

人工授精後のヒト絨毛性性腺刺激ホルモンおよび プロジェステロン腔挿入剤処置が正常および リピートブリーダー泌乳牛の繁殖成績に与える影響

Effects of human chorionic gonadotropin and intravaginal progesterone device treatment after artificial inseminations on the reproductive performance of normal and repeat breeder lactating dairy cows

Taiki Izumi^{a*}, Ryotaro Miura^{b*}, Natsumi Sobu^a,
Akiya Hirase^a, Osamu Yoneyama^c, Yoh-ichi Miyake^d,
Shingo Haneda^d, Motozumi Matsui^d

a 十勝農業共済組合、〒089-1182 北海道帯広市川西町

b 日本獣医生命科学大学 獣医学部、〒180-8602 東京都武蔵野市境南町

c 豊西家畜診療所、〒089-1183 北海道帯広市日本豊西町

d 帯広畜産大学 獣医学部、〒080-8555 北海道帯広市稲田町

本文のキーポイント

人工授精後のプロジェステロン腔挿入剤 (IVPD：シダー 1900) 処置は、リピートブリーダーの受胎率を向上させます。また、受胎しなかった場合でも再発情を同期化します。

- ・2つのホルモン処置が泌乳乳牛の受胎率および再発情発見率に与える影響を調査しました。
 - ・人工授精後5日目におけるヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) 処置
 - ・人工授精後5～19日目までのIVPD処置
 - ・リピートブリーダーにおいて、IVPD処置は無処置と比較し、受胎率を有意 ($p < 0.05$) に向上させました。(IVPD処置：66.7%、hGC処置：33.3%、無処置：23.1%)
 - ・また、受胎しなかった場合においても、IVPD処置は無処置と比較し、再発情発見率を有意 ($p < 0.05$) に向上させました。(IVPD処置：60.7%、hGC処置：37.8%、無処置：41.4%)
-

抄録

人工授精後5日目 (Day5、なおDay0=人工授精実施日)におけるヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)処置およびDay5～19におけるプロジェステロン腔挿入剤(IVPD: Intravaginal Progesterone Device)処置が泌乳乳牛の受胎率および再発情発見率に与える影響を調査した。Day5に306頭の乳牛を以下の3群に分けた: 無処置群(n=128)、hCG群(n=71): 3,000IUのhCGを筋肉内投与、IVPD群(n=107): Day5～19までIVPDを腔内に留置する。再発情の有無はDay25まで観察を行った。妊娠の有無はDay50からDay60までの間に直腸検査によって診断した。受胎率において、処置および授精回数との間に交互作用が認められた($P<0.01$)。4回以上授精を実施した牛において、IVPD処置(66.7%)は無処置(23.1%)よりも受胎率を有意に向上させた($P<0.05$)。再発情発見率では、IVPD群(60.7%)の方が無処置群(41.4%)よりも有意に高く($P<0.05$)、hCG群(37.8%)よりも高い傾向にあった($P<0.1$)。本試験結果から、受胎率はIVPD処置によって、特に4回以上授精を実施した泌乳乳牛で改善できることが示唆された。さらに、非妊娠牛へのIVPD処置は、授精後25日までに発情をより明瞭に回帰させる可能性が示唆された。

キーワード 受胎率、乳牛、発情発見率、hCG、プロジェステロン腔挿入剤

(J. Reprod. Dev. 66: 523–528, 2020)

緒言

酪農産業において、泌乳牛の繁殖成績の向上および高い繁殖成績の維持が重要な課題となっている[1]。しかしながら、繁殖成績を低下させる要因の1つにリピートブリーダーの存在が挙げられる。リピートブリーダーは、生殖器にいかなる異常もなく、また正常な発情周期を示しているにもかかわらず、3回の人工授精(AI)をおこなっても受胎しない牛と定義される[2]。リピートブリーダーの原因は、黄体形成ホルモンの分泌不足[3]、卵母細胞の受精能低下[4]、子宮内膜機能の変化[5]等、いくつか挙げられるが、AI後の血漿プロジェステロン(P_4)濃度の低下もその1つである[6]。AI後の受胎率を上げるために血漿 P_4 濃度を上昇させる方法として、黄体期前期(AI後3～10日)のヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)処置[7-10]または腔内 P_4 挿入剤(IVPD)による処置[11-13]に関する報告が多数存在する。hCGは牛においても黄体形成ホルモン様の効果を有し[14]、主席卵胞(DF)の排卵および副黄体の形成を誘導し、その後、血漿 P_4 濃度を上昇させる[10]。IVPD処置を施すと、腔内に留置した直後から血漿 P_4 濃度が上昇する[15]。しばらくすると、血漿 P_4 レベルは徐々に低下するが、2週間を

