

北海道で飼育されるホルスタイン種育成雌牛の GnRH に対する LH 放出反応性に及ぼす季節の影響

角川 博哉・高橋ひとみ¹⁾・山田 豊・仮屋 堯由¹⁾

農林水産省北海道農業試験場畜産部 〒062-8555 札幌市豊平区羊ヶ丘1

¹⁾現 農林水産省畜産試験場繁殖部 〒305-0901 茨城県稲敷郡茎崎町池の台2

Influence of season on LH release response after a GnRH injection in Holstein female calves in Hokkaido

Hiroya KADOKAWA, Hitomi TAKAHASHI, Yutaka YAMADA, Takayoshi KARIYA

Department of Animal Production, Hokkaido National Agricultural Experiment Station, 1, Hitsujigaoka, Toyohira-ku, Sapporo 062-8555, JAPAN, and, ¹⁾ Department of Animal Reproduction, National Institute of Animal Industry, 2, Ikenodai, Kukizakicho, Inashiki-gun, Ibaraki-ken 305-0901, Japan.

キーワード：LH 放出反応, 季節, 下垂体, ホルスタイン種雌子牛, GnRH

Key words: LH release response, season, pituitary, Holstein female calves, GnRH

要 約

北海道で飼養されているホルスタイン種育成雌牛の LH 分泌に対する、季節の影響の有無について調査した。供試牛は春期発動前の育成牛（供試時に 7.5 ± 0.7 カ月齢）で、5月下旬（春）・7月下旬（夏）・11月上旬（冬）の各季節毎に4頭ずつ供試し、GnRH 負荷試験を連続する2日間に2回実施した。夏の育成牛では春と冬の育成牛に比べ、第1負荷日および第2負荷日の投与前 LH 濃度とピーク濃度は低く、投与8時間後までの LH 放出反応曲線の下部面積は小さい傾向が観察された。さらに夏の育成牛では春および冬の育成牛に比べ、第1負荷日の GnRH 投与からピークまでの時間は有意に短かった ($P < 0.05$)。以上の結果から北海道内のホルスタイン種育成雌牛の LH 分泌は季節によって異なる可能性が示された。

緒 言

一般には北海道は1年を通じて、ホルスタイン種を飼養するには日本の中でも最適な気候風土であると考えられている。しかし7月下旬～8月上旬の夏期暑熱期間の性周期の乱れや低受胎など、繁殖への季節の影響は北海道内の酪農家において重要な問題となっている。しかし北海道内で飼育される乳牛の生殖生理機構に対する季節の影響について調査した報告はない。

ウシの生殖生理機構のうち性腺刺激ホルモン (LH) 分泌へ影響する季節的変導因子として、これまでに調

べられているのは暑熱などの気温因子と光周期因子である。前者については、キューバ (Solano ら, 1987)、イスラエル (Gilad ら, 1993)、亜熱帯圏での人工気象室を用いた報告 (Rosenberg ら, 1982) があり、暑熱により LH 分泌が抑制されることが知られている。光周期因子の LH 分泌に対する影響については、ウィスコンシン州のホルスタイン種では冬至頃に最も LH 濃度は高く夏至頃に最も低いという報告 (Critser *et al.*, 1983)、ネブラスカ州の卵巣摘出牛では春分頃に LH 濃度は高く秋分頃に最も低いという報告 (Day *et al.*, 1986) などがある。

そこで著者らは、北海道で飼養されるホルスタイン種育成雌牛の LH 分泌に対する季節の影響の有無について調査するため、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) の負荷試験を春、夏および冬の各季節の連続する2日間に2回実施したので、ここに報告する。

材料と方法

供試牛は春期発動前のホルスタイン種育成雌牛（供試時に 7.5 ± 0.7 カ月齢、体重 245 ± 34 kg）で、5月下旬（春）、7月下旬（夏）および11月上旬（冬）の各季節毎に4頭ずつ供試した。供試牛は自然の日長・温湿度下のタイストールまたはパドックで、北海道農業試験場の通常の飼養管理法により飼養した。供試日の牛舎内の日中最高気温、夜間最低温度および日中湿度は、春、夏および冬それぞれ 17.3°C 、 9.2°C および 73%、 31.6°C 、 19.6°C および 53%、 6.9°C 、 2.4°C および 51% であった。

