

## 黒毛和種繁殖牛における発情時の累積歩数と受胎性との関係

横尾 正樹<sup>1\*</sup>・田村 有希<sup>1</sup>・星 正人<sup>1</sup>・小池 晶琴<sup>1</sup>・野口 倫子<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 秋田県立大学 生物資源科学部

秋田県南秋田郡大潟村字南 2-2 〒 010-0444

<sup>2</sup> 鹿児島大学 共同獣医学部

鹿児島県鹿児島市郡元一丁目 21-24 〒 890-8580

2013 年 1 月 15 日受付, 2013 年 1 月 29 日受理

### 要 約

本研究では、黒毛和種繁殖牛を用いて、発情時の累積歩数と受胎性との関係について調査した。試験 1 では、発情時の累積歩数と血中プロゲステロン濃度との関係について調査した。試験 2 では、発情時の累積歩数と人工授精後の受胎率との関係について調査した。試験 1 では、供試牛 3 頭において観察された計 11 回の発情を累積歩数の多い発情 (6,500 歩以上, n=6) と累積歩数の少ない発情 (6,500 歩未満, n=5) に分けて、発情後 14 日までの血中プロゲステロン濃度の変化を比較した。その結果、累積歩数の多い発情では、累積歩数の少ない発情よりも発情後の血中プロゲステロン濃度が高く推移することが示された。試験 2 では、黒毛和種繁殖牛 30 頭に対して実施した計 40 回分の人工授精を分析した結果、受胎した 30 回の発情時累積歩数の平均は  $8,085 \pm 453$  歩であった。一方、不受胎であった 10 回の発情時の累積歩数の平均は  $5,066 \pm 603$  歩であり、受胎時よりも累積歩数は有意に少なかった ( $P < 0.05$ )。以上の結果から、発情時の累積歩数が多い個体は、黄体期初期で血中プロゲステロン濃度が大きく上昇し、受胎し易い母体環境であることが示された。発情時の累積歩数を指標にすることで、発情を発見するだけでなく、人工授精前に繁殖牛の受胎性を予測できる可能性が示唆される。

キーワード：ウシ, 発情, プロゲステロン, 歩数計測

東北畜産学会報 62(3): 91 ~96 2013

### 緒 言

効率的な子牛生産を行う上で、繁殖牛の発情発見は極めて重要である。一般的な発情発見は、乗駕行動、外陰部の肥大、粘液の流出、食欲減退、卵巣や子宮の変化などの発情徴候が指標として利用されている。畜産農家における日常的な繁殖管理では、主として外見から判断できる発情徴候を指標にして行われているが、発情は深夜や早朝など視認できない時間帯に始まることも多く、発情の開始時間を正確に把握することは困難である。そのため、発情の見逃しや授精適期の誤認が生じ、しばしば子牛生産効率の低下の原因となっている。受胎率向上の

ためには、授精技術の向上だけではなく、発情をより正確に特定できる管理方法が必要となる。

ウシでは、発情期に見られる活動量の増加を利用して発情を検出する方法が 1970 年代から研究されており、発情時には非発情時と比較して、2 ~ 4 倍の歩数増加が観察できることが報告されている (Kiddy, 1977)。また、Maatje ら (1997) は、歩数計測による発情判定が、受胎性の改善に利用できることを報告している。近年では、パソコンや発信機を利用して自動的に歩数変動を検出するシステムも開発され、その実用性や信頼性について報告されている (Firk ら, 2002; López-Gatius ら, 2005; Roelofs ら, 2005; Sakaguchi ら, 2007)。歩数計測システムによる歩数値と目視による歩数の実測値は相関することも報告されており (Sakaguchi ら, 2007)、このような技術を利用することによって、ウシの発情行動を 24 時間監視することが可能になることから、従来の繁

\* 連絡者：横尾 正樹 (よこお まさき)  
(秋田県立大学 生物資源科学部 アグリビジネス学科)  
〒 010-0444 秋田県南秋田郡大潟村字南 2-2  
Tel. & Fax. 0185-45-3911  
E-mail: myokoo@akita-pu.ac.jp