経過しても黄体期と同等のレベルを維持する[16]。さらに、IVPDを抜去すると、血漿 P_4 濃度は急速に元のレベルまで低下する[17]。リピートブリーダーに対する黄体期前期のhCG処置[18]とIVPD処置[19]の有用性はこれまでも調査されてきている。しかしながら、臨床現場において獣医師はどちらの処置がより効果的かを知っておく必要があるため、IVPD処置とhCG処置のリピートブリーダーの受胎率に対する効果を比較することも重要である。過去の研究にてリピートブリーダーに対するこれら2つの処置の効果を比較してはいるものの[20]、正常牛およびリピートブリーダーに対する両処置の比較は十分になされていない。

発情発見率は、非妊娠牛の繁殖成績を改善するための重要な要因の1つである[21]。高泌乳牛では発情発現は弱くその期間も短くなるため[22]、発情発見率の低下につながる。非妊娠牛における発情回帰(再発情)の同期化と発見率を向上させるために、AI後14日から21日までIVPDを留置する方法が示されている[23, 24]。しかしながら、再発情での受胎率は、AI後19日および20日にIVPDを抜去した群と比較して21日および22日に抜去した群の方が低い結果となった[24]。これらの結果から、IVPDを早期に抜去することは再発情時でのAIの受胎

率を高める可能性が示唆された。一方、未經産牛においてAI後5日目にhCG処置すると3つの卵胞ウェーブを有し、また第3卵胞ウェーブの主席卵胞で排卵する牛が多くなること[25]、経産泌乳牛では3つの卵胞ウェーブを有する牛は2つのウェーブを有する牛に比較して、より長い発情周期を有することが知られている[26]。したがって、再発情のタイミングは無処置とhCG処置との間で異なっている可能性があり、それが再発情発見率に影響を及ぼしているかもしれない。しかし、黄体期前期にhCG処置を施した牛における再発情発見率は十分に調査されていない。

本研究では、正常な泌乳牛およびリピートブリーダーに対するAI（初回AI）後5日目のhCG処置およびAI後5日から19日までのIVPD処置の効果を、受胎率、再発情発見率、再発情での受胎率(再AI)、および累積妊娠率(初回AI+再AI)により評価した。本研究ではリピートブリーダーの受胎率および再発情発見率を高めるための効果的な処置方法を紹介する。

材料および方法

供試牛および管理

本研究では、北海道の酪農場で飼養されるホルスタイン種泌乳牛(n=306)を供試した(産歴: 2.6 ± 1.5、泌乳日数: 151.0 ± 81.8、AI実施回数: 2.3 ± 2.0、平均値 ± SD)。試験期間は2009年5月から2011年2月である。すべての乳牛は正常な発情周期を示しており、飼養期間中、臨床上の異常所見は認められなかった。生殖器に異常は認められないにもかかわらず、3回のAI後にも妊娠に至らない乳牛を「リピートブリーダー」と定義した。供試牛はフリーストール牛舎で飼養され、コーンサイレージ、牧草サイレージ、大豆粕、トウモロコシ穀粒、濃厚飼料を配合した混合飼料を与え、自由飲水とした。すべての乳牛に対して、1日3回搾乳を行った。試験期間中の平均年間泌乳量は1頭あたり10,350kgであった。VWPは分娩後40日に設定した。試験プロトコールは、帯広畜産大学の家畜の管理及び使用に