GnRH 負荷試験は、負荷日までの下垂体内 LH 量を

推定するための負荷試験（第1負荷）に続き、負荷後1日で産生される下垂体内LH量を推定するための負荷試験（第2負荷）を翌日に行い、各供試牛ごとに2回行った。負荷には、酢酸フェルチレリン（コンセラルール、武田薬品工業、大阪、以下GnRH製剤）50 μ gを用いた。供試牛の頸静脈にGnRH負荷前日までに、カテーテル（メディカットカテーテルキット14G、アーガイル、東京）を装着し、負荷試験終了までタイストールで飼育した。負荷日にはGnRH製剤投与前に1度、続いて投与後3時間まで30分間隔で、更に8時間まで60分間隔で、血液10mlずつを採取した。血液採取しない間は、ヘパリン添加0.9%生理食塩水でカテーテル内をみたした。血液は採取直後にヘパリン入りの試験管内に入れ、4 $^{\circ}$ Cにて約30分間の遠心分離（12,000 \times g）を行い、血漿を採取した。血漿は測定まで-30 $^{\circ}$ Cで保存した。

血中LH濃度の測定は、クロラミンT法により¹²⁵I標識したウシLH標準品（UCB Bioproducts社、ブリュッセル、ベルギー）、抗ウシLHウサギ血清（UCB Bioproducts社）および自家製の抗ウサギIgGヤギ血清を用い、BF分離後にガンマーカウンターを用いる2抗体ラジオイムノアッセイ法により行った。この測定系の測定内変動は8.8%、測定間変動は12.4%であった。

第1負荷・第2負荷日それぞれの、投与前LH濃度・投与後の最高LH濃度（ピーク濃度）・投与からピーク濃度までの時間（ピーク時間）・投与後8時間のLH放出反応曲線とX軸の間の面積（AUC）の各項目について、季節の影響の有無を、分散分析法とFisher's PLSD検定により解析した（市原、1996；StatViewユーザーフォーラム、1996）。

結果と考察

第1負荷日および第2負荷日の投与前LH濃度は、夏の育成牛では春と冬の育成牛に比べ低い傾向があり、特に第2負荷日の投与前LH濃度は有意に低かった（Table 1, $P < 0.05$ ）。第1負荷日のピーク濃度とAUCは、有意な差は認められないものの、夏の育成牛では春と冬の育成牛に比べ小さい傾向があった。第1負荷日のピーク時間は、夏の育成牛では春と冬の育成牛に比べ有意に短かった（Fig.1, $P < 0.05$ ）。第2負荷日には明瞭なピークは観察されず、ピーク濃度とAUCは春、夏および冬の育成牛の間に有意な差が認められないものの、夏の育成牛では春と冬の育成牛に比べ小さい傾向にあった（Fig.2）。

春および冬の育成牛に比べ夏の育成牛では、第1負荷日および第2負荷日のピーク濃度とAUCが小さい

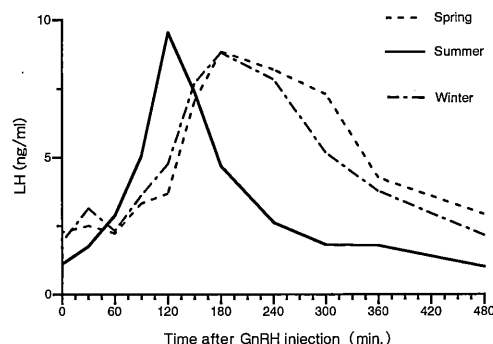


Fig.1 Influence of season on mean concentration of plasma LH before or after an injection of GnRH at the 1st challenge day in Holstein female calves in Hokkaido.

Table 1 Plasma concentration of LH before or after a GnRH injection in Holstein female calves in Hokkaido.