殖管理で問題となっていた発情の見逃しや授精適期の誤認を減らし、的確な繁殖管理を行うことができると考えられている。

発情期に見られる活動量の増加は、卵胞から分泌されるエストロゲンによって誘起されることが知られており、顕著な発情行動が観察された個体では、排卵卵胞が大きく、血中エストロゲン濃度も高いことが報告されている (Lopes ら, 2007; Perry ら, 2007)。また、排卵卵胞が大きいくほど、排卵後に形成される黄体直径が大きく、黄体から分泌されるプロゲステロン濃度も高いことが報告されている (Vasconcelos ら, 2001)。プロゲステロンは妊娠の維持や成立に関与する重要なホルモンであり、特に、黄体期初期の血中プロゲステロン濃度は、胚の生存や受胎率に大きく影響することが報告されている (Forde ら, 2009)。したがって、これらの報告から、活発で歩数が多い発情では、排卵後に大きく機能的な黄体が形成され、その後の受胎性も良好であることが推測される。

そこで本研究では、発情時に観察される累積歩数と受胎性との関係を明らかにすることを目的として、発情時の累積歩数と血中プロゲステロン濃度の関係について検討した (試験1)。さらに、黒毛和種繁殖牛の発情時の累積歩数と人工授精後の受胎率との関係について調査した (試験2)。

## 材料および方法

### 1. 供試牛

試験1では、秋田県立大学生物資源科学部附属フィールド教育研究センターで飼養されている3頭の黒毛和種繁殖牛を供試した。供試牛は追い込み式牛舎の牛房 (26 m<sup>2</sup>) に2頭の条件で飼養され、試験開始時の平均月齢は 62.0 ± 8.7 ヶ月であった。なお、試験1は秋田県立大学動物実験規定に基づいて実施した。試験2では、岩手県内の牧場で飼養されている30頭の黒毛和種繁殖牛を供試した。供試牛は追い込み式牛舎 (742 m<sup>2</sup>) 内に常時20～30頭の条件で飼養され、試験開始時の平均月齢は 49.2 ± 6.1 ヶ月であった。

### 2. 発情観察

全ての供試牛の発情の特定には、歩数の経時的な変化から発情を判定するシステム (牛歩, (株)コムテック, 宮崎) を利用した (Sakaguchi ら, 2007)。歩数データが無線送信される発信機を供試牛の左右いずれかの前肢副蹄の直上にベルトで固定した。発情開始時刻は、受信機が接続されたパソコンで1時間毎の歩数値を自動記録

し、過去15日間の歩数値から計算された平均歩数値の1.8倍以上の歩数増加が観察された時刻と定義した。また、発情の開始から非発情時の平均歩数値に戻るまでの時間を発情持続時間とし、その期間に観察された歩数値を累積した値を発情時歩数とした。

### 3. 血液採取および血中プロゲステロン濃度の測定

試験1で供試したウシは、発情開始日から14日間、1日1回頸静脈からヘパリンナトリウム加真空採血管を用いて採血を行った。得られた血液は、採取後、ただちに4℃, 3,000 rpm で15分間の遠心分離を行い、血漿を分離し、プロゲステロン測定まで-30℃で凍結保存した。

血中プロゲステロン濃度は、Kaneko ら (2002) の方法にしたがい、プロゲステロン測定キット (DELFLIA Progesterone Reagents, PerkinElmer Inc., U.S.A.) を用いた時間分解蛍光測定法で測定した。すなわち、ジエチルエーテルを用いて抽出作業を行った血漿は、蒸発乾燥後、分析緩衝液に再溶解して測定に供した。洗浄した抗ウサギ IgG コーティングプレートに標準液あるいはサンプル抽出液を25 mL ずつ分注した。さらに、抗プロゲステロン抗体およびユーロピウム標識プロゲステロンを100 mL ずつ重層し、室温で2時間競合反応を行った。反応後、洗浄した各ウェルには増感試薬を100 mL 分注して室温で5分間反応させ、マイクロプレートリーダー (ARVO x4, PerkinElmer) を用いて蛍光強度を測定した。

### 4. 人工授精

試験2で供試したウシは、牛歩システムで発情を判定し1回のみ人工授精を実施した。人工授精後の妊娠判定は、授精後40日から55日に直腸検査により判定した。なお、全ての人工授精は排卵同期化などのホルモン処理を行わない自然発情時授精であった。

### 5. データ解析

各測定値は平均値 ± 標準誤差で示した。異なる2群の平均値の解析には Student's t-test を用い、危険率5%で有意と判定した。すべての解析は、GraphPad Prism (GraphPad Software, U.S.A.) を用いて行った。