関する基本指針に準拠した。

試験デザイン

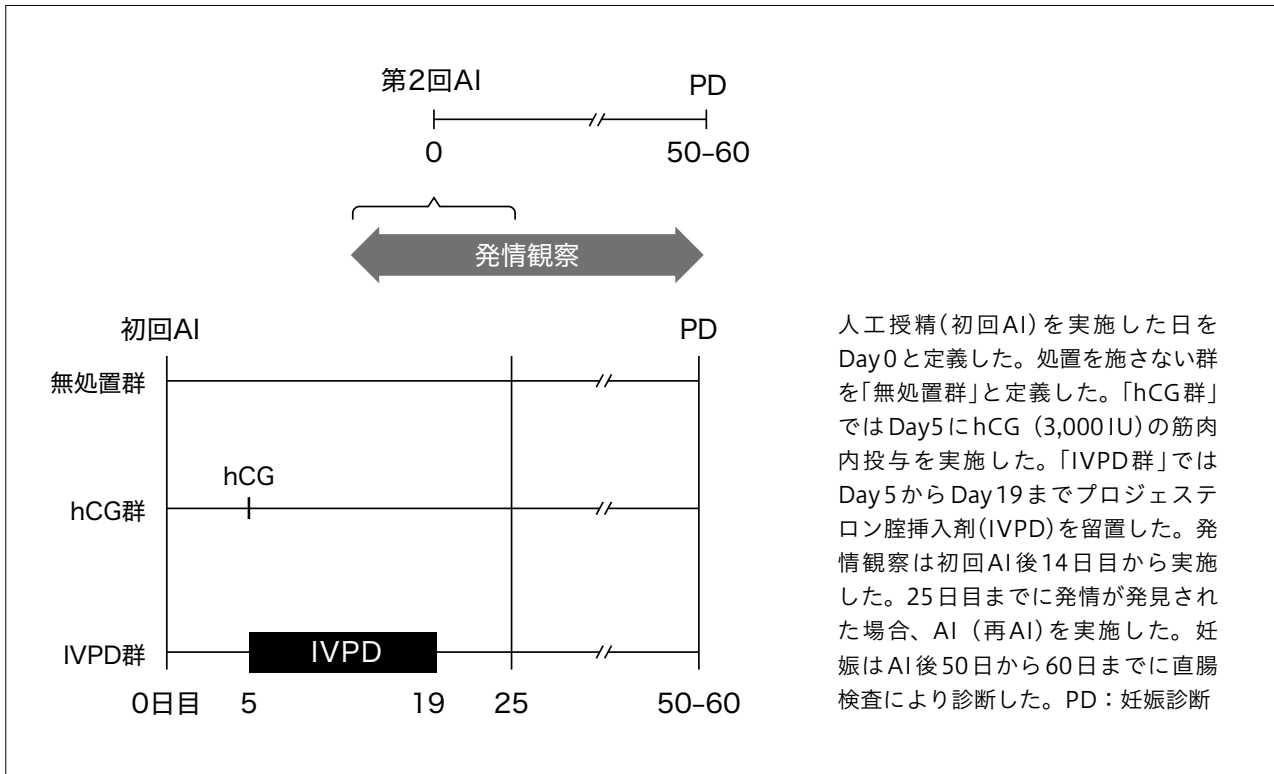
スタンディング、マウンティング、他の乳牛の膣を嗅ぐ行動、膣の腫脹または充血、膣粘液等、農場従業員の目視による観察で、乳牛の自然発情を確認した後、人工授精師または獣医師による直腸検査によって排卵前卵胞および退行黄体を確認し、発情を評価し、人工授精を実施した(初回AI)。Day5(初回AI実施日=0日目)に、乳牛を以下の3群に分けた: 無処置群(n=128): 処置を行わないコントロール群、hCG群(n=71): 3,000IUのhCG(ゲストロン1500、共立製薬株式会社)を筋肉内投与、IVPD群(n=107): Day5~19までP₄膣挿入剤(CIDR: シダー1900、ゾエティス・ジャパン株式会社)を留置。バイアスを少なくするために、各群を産歴(1、2、および>3)で分け、AI回数(≤3、>3)を月ごとに区分した。Day50~60の間に直腸検査により妊娠を判定した。妊娠診断の前に発情が確認された場合、その乳牛は妊娠していないと判断した。受胎率は、妊娠した頭数を本試験に供試した全頭数で除することで求めた。再発情は、初回AI後14日から非妊娠牛で次の発情が観察されるまで、目視による観察で確認した。Day25までに発情が確認された場合、AI(再AI)を実施し、第2回AI後、50日から60日の間に直腸検査により妊娠を診断した。図1に試験デザインの模式図を示した。

血漿P₄濃度測定のため、無処置群(n=8)、hCG群(n=7)、およびIVPD群(n=6)において、Day5およびDay6に尾静脈から血液をヘパリン加採血管(ベノジェクトII、VP-H100K、テルモ株式会社)に採取した。具体的には、3回以上AIを実施した乳牛からDay5における各処置の直前に血液サンプルを採取し、その22~26時間後(Day6)に再び採血した。採取した血液は遠心分離機(2000xg、20分間、4℃)で血漿を分離し、分析するまで-30℃で凍結保存した。

血漿P₄濃度の測定

血漿P₄濃度は、以前に確立した手順[27]に従って二抗体酵素免疫測定法により測定した。測定は、

図1 試験プロトコール



ジエチルエーテルで抽出した後に行った。P₄の回収率は83%であった。検量線の範囲は0.05~50ng/mlであった。ED50値は2.2ng/mlであり、測定内誤差および測定間誤差はそれぞれ6.8%および11.4%であった。