Items	Season		
	Spring (n=4)	Summer (n=4)	Winter (n=4)
First Day			
Basal LH ^a (ng/ml)	2.27 \pm 0.90	1.12 \pm 0.78	1.93 \pm 1.30
Peak Time ^b (min.)	225 \pm 58	113 \pm 15*	165 \pm 58
Peak value of LH (ng/ml)			
AUC ^c (ng \cdot min./ml)	2482 \pm 1249	1516 \pm 498	2319 \pm 1097
Second Day			
Basal LH ^a (ng/ml)	2.34 \pm 0.56	0.85 \pm 0.57*	2.91 \pm 1.51
Peak Time ^b (min.)	135 \pm 156	120 \pm 42	128 \pm 67
Peak value of LH (ng/ml)			
AUC ^c (ng \cdot min./ml)	1562 \pm 737	996 \pm 112	1346 \pm 473

The values is expressed as mean \pm SD.

^aPlasma concentrations of LH immediately before GnRH injection.

^bThe duration from injection to LH peak.

^cThe area under the LH response curve for 8 h after GnRH injection.

* $P < 0.05$ compared with the value for Spring.

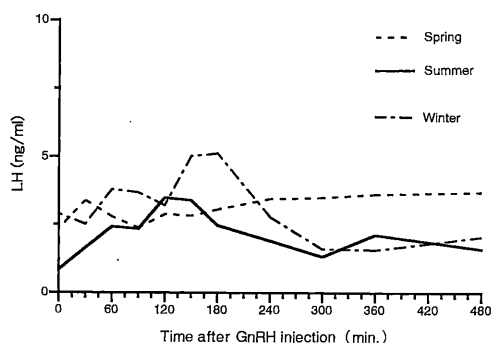


Fig.2 Influence of season on mean concentration of plasma LH before or after an injection of GnRH at the 2nd challenge day in Holstein female calves in Hokkaido.

傾向にあり、夏の育成牛では下垂体内の LH 含量が低下していることが示唆された。本報告では供試数が少ないこと、採血間隔が長いことおよび季節差が有意でないことから、一概にこれを論ずることは出来ない。しかし第 1 負荷日の AUC は、中緯度地域以北であれば夏に減少するという報告 (Younas *et al.*, 1993) が多く、本報告の結果もこれを支持するものである。

ピーク時間は、外因性 GnRH に対して LH サージを起こすために必要なセルフプライミング時間を意味する (Narashimha, 1990)。ピーク時間については、肉牛を用いた熱帯での 1 月と 7 月の比較試験では 7 月の方が長く (Gauthier, 1986)、またキューバでのホルスタイン種未経産牛を用いた乾期 (冬) と雨期 (夏) の比較試験でも、雨期 (夏) の方が長かった (Salono *et al.*, 1990)。これは本報告の第 1 負荷日のピーク時間の結果と逆である。なぜ逆の結果になったのかについては、低緯度地帯と北海道とは季節の影響が異なる可能性や、品種差 (Jimenez *et al.*, 1988)、月齢差などの可能性が考えられた。一方、夏の育成牛でセルフプライミング時間が短いことから、内因性の GnRH と LH の分泌量低下により中枢・視床下部・下垂体・卵巢の軸にアップレギュレーション (森, 1992) が生じ、外因性 GnRH に対する反応が早い可能性が考えられた。

第 1 負荷日および第 2 負荷日共に投与前 LH 濃度は、夏の育成牛では春と冬の育成牛に比べ低かった。投与前 LH 濃度の測定は 1 点のみであり、また LH は下垂体から血液中へとパルス状に分泌されるため、これを論ずることは出来ないが、LH 分泌機構への直接的、間接的な原因の可能性が考えられる。直接的な原因の 1 つは光周期因子の年周変化であり、これまでに Wisconsin 州のホルスタイン種では冬至頃に最も LH 濃度は高く夏至頃に最も低いという報告 (Critser *et al.*, 1983) や、ネブラスカ州の卵巢摘出牛では春分頃に LH 濃度は高く秋分頃に最も低いという報告