## 結果

### 試験1. 発情時の累積歩数と血中プロゲステロン濃度の関係

供試牛3頭で観察された合計11回の発情を調査した結果、発情時の累積歩数の平均値は 6,506 ± 1,032 歩 (1,600

～11,450歩)であった。そこで、観察した発情を、発情時の累積歩数が6,500歩以上を示した発情(高歩数区, n=6)と6,500歩未満であった発情(低歩数区, n=5)の2群に分け、発情後の血中プロゲステロン濃度の変化を比較した(図1)。発情開始から開始後4日目までの血中プロゲステロン濃度は区間に差を認めなかったが、発情開始後5日目、7日目、10日目および13日目の血中プロゲステロン濃度は、高歩数区で低歩数区に比べて有意( $P < 0.05$ )に高値を示し、発情開始後5日目以降では、低歩数区と比較して、高歩数区で血中プロゲステロン濃度が高く推移していた。

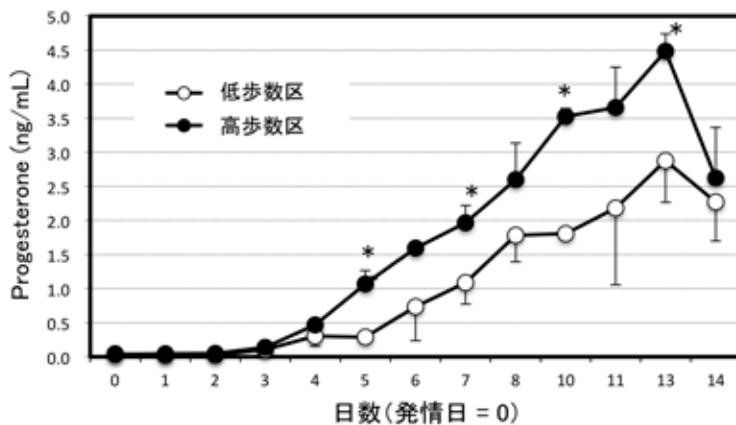


図1. 低歩数区(○)および高歩数区(●)の発情開始後の血中プロゲステロン濃度の変化。アスタリスク(\*)は、実験区間に有意差( $P < 0.05$ )があることを示す。

## 試験2. 発情時の累積歩数と人工授精後の受胎率との関係

人工授精を実施した計40回分の発情を分析した結果、平均発情時歩数は $7,330 \pm 424$ 歩(2,510歩～12,300歩)であった。そのうち、受胎が確認された発情(n=30)では、発情時の累積歩数の平均は $8,085 \pm 453$ 歩(4,190歩～

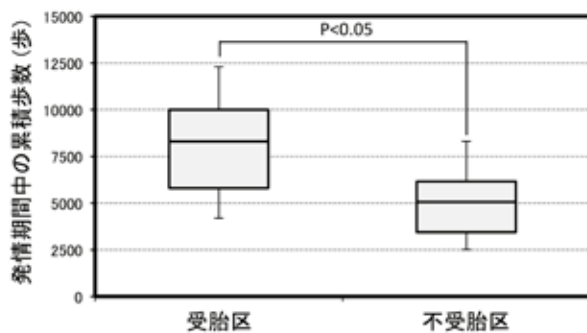


図2. 受胎区および不受胎区の発情時累積歩数。箱の下端, 中央, 上端はそれぞれ25パーセントイル, 中央値, 75パーセントイルを示す。箱の上下のひげはそれぞれ最大値, 最小値までの範囲を示す。

12,300歩), 発情持続時間は $18.5 \pm 0.8$ 時間, 発情開始から人工授精までの時間は $18.0 \pm 1.2$ 時間であった。一方, 人工授精したものの不受胎であった発情(n=10)では, 発情時の累積歩数の平均は $5,066 \pm 603$ 歩(2,510歩～8,310歩), 発情持続時間は $15.8 \pm 1.5$ 時間, 発情開始から人工授精までの時間は $17.0 \pm 1.7$ 時間であった。受胎区の発情時歩数は不受胎区と比較して有意( $P < 0.05$ )に多かった(図2)が, 発情持続時間および発情開始から人工授精までの時間において有意差は認められなかった。

## 考察

ウシの歩数変動を指標にした発情判定は, 1970年代から研究されてきた(Kiddy, 1977)。これは発情したウシは行動量が増加するという発情徴候を利用したもので, 近年では, ウシの歩数を自動的に観察するシステムが開発されている(Firkら, 2002; López-Gatiusら, 2005; Roelofsら, 2005; Sakaguchiら, 2007)。本研究においても, 歩数データが無線送信される歩数観察システム(牛歩, (株)コムテック, 宮崎)を利用したところ, 観察された発情時歩数は最小で1,600歩, 最大で12,300歩と, 発情によって