統計解析

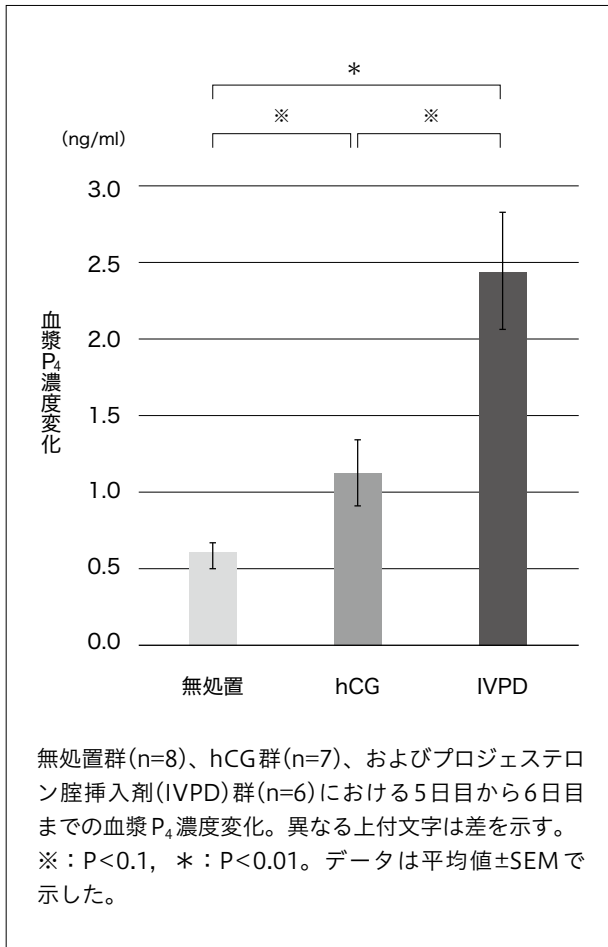
すべての統計解析は、R用グラフィカル・ユーザー・インターフェース(The R foundation for Statistical Computing、オーストリア、ウィーン)を備えたEZR (バージョン1.50、さいたま医療センター、自治医科大学)を用いて実施した。より正確に記すと、生物統計学で活用される統計学的機能を備えたRコマンドの修正バージョンとなる[28]。

Day5からDay6までの血漿P₄濃度の変化、初回AIから再発情までの日数は、シャピロ・ウィルク正規性検定によって正規分布を示すことが確認され、バートレット検定により分散の均一性を検証した。バートレット検定の結果から、血漿P₄濃度の変化および初回AIから再発情までの日数のどちらにおいても、分散は3処置群間で同等ではなかつ

た。したがって、クラスカル・ウォリス検定を利用して各処置(無処置 vs. hCG vs. IVPD)の主効果の判定を行った。処置の主効果が有意な場合、処置群間の有意差を検出するための多重比較検定としてホルム法による補正を行った。

2値化データ(初回AI受胎率、再発情発見率、第2回AI受胎率、および累積妊娠率[初回と再AIで妊娠した乳牛の割合])は、多重ロジスティック回帰分析を用いて解析した。妊娠状態(非妊娠:0、妊娠:1)および再発情検出状態(未検出:0、検出:1)は、従属変数として解析した。再発情の発見効率を検証するため、25日目までに検出した再発情を「検出」、その他を「未検出」と定義した。独立変数は、処置(無処置、hCG、およびIVPD)、産歴(<3、≥3)、初回AI時の泌乳日数(<150日、≥150日)、AI実施回数(≤3、>3)とし、処置と各独立変数間の相互作用は、ロジスティック回帰モデルに組み込んだ。産歴および泌乳日数は、平均値を用いて2つの群に分類した。各アウトカムに対する最終モデルは、P>0.20での独立変数減少法および赤池情報量基準の最低値の判定によって選択した。“処置”の項目は

図 2



必ずすべてのモデルに組み入れた。最終的に選択したロジスティック回帰モデルの変数は、初回AI受胎率については処置、AI実施回数、および処置とAI実施回数との交互作用、再発情発見率については処置、初回AI時の泌乳日数、およびAI実施回数、再AI受胎率については処置、初回AI時の泌乳日数、累積妊娠率については処置、AI実施回数、および処置とAI実施回数との交互作用とした。処置とAI実施回数との交互作用は有意であったため、ポストホック検定としてホルム法による補正を行ったカイ二乗検定により多重比較検定を行い、AI実施回数群ごとの処置間の初回AI受胎率および累積妊娠率を比較した。再発情発見率のモデルでは処置の因子が有意であったため、再発情発見率は多重ロジスティック回帰分析の後、ポストホック検定としてホルム法による補正を行ったカイ二乗検定により多重比較検定を行った。

P<0.05は有意差を示し、P<0.1は傾向を有することとした。血漿P₄濃度変化のデータは、平均値±SEMで表した。

結果

Day5からDay6までの各処置間の血漿P₄濃度の変化

血漿P₄濃度変化の解析結果を図2に示した。処置の効果は有意であった(P<0.001)。IVPD群でのDay5からDay6までの血漿P₄濃度変化は、無処置群よりも有意に高く(P<0.05)、hCG群よりも高くなる傾向にあった(P<0.1)。hCG群での5日目から6日目までの血漿P₄濃度変化は、無処置群よりも高くなる傾向にあった(P<0.1)。

初回AI受胎率に影響を及ぼす要因

ロジスティック回帰分析により、処置(P<0.1)、AI実施回数(P<0.05)、およびそれらの交互作用(P<0.01)の要因が初回AI受胎率と関連していることが明らかになった。AI回数>3の条件下においてIVPD群での初回AI受胎率は、AI回数>3の無処置群よりも高かったが(P<0.05)、AI回数≤3の条件下では各処置群間に差は認められなかった(表1)。

