学研究室の大学院生，学部学生の皆様に感謝いたします。

最後に，学生生活を長きにわたり支えていただいた両親に最大の感謝の意を申し述べます。

参考文献

1. Acosta, T.J., Berisha, B., Ozawa, T., Sato, K., Schams, D. and Miyamoto, A. (1999). Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles in vitro: effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. *Biol. Reprod.* 61, 1419~1425.
2. Acosta, T.J., Hayashi, K.G., Matsui, M. and Miyamoto, A. (2005). Changes in follicular vascularity during the first follicular wave in lactating cows. *J. Reprod. Dev.* 51, 273~280.
3. Acosta, T.J., Miyamoto, A., Ozawa, T., Wijayagunawardane, M.P. and Sato, K. (1998). Local release of steroid hormones, prostaglandin E₂, and endothelin-1 from bovine mature follicles In vitro: effects of luteinizing hormone, endothelin-1, and cytokines. *Biol. Reprod.* 59, 437~443.
4. Adams, G.P., Jaiswal, R., Singh, J. and Malhi, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology.* 69, 72~80.
5. Adams, G.P., Matteri, R.L. and Ginther, O.J. (1992). Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 96, 627~640.
6. Adams, G.P., Matteri R.L., Kastelic, J.P., Ko, J.C. and Ginther, O.J. (1992). Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 94, 177~188.
7. Ahmad, N., Townsend, E.C., Dailey, R.A. and Inskeep, E.K. (1997). Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles,

- before and after breeding, in beef cows and heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 49, 13~28.
8. Alila, H.W. and Hansel, W. (1984). Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.* 31, 1015~1025.
 9. Badinga, L., Driancourt, M.A., Savio, J.D., Wolfenson, D., Drost, M., De La Sota, R.L. and Thatcher, W.W. (1992). Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 47, 871~883.
 10. Badinga, L., Thatcher, W.W., Diaz, T., Drost, M. and Wolfenson, D. (1993). Effect of environmental heat stress on follicular development in lactating cows. *Theriogenology.* 39, 797~810.
 11. Baird, D.T., Land, R.B., Scaramuzzi, R.J. and Wheeler, A.G. (1976). Endocrine changes associated with luteal regression in the ewe; the secretion of ovarian oestradiol, progesterone and androstenedione and uterine prostaglandin $F_{2\alpha}$ throughout the oestrous cycle. *J. Endocrinol.* 69, 275~286.
 12. Bao, B. and Garverick, H.A. (1998). Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.* 76, 1903~1921.
 13. Beg, M.A., Bergfelt, D.R., Kot, K., Wiltbank, M.C. and Ginther, O.J. (2001). Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol. Reprod.* 64, 432~441.
 14. Bello, N.M., Steibel, J.P. and Pursley, J.R. (2006). Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of ovsynch in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89, 3413~3424.
 15. Bergfeld, E.G., Kojima, F.N., Cupp, A.S., Wehrman, M.E., Peters, K.E., Mariscal, V.,

- Sanchez, T. and Kinder, J.E. (1996). Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17β -estradiol in bovine females. *Biol. Reprod.* 54, 546~553.
16. Bleach, E.C.L., Glencross, R.G. and Knight, P.G. (2004). Association between ovarian follicle development and pregnancy rates in dairy cows undergoing spontaneous oestrous cycles. *Reproduction.* 127, 621~629.
 17. Burns, D.S., Krassel, F.J., Ireland, J.L.H., Knight, P.G. and Ireland, J.J. (2005). Number of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol. Reprod.* 73, 54~62.
 18. Butler, W.R. (1998). Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 81, 2533~2539.
 19. Celik, H.A., Aydm, I., Sendag, S. and Dinc, D.A. (2005). Number of follicular waves and their effect on pregnancy rate in the cow. *Reprod. Domest. Anim.* 40, 87~92.
 20. Cerbito, W.A., Miyamoto, A., Balagapo, C.R. Jr., Natural, N.G., Miyazawa, K. and Sato, K. (1994). Prostaglandin E_2 levels in uterine tissues and its relationship with uterine and luteal progesterone during the estrous cycle in dairy cows. *Theriogenology.* 42, 941~950.
 21. Daray, F.M., Minvielle, A.I., Puppo, S. and Rothlin, R.P. (2004). Vasoconstrictor effects of 8-iso-prostaglandin E_2 and 8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$ on human umbilical vein. *Eur. J. Pharmacol.* 499, 189~195.
 22. Diaz, F.J., Anderson, L.E., Wu, Y.L., Rabot, A., Tsai, S.J. and Wiltbank, M.C. (2002). Regulation of progesterone and prostaglandin $F_{2\alpha}$ production in the CL. *Mol. Cell. Endocrinol.* 31, 65~80.