その値に大きな違いがあるものの, 供試したすべての繁殖牛において, 発情を検出することが可能であった。観測された発情時の累積歩数は, 試験2に比べて試験1では少なかったが, ウシの歩数データは飼育環境が影響することが報告されている(López-Gatiusら, 2005)ことから, 本研究で供試した繁殖牛の飼育面積や飼育規模の違いが影響していると考えられる。

発情時の累積歩数と血中プロゲステロン濃度の関係について調べた結果, 累積歩数が多い発情では, 発情開始後14日までの血中プロゲステロン濃度が高く推移することが明らかとなった(図1)。妊娠の成立や維持には, 黄体から分泌されるプロゲステロンが重要な役割を果たしているが, 黄体期初期の血中プロゲステロン濃度の上昇が, 胚の生存および妊娠の成立に関係が深いことが報告されている(Fordeら, 2009)。また, 排卵卵胞が大きい発情では, その後卵巣に形成される黄体も大きく, 人工授精後の受胎率が高いことが示されている(Vasconcelosら, 2001)。一方, 排卵卵胞のサイズが小さい場合, 排卵後に形成される黄体も小さくなり, 排卵後の血中プロゲステロン濃度の上昇が緩慢になることが報告されており, その結果, 血中プロゲステロン

濃度の最大値が低下し、初期胚の死滅につながるものが示唆されている (Moore ら, 2005; Perry ら, 2005)。本研究では、卵巣動態に関する検討は行っていないが、累積歩数の多い発情では、卵巣内に大きな黄体が形成されていた可能性が高く、その結果として、血中プロゲステロン濃度の上昇につながったと考えられる。つまり、歩数の経時的な観察は、排卵後の黄体機能を予測できる可能性が示唆された。

Perry ら (2007) や Lopes ら (2007) は、顕著な発情が観察された個体では人工授精後の受胎率が高かったことを報告している。本研究においても、不受胎区と比較して、受胎区の発情時の累積歩数が有意に多いことが明らかとなった (図 2)。興味深いことに、不受胎であった発情の累積歩数は最大でも 8,310 歩で、それ以上の発情時歩数を示した発情 (n=14) ではすべてが受胎していた。また、受胎した発情における最小の累積歩数は 4,190 歩で、それ以下の発情 (n=3) では 1 頭も受胎していなかった。試験 1 の結果から、発情時の累積歩数が多い個体では、機能的な黄体が形成される可能性も高いことから、発情時の経時的な歩数計測は、発情検出として利用するだけでなく、受胎しやすい発情を見極める有用な手段となると期待される。ただし、ウシの歩数データは飼育環境が影響することが報告されている (López-Gatius ら, 2005) ことから、これらの数値は全ての飼育環境で指標として適用できるものではない。今後、様々な飼育環境における歩数データと受胎性との関係について十分な検討は必要であると考えられる。

人工授精の際に発情牛の受胎性を予測できれば、子牛を効率的に増産する上で極めて有用であると考えられる。歩数計測の結果、受胎性が高いと判定された場合には、貴重な精液や高品質な精液を積極的に授精するなど、戦略的な人工授精が可能である。一方、受胎性が低いと評価された繁殖牛は、本研究の結果から、機能的な黄体が形成されず、血中プロゲステロン濃度が低くなる可能性が高いため、膣内留置型プロゲステロン製剤を処理することで、黄体期初期の血中プロゲステロン濃度の低下を抑え、人工授精後の胚の死滅を予防することができるかもしれない (Larson ら, 2007; Mann ら, 2006)。さらに、人工授精だけではなく、胚移植による子牛生産においても、発情時の累積歩数が多いウシを受胎牛として選別しておくことで、胚移植の受胎成績を高める可能性も考えられる。今後、さらに試験を重ねる必要はあるが、発情時の歩数値から受胎性を評価することができれば、子牛生産効率の改善に貢献できると考えられる。

以上のように、本研究では、発情時に観察される歩数

値と受胎性との関係を明らかにすることを目的として、黒毛和種繁殖牛の発情時の累積歩数を調査した。その結果、累積歩数の多い発情では、発情後の血中プロゲステロン濃度が高く推移し、人工授精後の受胎性が高いことが示された。本研究の結果から、発情時の累積歩数を観察することで、発情を発見するだけでなく、発情したウシの受胎性を人工授精の実施前に予測できる可能性が示唆された。