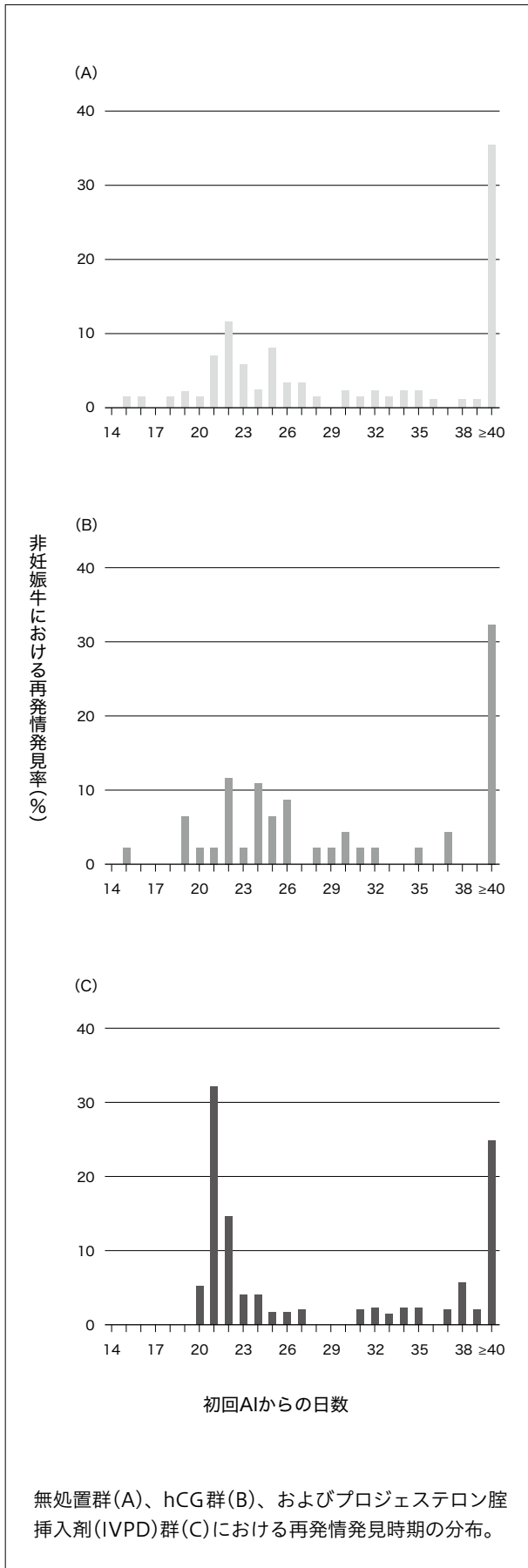
無処置群、hCG群、およびIVPD群の非妊娠牛における初回AIからの再発情日数

再発情発見日の分布を図3に示した。初回AIから再発情までの日数の解析は表2に示した。有意な処置の効果が認められた(P<0.001)。IVPD群の初回AIから再発情までの日数は、無処置群(P<0.01)とhCG群(P<0.05)よりも有意に短縮された。

非妊娠牛の再発情発見率に影響を及ぼす要因

ロジスティック回帰分析により、処置(P<0.05)の要因が再発情発見率に影響を与えていることが明らかになった。IVPD群での再発情発見率は、無処置群よりも有意に高く(P<0.05)、hCG群よりも高くなる傾向にあった(P<0.1) (表2)。

図 3



初回AI時の泌乳日数およびAI実施回数は再発情発見率に影響を与えなかった。

再AI受胎率に影響を及ぼす要因

ロジスティック回帰分析により、各処置およびAI時の泌乳日数は再AI受胎率に関連していないことが明らかになった。無処置群、hCG群、およびIVPD群の再AI受胎率を表2に示した。

累積妊娠率に影響を及ぼす要因

ロジスティック回帰分析により、AI実施回数 ($P < 0.05$) および処置とAI実施回数との交互作用 ($P < 0.05$) の要因が累積妊娠率に関連していることが明らかになった。AI回数 > 3 の条件下において、IVPD群の累積妊娠率は無処置群よりも高かったが ($P < 0.05$)、AI回数 ≤ 3 の条件下では各処置群間に差は認められなかった(表1)。

AI実施回数は累積妊娠率に影響を与えなかった。

考察

本研究により、AI後5日から19日までのIVPD処置がリピートブリーダー (AI回数 > 3) の初回AI受胎率および累積妊娠率を向上させること、さらにAI実施回数にかかわらずIVPD処置により再発情発見率が向上することが明らかになった。一方、hCG処置は初回AI受胎率、再発情発見率、および累積妊娠率に影響を及ぼさなかった。

血漿 P_4 濃度が速やかに上昇し高濃度になると、胚の発達が促進され、インターフェロン τ の分泌が高まる [29]。本研究では、IVPD群でのAI後5日目から6日目までの血漿 P_4 濃度の変化は、無処置群よりも有意に高く、hCG群よりも高くなる傾向にあった。発情5日目からのIVPD処置による血漿 P_4 濃度の上昇は、ウシにおいてトリグリセリド合成やグルコース代謝およびこの取込に関わる子宮内膜の遺伝子の発現を亢進させる [30、31]。IVPD群での血漿 P_4 濃度の急速かつ高い上昇により子宮乳へのエネルギー源や構成要素等に関わる子宮内膜の遺伝子が発現され、それにより胚の発達やインター