23. Endo, N., Nagai, K., Tanaka, T. and Kamomae, H. (2012). Comparison between lactating and non-lactating dairy cows on follicular growth and corpus luteum development, and endocrine patterns of ovarian steroids and luteinizing hormone in the estrous cycles. *Anim. Reprod. Sci.* 134, 112~118.
24. Endo, N., Nagai, K., Tanaka, T. and Kamomae, H. (2012). Profiles of ovarian steroids, luteinizing hormone and estrous signs from luteolysis to ovulation in lactating and non-lactating dairy cows. *J. Reprod. Dev.* 58, 685~690.
25. Espey LL. (1980). Ovulation as an inflammatory reaction-a hypothesis. *Biol. Reprod.* 22, 73~106.
26. Espey, L.L. (1994). Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol. Reprod.* 50, 233~238.
27. Ferguson, J.D., Galligan, D.T. and Thomsen, N. (1994). Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 77, 2695~2703.
28. Figueiredo, R.A., Barros, C.M., Pinheiro, I.O.L. and Sole, J.M.P. (1997). Ovarian follicular dynamics in nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology.* 47, 1489~1505.
29. Findlay, J.K. (1986). Angiogenesis in reproductive tissues. *J. Endocrinol.* 111, 357~366.
30. Forde, N., Beltman, M.E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J.F. and Crowe, M.A. (2011). Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 163~169.
31. Fortune, J.E. (1986). Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol. Reprod.* 35, 292~299.
32. Garcia-Ispuerto, I., Roselló, M.A., De Rensis, F. and López-Gatiús, F. (2013). A five-day progesterone plus eCG-based fixed-time AI protocol improves fertility over

- spontaneous estrus in high-producing dairy cows under heat stress. *J. Reprod. Dev.* 17, 544~548.
33. Ginther, O.J. and Hoffman, M.M. (2014). Intraovarian effect of dominant follicle and corpus luteum on number of follicles during a follicular wave in heifers. *Theriogenology*. 82, 169~175.
 34. Ginther, O.J., Beg, M.A., Bergfelt, D.R., Donadeu, F.X. and Kot, K. (2001). Follicle selection in monovular species. *Biol. Reprod.* 65, 638~647.
 35. Ginther, O.J., Beg, M.A., Donadeu, F.X. and Bergfelt, D.R. (2003). Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 239~257.
 36. Ginther, O.J., Bergfelt, D.R., Beg, M.A. and Kot, K. (2001). Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. *Biol. Reprod.* 64, 197~205.
 37. Ginther, O.J., Bergfelt, D.R., Beg, M.A. and Kot, K. (2001). Follicle selection in cattle: relationships among growth rate, diameter ranking, and capacity for dominance. *Biol. Reprod.* 65, 345~350.
 38. Ginther, O.J., Bergfelt, D.R., Kulick, L.J. and Kot, K. (2000). Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biol. Reprod.* 63, 383~389.
 39. Ginther, O.J., Kastelic, J.P. and Knopf, L. (1989). Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 20, 187~200.
 40. Ginther, O.J., Kastelic, J.P. and Knopf, L. (1989). Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. *Theriogenology*. 32, 787~795.
 41. Ginther, O.J., Knopf, L. and Kastelic, J.P. (1989). Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.* 87, 223~230.