## 謝 辞

本研究の遂行に際し、供試動物の飼養管理に多大なるご協力をいただいた秋田県立大学生物資源科学部フィールド教育研究センターの関係各位に深謝する。

## 引用文献

- Firk R, Stamer E, Junge W, Krieter J. Automation of oestrus detection in dairy cows: a review. *Livest. Prod. Sci.*, 75: 219-232. 2002.
- Forde N, Carter F, Fair T, Crowe MA, Evans ACO, Spencer TE, Bazer FW, McBride R, Boland MP, O'Gaora F, Lonergan P, Roche JF. Progesterone-Regulated Changes in Endometrial Gene Expression Contribute to Advanced Conceptus Development in Cattle. *Bio. Reprod.*, 81: 784-794. 2009.
- Kaneko H, Noguchi J, Kikuchi K, Todoroki J, Hasegawa Y. Alterations in peripheral concentrations of inhibin A in cattle studied using a time-resolved immunofluorometric assay: relationship with estradiol and follicle-stimulating hormone in various reproductive conditions. *Biol. Reprod.*, 67: 38-45. 2002.
- Kiddy CA. Variation in physical activity as an indication of estrus in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 60: 235-243. 1977.
- Larson SF, Butler WR, Currie WB. Pregnancy rates in lactating dairy cattle following supplementation of progesterone after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 102: 172-179. 2007.
- Lopes AS, Butler ST, Gilbert RO, Butler WR. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 99: 34-43. 2007.
- López-Gatius F, Santolaria P, Mundet I, Yániz JL. Walking activity at estrus and subsequent fertility in dairy cows. *Theriogenology*, 63: 1419-1429. 2005.
- Maatje K, Loeffler SH, Engel B. Predicting optimal time of

- insemination in cows that show visual signs of estrus by estimating onset of estrus with pedometers. *J. Dairy Sci.*, 80: 1098-105. 1997.
- Mann GE, Fray MD, Lamming GE. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. *Vet. J.*, 171: 500-503. 2006.
- Moore DA, Overton MW, Chebel RC, Truscott ML, BonDurant RH. Evaluation of factors that affect embryonic loss in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 226: 1112-1118. 2005.
- Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, MacNeil MD, Roberts AJ, Geary TW. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102: 5268-5273. 2005.
- Perry GA, Smith MF, Roberts AJ, MacNeil MD, Geary TW. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J. Anim. Sci.*, 85: 684-689. 2007.
- Roelofs JB, van Eerdenburg FJ, Soede NM, Kemp B. Pedometer readings for estrous detection and as predictor for time of ovulation in dairy cattle. *Theriogenology*, 64: 1690-1703. 2005.
- Sakaguchi M, Fujiki R, Yabuuchi K, Takahashi Y, Aoki M. Reliability of estrous detection in Holstein heifers using a radiotelemetric pedometer located on the neck or legs under different rearing conditions. *J. Reprod. Dev.*, 53: 819-828. 2007.
- Vasconcelos JL, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*. 56: 307-314. 2001.

## **Relationship between accumulative pedometer values during estrus period and fertility in Japanese Black cows**

Masaki Yokoo<sup>1</sup>, Yuki Tamura<sup>1</sup>, Masato Hoshi<sup>1</sup>, Akiko Koike<sup>1</sup> and Michiko Noguchi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, Minamiakita-gun, Akita 010-0444, Japan

<sup>2</sup>Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, Korimoto, Kagoshima 890-8580, Japan

Corresponding: Masaki YOKOO, (Tel & Fax: +81-185-45-3911, E-mail: myokoo@akita-pu.ac.jp)

The present study investigates the relationship between accumulative pedometer values (PVs) during the estrus period and fertility, in Japanese Black cows. Cows were housed in a loose-housing barn, and wear the radio device to measure their steps. PVs were recorded via a real-time radiotelemetric pedometer system every one-hour. In experiment 1, the relationship between the accumulative PVs during the estrus period and the plasma progesterone levels was examined. Progesterone levels were measured every day during estrus cycle. The concentration of progesterone rose more slowly and tended to be lower after estrus among cows with low PVs ( $< 6,500$  steps,  $n = 5$ ), compared to those with high PVs ( $\geq 6,500$  steps,  $n = 6$ ). In experiment 2, the relationship between accumulative PVs during the estrus period and fertility following artificial insemination was examined. The mean number of accumulative PVs during the estrus period of pregnant cows ( $8,085 \pm 453$  steps,  $n = 30$ ) was significantly ( $P < 0.05$ ) higher than that of nonpregnant cows ( $5,066 \pm 603$  steps,  $n = 10$ ). These results indicate that the potential of pregnancy is greater among cows with high PVs during estrus. It is suggested that the pedometer system is a useful tool not only for estrus detection, but also in predicting fertility prior to artificial insemination.

**Key words:** cow, estrus, pedometer, progesterone