表1 無処置群、hCG 群および IVPD 群における初回 AI 受胎率および累積妊娠率に対する AI 実施回数と処置の影響

パラメータ	AI 実施回数	群		
		対照 ¹	hCG ²	IVPD ³
初回 AI 受胎率(%)	≤3	34.3 ^{ab} (35/102)	37.3 ^{ab} (22/59)	41.3 ^{ab} (33/80)
	>3	23.1 ^a (6/26)	33.3 ^{ab} (4/12)	66.7 ^b (18/27)
累積妊娠率(%)	≤3	43.1 ^{ab} (44/102)	42.4 ^{ab} (25/59)	56.3 ^{ab} (45/80)
	>3	30.7 ^a (8/26)	75.0 ^{ab} (9/12)	66.7 ^b (18/27)

1 対照：初回 AI 後に処置なし。

2 hCG：初回 AI から5日後に3,000 IU の hCG を筋肉内投与。

3 IVPD：初回 AI の5日目から19日目までプロゲステロン膣挿入剤 (IVPD) を留置。

同じパラメータ内の上付文字は差を示す。a,b：P < 0.05

フェロン τ の分泌が強化されている可能性がある。hCG 処置は血漿 P_4 濃度を上昇させるが、黄体期前期での上昇はそれほど高くないため、IVPD 処置ほど胚の発達は促進されなかったのかもしれない。本研究では、特に3回を超える AI を実施しても受胎しなかった乳牛の受胎率の向上に IVPD 処置が非常に有効であることが示された。リピートブリーダーの原因には多くの因子が関わり、さまざまな処置の効果が検証されているが、最近の研究で AI 後に単為発生胚を移植することでリピートブリーダーの受胎率が向上することが報告されている [32]。単為発生胚はインターフェロン τ の mRNA 発現量が高く、乳牛の子宮内に単為発生胚を移植すると、白血球中のインターフェロン τ 刺激遺伝子の mRNA の発現量が高いことが報告されている [32]。これらの結果から、低受胎牛の不妊の原因の1つが胚からのインターフェロン τ の分泌不足である可能性が示された。したがって、IVPD 処置により胚発育が促され、それに伴いインターフェロン τ の分泌が増加したことで、本研究のリピートブリーダーの受胎率向上に寄与したと推測された。AI 後5日の hCG 処置の受胎性に対する効果は、研究によって異なっている [9、10]。最近の研究では、AI 後5日の hCG 処置は、第1卵胞波の主席卵胞が卵巣中の黄体と同側で

発育した場合に限り、受胎性に対して有益な効果を示した [33]。本研究では、第1卵胞波の主席卵胞と黄体の位置的な関係は評価しなかったが、hCG を用いた受胎率の向上に対する第1波の主席卵胞と黄体の位置関係を今後検証する必要があるだろう。

非妊娠牛の発情発見率は IVPD 群においてより高かったが、これは IVPD の抜去後1～3日の間に発情発現が集中化するためである (図3)。しかし、再 AI 受胎率は無処置群および hCG 群と同等であった。以前の研究では、AI 後14日から21日までの IVPD 処置は、再発情の AI 受胎率を僅かに低下させ、IVPD 抜去後1～3日までの再発情の同期化を改善している [23]。別の研究では、AI 後19日と比較して21日に IVPD を抜去した方が発情発見率が高くなったが、AI 後19日から20日までに IVPD を抜去すると、21日から22日までに抜去した時と比較して、再発情時の受胎率が高くなることが報告されている [24]。21日から22日までに抜去した時に受胎率が低かったのは、IVPD の留置期間が長くなった分、持続性卵胞の発達が促され、卵子が老化したからと推測される [34]。これらの結果から、受胎率の低下を防ぐためには、初回 AI から19日目での IVPD の抜去が有効であると結論付けることができる。結果的に、再 AI 受胎率は無処置群および

表2 無処置群、hCG 群および IVPD 群における初回 AI から再発情までの日数の中央値、再発情発見率、および再 AI 受胎率。

パラメータ	無処置 ¹	hCG ²	IVPD ³
初回 AI から再発情までの日数の中央値 (下位四分位点、上位四分位点)	30.0 ^a (22.5, 48.0)	29.0 ^a (24.0, 44.0)	22.0 ^b (21, 38.5)
再発情発見率 (%)	41.4 ^{abA} (36/87)	37.8 ^{abA} (17/45)	60.7 ^{bb} (34/56)
再 AI 受胎率 (%)	30.6 (11/36)	47.1 (8/17)	35.3 (12/34)