42. Ginther, O.J., Rakesh, H.B. and Hoffman, M.M. (2014). Blood flow to follicles and CL during development of the periovulatory follicular wave in heifers. *Theriogenology*. 15, 304~311.
43. Ginther, O.J., Wiltbank, M.C., Fricke, P.M., Gibbons, J.R. and Kot, K. (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*. 55, 1187~1194.
44. 橋爪 力 (2010). 第IX章 人工授精 3) わが国における家畜人工授精の現況. 正木淳二 編 家畜人工授精講習会テキスト 家畜人工授精 編, 改訂版 pp. 291~293. 社団法人 日本家畜人工授精師協会, 東京
45. Hazzard, T.M., Molskness, T.A., Chaffin, C.L. and Stouffer, R.L. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin regulation by gonadotrophin and steroids in macaque granulosa cells during the peri-ovulatory interval. *Mol. Hum. Reprod*. 5, 1115~1121.
46. Hazzard, T.M., Xu, F. and Stouffer, R.L. (2002). Injection of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 into the preovulatory follicle disrupts ovulation and subsequent luteal function in rhesus monkeys. *Biol. Reprod*. 67, 1305~1312.
47. Hunter, R.H., Cook, B. and Poyser, N.L. (1983). Regulation of oviduct function in pigs by local transfer of ovarian steroids and prostaglandins: a mechanism to influence sperm transport. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*. 14, 225~232.
48. Jaiswal, R.S., Singh, J., Marshall, L. and Adams, G.P. (2009). Repeatability of 2-wave and 3-wave patterns of ovarian follicular development during the bovine estrous cycle. *Theriogenology*. 72, 81~90.
49. 片桐成二(2012). 卵子形成と成熟. 中尾敏彦, 津曲茂久, 片桐成二 編 獣医繁殖学 第4版 pp. 49~55. 文永堂出版, 東京
50. Kawate, N., Itami, T., Choushi, T., Saitoh, T., Wada, T., Matsuoka, K., Uenaka, K.,

- Tanaka, N., Yamanaka, A., Sakase, M., Tamada, H., Inaba, T. and Sawada, T. (2004). Improved conception in timed-artificial insemination using a progesterone-releasing intravaginal device and Ovsynch protocol in postpartum suckled Japanese Black beef cows. *Theriogenology*. 15, 399~406.
51. Kindahl, H., Edqvist, L.E., Granstrom, E. and Bane, A. (1976). The release of prostaglandin $F_{2\alpha}$ as reflected by 15-keto-13,14-dihydroprostaglandin $F_{2\alpha}$ in the peripheral circulation during normal luteolysis in heifers. *Prostaglandins*. 11, 871~878.
52. Kojima, N., Stumpf, T.T., Cupp, A.S., Werth, L.A., Roberson, M.S., Wolfe, M.W., Kittok, R.J. and Kinder, J.E. (1992). Exogenous progesterone and progestins as used in estrous synchrony regimens do not mimic the corpus luteum in regulation of luteinizing hormone and 17β -estradiol in circulation of cows. *Biol. Reprod.* 47, 1009~1017.
53. Kulick, L.J., Kot, K., Wiltbank, M.C. and Ginther, O.J. (1999). Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*. 52, 913~921.
54. Lamothe, P., Bousquet, D. and Guay, P. (1977). Cyclic variation of F prostaglandins in the uterine fluids of the cow. *J. Reprod. Fertil.* 50, 381~382.
55. Lopez, H., Satter, L.D. and Wiltbank, M.C. (2004). Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 81, 209~223.
56. Luo, W., Gumen, A., Haughian, J.M. and Wiltbank, M.C. (2011). The role of luteinizing hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 84, 369~378.
57. Lüttgenau, J. and Bollwein, H. (2014). Evaluation of bovine luteal blood flow by using color Doppler ultrasonography. *Reprod. Biol.* 14, 103~109.
58. Lüttgenau, J., Ulbrich, S.E., Beindorff, N., Honnens, A., Herzog, K. and Bollwein, H.