(Day *et al.*, 1986) がある。別の直接的な原因は気温因子であり、夏には育成牛に対し暑熱がストレスとして作用し (Wise 1988)、ストレスによる GnRH 分泌抑制 (東村と前多 1992) が起きたため、結果として LH 分泌抑制が起きたという可能性である。また間接的な原因としては夏の暑熱による採食量の低下が考えられる (早坂ら, 1993)。本報告では自然の日照・温湿度下で供試しているため光周期因子と気温因子の影響を分離することが不可能であること、また各季節の 2 日間のみを調べていること、さらに採食量等を調べていないことなどから、光周期因子と気温因子各々の LH 分泌機構への直接的、間接的な影響について詳細に調べる必要がある。

以上の結果から、北海道内のホルスタイン種育成雌牛の LH 分泌は季節によって異なる可能性が示された。

文 献

- Critser, J. K., K. F. Miller, F. C. Gunsett and O. J. Ginter (1983) Seasonal LH profile in ovariectomized cattle. *Theriogenology*, **19**: 181-191.
- Day, M. L., K. Imakawa, P. L. Pennel, D. D. Zalesky, A. C. Clutter, R. J. Kittok and J. E. Kinder (1986) Influence of season and estradiol on secretion of luteinizing hormone in ovariectomized cows. *Biol. Reprod.*, **35**: 549-553.
- Gauthier, D. (1986) The influence of season and shade on oestrous behavior, timing of preovulatory LH surge and the pattern of progesterone secretion in FFPN and Creole heifers in a tropical climate. *Reprod. Nutr. Develop.*, **26**: 767-775.
- Gilad, E., R. Meiden, A. Berman, Y. Graber and D. Wolfenson (1993) Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. *J. Reprod. Fert.*, **99**: 315-321.
- 早坂貴代史, 山岸規昭, 田鎖直澄 (1993) 混合飼料給与時における泌乳牛の採食行動に及ぼす暑熱の影響。日本家畜管理研究会誌, **29**: 75-80.
- 市原清志 (1996) バイオサイエンスの統計学 正しく活用するための実践理論. 48-169. 南江堂. 東京.
- Jimenez, F., C. S. Galina, A. Dunchateau and R. Navarro-Fierro (1988) Levels of LH, progesterone and estradiol-17 β during natural and PGF2 α -induced estrus in Indobrazil and Brown Swiss cows in the tropics. *Anim. Reprod. Sci.*, **16**: 199-206.
- 森純一. (1992) アップレギュレーション. 家畜繁殖学会編. 新繁殖学辞典. 3. 文永堂. 東京.
- Narashimha A. V. R. (1990) Induction of LH and

- FSH release with GnRH in anoestrus cows pretreated with and without oestradiol and GnRH. *Indian. Vet. J.* **67**: 1133-1136.
- Rosenberg, M., Y. Folman, Z. Herz, I. Flamenbaum, A. Berman and M. Kaim (1982) Effect of climatic conditions on peripheral concentrations of LH, progesterone and oestradiol-17 β in high milk-yielding cows. *J. Reprod. Fert.*, **66**: 139-146.
- Salono, S., O. Fernandez and Y. G. Martinez (1990) The sexual comportment of Holstein female in the climatic conditions of Cuba. III. Seasonal variation of luteinizing hormone (LH) moment of ovulation during oestrus in Holstein heifers. *Rev. Cub. Reprod. Anim.*, **16**: 67-76. (Spanish).
- StatView ユーザーフォーラム (1996) Macintosh 版 StatView 4.5 オフィシャルガイドブック. 209-227. 南江堂. 東京.
- 東村博子・前多敬一郎 (1992) 生殖機能の環境による調節, その神経内分泌学的機序. *日畜会報*, **63**: 440-449.
- Wise, M. E., D. V. Armstrong, J. T. Huber, R. Hunter and F. Wiersma (1988) Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. *J. Dairy Sci.*, **71**: 2480-2485.
- Younas, M., J. W. Fuquay, A. E. Smith and A. B. Moore (1993) Estrous and endocrine response of lactating Holsteins to forced ventilation during summer. *J. Dairy Sci.*, **76**: 430-436.