1 無処置：初回 AI 後に処置なし。

2 hCG：初回 AI から5日後に3,000 IUのhCGを筋肉内投与。

3 IVPD：初回 AI の5日目から19日目までプロゲステロン腔挿入剤 (IVPD) を留置。

同列内の上付文字は差を示す。A,B：P<0.1、a,b：P<0.05

hCG群と同等であったが、IVPD群の再発情発見率は無処置群およびhCG群よりも1.5倍近く高くなった。IVPD群で発情発見率が高かったのは、非妊娠牛の50%以上が抜去後3日間で発情しており、高い発情同期化に起因すると思われる。今回の研究では、このように発情が集中して同期化された理由は明らかにしていない。以前の研究では、非妊娠牛の19%で黄体退行の開始が遅延したことが示され、これらの非妊娠牛はAI後24日目に妊娠特異性蛋白Bによって胚の存在が診断された[35]。つまり、早期胚死滅により黄体退行の開始が遅延した非妊娠牛が一定数いたということである。この研究の結果から、AI後5日からのIVPD処置は、特により未熟な胚の発達を促進し、胚死滅を防いでいると推測される。結果的に、早期胚死滅を呈する非妊娠牛の比率が減少することになり、黄体退行のタイミングが正常な非妊娠牛の比率が上昇する。したがって、IVPD処置を行うと、AI後21日程で再発情が起きる比率が向上したと思われる。発情が集中して同期化された別の理由として、IVPD処置がAI後19日より早く黄体が退行した非妊娠牛の発情発現を抑制したことが考えられる。無処置群およびhCG群の一部の非妊娠牛はAI後19日までに発情発現が見られたことから(図3)、一部の非妊娠牛は既

に黄体が退行していて、IVPDの抜去まで発情発現が抑制されていたと考えられる。したがって、早期に黄体退行した非妊娠牛は、IVPD抜去後1～3日の間に発情を発現することとなり、発情発現が同期化されていたと推測される。しかし、発情発現が強く同期化された原因が、母体認識期間後のIVPD群の胚死滅率が無処置群よりも低いことによるものなのか、あるいは早期に黄体退行した非妊娠牛の発情発現が抑制されたことによるものなのか、さらなる検証が必要である。

IVPD群の初回 AI 受胎率および再発情発見率の向上により、特にリピートブリーダーの累積妊娠率も向上した。したがって、この処置はリピートブリーダーの繁殖管理において有効な戦略の1つになり得る。

結論として、より高い受胎率と再発情発現率により、AI後5日から19日のIVPD処置が泌乳牛の繁殖管理に有益な効果をもたらすことが証明された。さらに、AI回数が3回を超えているリピートブリーダーにおいて、IVPD処置が受胎率の向上に有効であることが示された。

謝辞

著者らはプロゲステロン抗血清分与に関して奥田潔教授(岡山大学)に感謝する。また、CIDRの提供元であるゾエティス・ジャパン株式会社に感謝する。

References

1. Bartlett PC, Kirk JH, Mather EC. Repeated insemination in Michigan Holstein Friesian cattle: incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. *Theriogenology* 1986; 26: 309-322.
2. Yusuf M, Nakao T, Ranasinghe RMSBK, Gautam G, Long ST, Yoshida C, Koike K, Hayashi A. Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds. *Theriogenology* 2010; 73: 1220-1229.
3. Sood P, Zachut M, Dube H, Moallem U. Behavioral and hormonal pattern of repeat breeder cows around estrus. *Reproduction* 2015; 149: 545-554.
4. Sood P, Zachut M, Dekel I, Dube H, Jacoby S, Moallem U. Preovulatory follicle characteristics and oocyte competence in repeat breeder dairy cows. *J Dairy Sci* 2017; 100: 9372-9381.
5. Katagiri S, Takahashi Y. Changes in EGF concentrations during estrous cycle in bovine endometrium and their alterations in repeat breeder cows. *Theriogenology* 2004; 62: 103-112.
6. Kimura M, Nakao T, Moriyoshi M, Kawata K. Luteal phase deficiency as a possible causes of repeat breeding in dairy cows. *Br Vet J* 1987; 143: 560-566.
7. Schmitt EJ, Diaz T, Barros CM, de la Sota RL, Drost M, Fredriksson EW, Staples CR, Thorner R, Thatcher WW. Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. *J Anim Sci* 1996; 74: 1074-1083.
8. Santos JE, Thatcher WW, Pool L, Overton MW. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *J Anim Sci* 2001; 79: 2881-2894.
9. Hanlon DW, Jarratt GM, Davidson PJ, Millar AJ, Douglas VL. The effect of hCG administration five days after insemination on the first service conception rate of anestrous dairy cows. *Theriogenology* 2005; 63: 1938-1945.
10. Nascimento AB, Bender RW, Souza AH, Ayres H, Araujo RR, Guenther JN, Sartori R, Wiltbank MC. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2013; 96: 2873-2882.
11. Larson SF, Butler WR, Currie WB. Pregnancy rates in lactating dairy cattle following supplementation of progesterone after artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 2007; 102: 172-179.
12. Friedman E, Roth Z, Voet H, Lavon Y, Wolfenson D. Progesterone supplementation postinsemination improves fertility of cooled dairy cows during the summer. *J Dairy Sci* 2012; 95: 3092-3099.
13. Garcia-Ispuerto I, López-Gatius F. Progesterone supplementation in the early luteal phase after artificial insemination improves conception rates in high-producing dairy cows. *Theriogenology* 2017; 90: 20-24.
14. Price CA, Webb R. Ovarian response to hCG treatment during the oestrous cycle in heifers. *J Reprod Fertil* 1989; 86: 303-308.
15. Starbuck GR, Mann GE. Differential effects of exogenous progesterone administration at different stages of the luteal phase on endogenous oestradiol concentration in cows. *Reprod. Dom Anim* 2010; 45: 283-286.
16. Stock AE, Fortune, J. E. Ovarian follicular dominance: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* 1993; 132: 1108-1114.
17. Savio JD, Thatcher WW, Morris GR, Entwistle K, Drost M, Mattiacci MR. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. *J Reprod Fertil* 1993; 98: 77-84.
18. Alnimer MA, Shamoun AI. Treatment with hCG 4 or 6 days after TAI to improve pregnancy outcomes in repeat-breeding dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2015; 157: 63-70.
19. Villarroel A, Martino A, BonDurant RH, Deletang F, Sischo WM. Effect of post-insemination supplementation with PRID on pregnancy in repeat-breeder Holstein cows. *Theriogenology* 2004; 61: 1513-1520.
20. 1513-1520.
21. Khoramian B, Farzaneh N, Talebkhan Garoussi M, Mohri M. Comparison of the effects of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin or progesterone on pregnancy per artificial insemination in repeat-breeder dairy cows. *Res Vet Sci* 2011; 90: 312-315.