- (2011). Plasma progesterone concentrations in the mid-luteal phase are dependent on luteal size, but independent of luteal blood flow and gene expression in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 125, 20~29.
59. Magoffin, D.A. (2005). Ovarian theca cell. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 37, 1344~1349.
60. Martínez, M.F., Kastelic, J.P., Adams, G.P., Janzen, E., McCartney, D.H. and Mapletoft, R.J. (2000). Estrus synchronization and pregnancy rates in beef cattle given CIDR-B, prostaglandin and estradiol, or GnRH. *Can. Vet. J.* 41, 786~790.
61. McClellan, M.C., Dieckman, M.A., Abel, J.H. Jr. and Niswender, G.D. (1975). Luteinizing hormone, progesterone and the morphological development of normal and superovulated corpora lutea in sheep. *Cell Tissue Res.* 164, 291~307.
62. Mihm, M. and Bleach, E.C. (2003) Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 217~237.
63. 峰岸 敬 (2011). 卵胞発育・成熟と顆粒層細胞. 森 崇英 編 卵子学 pp. 370~378. 京都大学学術出版会, 京都
64. Miyamoto, A., Okuda, K., Schweigert, F.J. and Schams, D. (1992). Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor- β and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. *J. Endocrinol.* 135, 103~114.
65. Moenter, S.M., Brand, R.C. and Karsch, F.J. (1992). Dynamics of gonadotropin releasing hormone (GnRH) secretion during the GnRH surge: insights into the mechanism of GnRH surge induction. *Endocrinology.* 130, 2978~2984.
66. Murphy, M.G., Enright, W.J., Crowe, M.A., McConnell, K., Spicer, L.J., Boland, M.P. and Roche, J.F. (1991). Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of beef heifers. *J. Reprod. Fertil.* 92, 333~338.
67. Nett, T.M., Staigmiller, R.B., Akbar, A.M., Dieckman, M.A., Ellinwood, W.E. and

- Niswender, G.D. (1976). Secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in cycling and pregnant ewes. *J. Anim. Sci.* 42, 876~880.
68. Niswender, G.D., Juengel, J.L., McGuire, W.J, Belfiore, C.J. and Wiltbank, M.C. (1994). Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.* 50, 239~247.
69. Noseir W.M.B. (2003). Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1:50.
70. Perry, G.A., Smith, M.F., Lucy, M.C., Green, J.A., Parks, T.E., MacNeil, M.D., Roberts, A.J. and Geary, T.W. (2005). Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 5268~5273.
71. Peters, M.W., Pursley, J.R. and Smith, G.W. (2004). Inhibition of intrafollicular PGE_2 synthesis and ovulation following ultrasound-mediated intrafollicular injection of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 in cattle. *J. Anim. Sci.* 2004 82, 1656~1662.
72. Pursley, J.R., Mee, M.O. and Wiltbank, M.C. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using $PGF_{2\alpha}$ and GnRH. *Theriogenology.* 44, 915~923.
73. Rahe, C.H., Owens, R.E., Fleeger, J.L., Newton, H.J. and Harms, P.G. (1980). Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology.* 107, 498~503.
74. Rajamahendran, R. and Taylor, C. (1990). Characterization of ovarian activity in postpartum dairy cows using ultrasound imaging and progesterone profiles. *Anim. Reprod. Sci.* 22, 171~180.
75. Redmer, D.A. and Reynolds, L.P. (1996). Angiogenesis in the ovary. *Rev. Reprod.* 1, 182~192.

76. Rhodes, F.M., Fitzpatrick, L.A., Entwistle, K.W. and Death, G. (1995). Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifer before and after nutritional anoestrus. *J. Reprod. Fertil.* 104, 41~49.
77. Santos, J.E., Narciso, C.D., Rivera, F., Thatcher, WW. and Chebel, R.C. (2010). Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93, 2976~2988.
78. Sartori, R., Haughian, J.M., Shaver, R.D., Rosa, G.J. and Wiltbank, M.C. (2004). Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J. Dairy Sci.* 87, 905~920.
79. Savio, J.D., Thatcher, W.W., Badinga, L., de la Sota, R.L., Wolfenson, D. (1993). Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J. Reprod. Fertil.* 97, 197~203.
80. Schally, A.V., Arimura, A., Kastin, A.J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T.W., Nair, R.M., Debeljuk, L. and White, W.F. (1971). Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science.* 173, 1036~1038.
81. Senger, P.L. (2005) . Reproductive cyclicity- The follicular phase In: Senger P.L.,[Ed] *Pathways to Pregnancy and Parturition*, 2nd ed.,pp. 164~187. Current Conceptions Inc., Pullman, Washington.
82. Shimizu, T., Jiang, J.Y., Iijima, K., Miyabayashi, K., Ogawa, Y., Sasada, H. and Sato, E. (2003). Induction of follicular development by direct single injection of vascular endothelial growth factor gene fragments into the ovary of miniature gilts. *Biol. Reprod.* 69, 1388~1393.
83. Shirasuna, K., Watanabe, S., Asahi, T., Wijayagunawardane, M.P., Sasahara, K., Jiang,

- C., Matsui, M., Sasaki, M., Shimizu, T., Davis, J.S. and Miyamoto, A. (2008). Prostaglandin $F_{2\alpha}$ increases endothelial nitric oxide synthase in the periphery of the bovine corpus luteum: the possible regulation of blood flow at an early stage of luteolysis. *Reproduction*. 135, 527~539.
84. Siddiqui, M.A., Almamun, M. and Ginther, O.J. (2009). Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 113, 287~292.
85. Siddiqui, M.A., Ferreira, J.C., Gastal, E.L., Beg, M.A., Cooper, D.A. and Ginther, O.J. (2010). Temporal relationships of the LH surge and ovulation to echotexture and power Doppler signals of blood flow in the wall of the preovulatory follicle in heifers. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 1110~1117.
86. Siddiqui, M.A., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Almamun, M., Beg, M.A. and Ginther, O.J. (2009). Relationship of vascular perfusion of the wall of the preovulatory follicle to in vitro fertilisation and embryo development in heifers. *Reproduction*. 137, 689~697.
87. Silva, L.A., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Beg, M.A. and Ginther, O.J. (2006). Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. *Anim. Reprod.* 3, 339~346.
88. Sirois, J. and Fortune, J.E. (1988). Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39, 308~317.
89. Smith, M.F., McIntush, E.W. and Smith, G.W. (1994). Mechanisms associated with corpus luteum development. *J. Anim. Sci.* 72, 1857~1872.
90. Souza, A.H., Gümen, A., Silva, E.P., Cunha, A.P., Guenther, J.N., Peto, C.M., Caraviello, D.Z. and Wiltbank, M.C. (2007). Supplementation with estradiol-17 β before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the Ovsynch protocol in lactating

- dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 4623~4634.
91. Sreenan, J.M., Beehan, D. and Mulvehill, P. (1975). Egg transfer in the cow: factors affecting pregnancy and twinning rates following bilateral transfers. *J. Reprod. Fertil.* 44, 77~85.
 92. Stevenson, J.S. (2014). Impact of reproductive technologies on dairy food production in the dairy industry. Artificial insemination. In: Lamb, G.C. and DiLorenzo, N. [eds] *Current and Future Reproductive Technologies and World Food Production.* pp.117~119. Springer Science +Business Media, New York.
 93. Stewart, R.E., Spicer, L.J., Hamilton, T.D., Keefer, B.E., Dawson, L.J., Morgan, G.L. and Echternkamp, S.E. (1996). Levels of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins, luteinizing hormone and IGF-I receptors, and steroids in dominant follicles during the first follicular wave in cattle exhibiting regular estrous cycles. *Endocrinology.* 137, 2842~2850.
 94. Sunderland, S.J., Crowe, M.A., Boland, M.P., Roche, J.F. and Ireland, J.J. (1994). Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 101, 547~555.
 95. Suzuki, T., Sasano, H., Takaya, H., Fukaya, T., Yajima, A. and Nagura, H. (1998). Cyclic changes of vasculature and vascular phenotypes in normal human ovaries. *Hum. Reprod.* 13, 953~959.
 96. Ulbrich, S.E., Kettler, A. and Einspanier, R. (2003). Expression and localization of estrogen receptor α , estrogen receptor β and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 84, 279~289.
 97. Vasconcelos, J.L., Sartori, R., Oliveira, H.N., Guenther, J.G. and Wiltbank, M.C. (2001). Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and

- pregnancy rate. *Theriogenology*. 15, 307~314.
98. Wahl, M. (1985). Local chemical, neural, and humoral regulation of cerebrovascular resistance vessels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7 Suppl 3, 36~46.
 99. Wijayagunawardane, M.P., Miyamoto, A., Cerbito, W.A., Acosta, T.J., Takagi, M. and Sato, K. (1998). Local distributions of oviductal estradiol, progesterone, prostaglandins, oxytocin and endothelin-1 in the cyclic cow. *Theriogenology*. 49, 607~618.
 100. Wiltbank, M., Lopez, H., Sartori, R., Sangsritavong, S. and Gümen, A. (2006). Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*. 7, 17~29.
 101. Woad, K.J., Hunter, M.G., Mann, G.E., Laird, M., Hammond, A.J. and Robinson, R.S. (2012). Fibroblast growth factor 2 is a key determinant of vascular sprouting during bovine luteal angiogenesis. *Reproduction*. 143, 35~43.
 102. Xiao, C.W. and Goff A.K. (1999). Hormonal regulation of oestrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells. *J. Reprod. Fertil.* 115, 101~109.
 103. Xu, Z., Garverick, H.A., Smith, G.W., Smith, M.F., Hamilton, S.A. and Youngquist, R.S. (1995). Expression of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage, cytochrome P450 17 α -hydroxylase, and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular wave. *Endocrinology*. 136. 981~989.
 104. Yamagata, Y., Nakamura, Y., Sugino, N., Harada, A., Takayama, H., Kashida, S. and Kato, H. (2002). Alterations in nitrate/nitrite and nitric oxide synthase in preovulatory follicles in gonadotropin-primed immature rat. *Endocr. J.* 49, 219~226.
 105. Yamashita, H., Kamada, D., Shirasuna, K., Matsui, M., Shimizu, T., Kida, K., Berisha, B., Schams, D. and Miyamoto, A. (2008). Effect of local neutralization of basic

- fibroblast growth factor or vascular endothelial growth factor by a specific antibody on the development of the corpus luteum in the cow. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 1449~1456.
106. Yong, E.L., Hillier, S.G., Turner, M., Baird, D.T., Ng, S.C., Bongso, A. and Ratnam, S.S. (1994). Differential regulation of cholesterol side-chain cleavage (P450scc) and aromatase (P450arom) enzyme mRNA expression by gonadotrophins and cyclic AMP in human granulosa cells. *J. Mol. Endocrinol.* 12, 239~249.
107. Yoshioka, K., Suzuki, C., Arai, S., Iwamura, S. and Hirose H. (2001). Gonadotropin-releasing hormone in third ventricular cerebrospinal fluid of the heifer during the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 64, 563~570.
108. Zeitoun, M.M., Rodriguez, H.F. and Randel, R.D. (1996). Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. *Theriogenology.* 45, 1577~1581.
109. Zeleznik, A.J., Schuler, H.M. and Reichert, L.E. Jr. (1981). Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology.* 109, 356~362.