22. Heersche G Jr, Nebel RL. Measuring efficiency and accuracy of detection of estrus. *J Dairy Sci* 1994;77: 2754-2761.
23. Lopez H, Satter LD, Wiltbank MC. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2004; 81: 209-223.
24. Chenault JR, Boucher JF, Dame KJ, Meyer JA, Wood-Follis SL. Intravaginal progesterone insert to synchronize return to estrus of previously inseminated dairy cows. *J Dairy Sci* 2003; 86: 2039-2049.
25. Galvao KN, Santos JEP, Cerri RL, Chebel RC, Rutigliano HM, Bruno RG, Bicalho RC. Evaluation of methods of resynchronization for insemination in cows of unknown pregnancy status. *J. Dairy Sci* 2007; 90: 4240-4252.
26. Diaz T, E. Schmitt EJP, de la Sota RL, Thatcher MJ, Thatcher WW. Human chorionic gonadotropin-induced alterations in ovarian follicular dynamics during the estrous cycle of heifers. *J Anim Sci* 1998; 76: 1929-1936.
27. Townson DH, Tsang PC, Butler WR, Frajblat M, Griel LC Jr, Johnson CJ, Milvae RA, Niksic GM, Pate JL. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *J Anim Sci*. 2002; 80: 1053-1058.
29. Miyamoto A, Okuda K, Schweigert FJ, Schams D. Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. *J Endocrinol* 1992; 135: 103-114.
30. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48: 452-458.
31. Mann GE, Fray MD, Lamming GE. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-t production in the cow. *Vet J* 2006; 171: 500-503.
32. Forde N, Carter F, Fair T, Crowe MA, Evans AC, Spencer TE, Bazer FW, McBride R, Boland MP, O'Gaora P, Lonergan P, Roche JF. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biol Reprod* 2009; 81: 784-794.
33. Forde N, Beltman ME, Duffy GB, Duffy P, Mehta JP, O'Gaora P, Roche JF, Lonergan P, Crowe MA. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biol Reprod* 2011; 84: 266-278.
34. Funeshima N, Noguchi T, Onizawa Y, Yaginuma H, Miyamura M, Tsuchiya H, Iwata H, Kuwayama T, Hamano S, Shirasuna K. The transfer of parthenogenetic embryos following artificial insemination in cows can enhance pregnancy recognition via the secretion of interferon tau. *J Reprod Dev* 2019; 65: 443-450 381
35. Miura R, Matsumoto N, Izumi T, Kayano M, Haneda S, Matsui M. Effects of human chorionic gonadotropin treatment after artificial inseminations on conception rate with the first follicular wave dominant follicle in the ovary ipsilateral to the corpus luteum in lactating dairy cows. *J Reprod Dev* 2018; 64: 485-488.
36. Mihm M, Baguisi A, Boland MP, Roche JF. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J Reprod Fertil* 1994; 102: 123-130.
37. Wijma R, Stangaferro ML, Kamat MM, Vasudevan S, Ott TL, Giordano JO. Embryo mortality around the period of maintenance of the corpus luteum causes alterations to the ovarian function of lactating dairy cows. *Biol Reprod* 2016; 95: 1-14.

CIDR[®] 1900