

3. 卵巣、子宮外陰部所見と受胎率の関係に関する調査

研究開発第二課 倉田佳洋 中井里香 松田浩典 西野治* 朝倉康夫**
*現 奈良県家畜保健衛生所 **現 奈良県食肉公社

要 約

12～18ヶ月のホルスタイン未経産牛 28頭に対して、発情後5日目と7日目の外陰部所見と直腸検査による触診で卵巣と子宮所見を調査し、同時に超音波画像診断装置による卵巣の所見も調べた。また発情後5日目と7日目に採血し、血中のプロジェステロン濃度（以下P値）を測定した。卵巣、黄体及び卵胞の大きさが触診では超音波画像診断法よりも小さく判定する傾向にあり、卵巣の所見では調査した112個のうち63個で異なる判定となった。

超音波画像診断において各調査牛の黄体組織面積および卵胞の面積を算定したところ、子宮形状・子宮収弾・外陰部充血・外陰部形状などの項目との関連性が見られた。P値においても子宮及び外陰部と関連する傾向が見られた。またP値と黄体組織面積では発情後5日目、7日目とも正の相関が見られた。

緒 言

受精卵移植（以下ET）の実施の可否は直腸検査等による外陰部、卵巣所見を総合的に判断している。しかし、直腸検査による触診法は誤判定が多いとされ¹⁾、実務者の経験や熟練度も関係している。受胎率比較試験などにおいては黄体の状態や共存卵胞を正確に把握し、試験牛を選択する基準が必要となってくる。超音波画像診断法は卵巣の状態を視覚的かつ非侵襲的に観察できることや操作に時間を要しないことから^{1) 2) 3) 4)}、直腸検査や血中プロジェステロン濃度測定よりも優れた手法と言われており、近年正確度の高さおよび操作の簡易さから家畜繁殖領域において早期妊娠診断や卵巣の観察に日常的に利用されるようになった。

そこで直腸検査による卵巣、子宮および外陰部所見と、超音波診断機による卵巣所見を調査し、併せて血中プロジェステロン濃度を測定した。触診と超音波画像（以下エコー像）の比較と、外陰部・卵巣及び子宮所見と受胎率の関係、P値と各所見との関連性を比較し、ET受胎率向上試験を実施するための受胎牛の選抜基準を検討した。

調査1：直腸検査と超音波画像診断法による卵巣の観察精度の比較調査

材料および方法

1. 供試牛

ETを初めて行う自然発情または同期化処置を行った12～18ヶ月齢のホルスタイン未経産牛28頭を試験に供した。

2. 実施者

実施者は2名で行い、それぞれ直腸検査の経験年数が15年と5年である。

3. 方法

発情後5日目と7日目に直腸検査による触診および超音波画像診断による卵巣、卵胞及び黄体の長径と短径をそれぞれ測定した。超音波画像診断には直腸壁から超音波画像診断装置（本多電子社製；

HS-101V、直腸用 50mm リニアプローブ ; HLV-155(5.0MHz) を用いて、黄体及び卵胞の像が最大になったときの径を測定した。また黄体に内腔が存在する場合（囊腫様）は内腔の長径と短径も計測した。

4. 発情同期化処置

発情同期化は PG（ダルマジン：川崎三鷹製薬）+E2（エストラジオール注「KS」：共立製薬）、CIDR（イージーブリード：家畜改良事業団）+PG+E2 の 2 種類の処置を行った。

5. 統計処理

誤判定の比較は χ^2 検定、黄体及び卵胞の触診法と超音波画像診断法による計測値の比較は分散分析法を用いた。

結 果

28 頭の卵巣で発情後 5 日目と 7 日目の 2 回、左右合わせて 112 個の卵巣で計測した。超音波画像診断と直腸検査による触診の卵巣の計測値の差は、5 日目の卵巣の長径において $0.6 \pm 1.6\text{cm}$ ($p < 0.01$)、短径では $0.2 \pm 1.1\text{cm}$ ($p < 0.01$)、7 日目の卵巣の長径では $0.4 \pm 0.7\text{cm}$ 、短径で $0.2 \pm 0.7\text{cm}$ といずれも超音波画像診断法による測定値が大きくなった。また 5 日目、7 日目とも短径よりも長径の計測値の差が大きかった。

黄体においても 5 日目の長径が $0.5 \pm 0.6\text{cm}$ ($p < 0.01$)、短径が $0.2 \pm 0.6\text{cm}$ ($p = 0.10$)、7 日目の長径が $0.5 \pm 0.7\text{cm}$ ($p < 0.01$)、短径が $0.3 \pm 0.5\text{cm}$ ($p = 0.08$) と触診よりも超音波画像診断法による測定値が大きくなり、卵巣同様黄体も触診は小さく感じる傾向であった。卵胞も 5 日目、7 日目とも 0.4 ± 0.6 ($p < 0.01$) と超音波画像診断法が直腸検査よりも測定値は大きくなった（表 1）。

表 1 ウシ卵巣における長径と短径、黄体の長径と短径及び卵胞の長径の超音波画像診断法と触診法の計測値の差（超音波－触診）

		5 日目(cm)	7 日目(cm)
卵巣	長径	$0.6 \pm 1.6^{**}$	$0.4 \pm 0.7^{**}$
	短径	$0.2 \pm 1.1^{**}$	$0.2 \pm 0.7^*$
黄体	長径	$0.5 \pm 0.6^{**}$	$0.5 \pm 0.7^{**}$
	短径	0.2 ± 0.6	0.3 ± 0.5
卵胞	長径	$0.4 \pm 0.6^{**}$	$0.4 \pm 0.6^{**}$

* : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$

触診とエコー像で黄体及び卵胞の観察において異なる判定は 56.3%（63/112 個）あり、最も多かったのがエコー像で卵胞があるにもかかわらず、触診では卵胞がないとした判定で 61.9%（39/63 個）であった。次いで多かったのがエコー像で卵胞がないにもかかわらず触診で卵胞ありとした判断で 17.5%（11/63 個）であった。エコー像で黄体があるにもかかわらず、触診で黄体がないと判定したものは 4.8%（3/63 個）、エコー像で黄体がないと判定したが触診で黄体ありと判定したのは 6.3%（4/63 個）と、黄体よりも卵胞で異なる判定が多かった（表 2 及び図 1～4）。

表2 ウシ卵巢において超音波画像診断法と触診法による異なる判定の比較

エコー所見	エコー所見と異なる 触診法による判定内容	異なる判定数	異なる判定内の割合 (%)
卵胞あり (68)	卵胞なし	39	61.9
	黄体あり	5	7.9
卵胞なし (44)	卵胞あり	11	17.5
小計 (112)		55	87.3
黄体あり (56)	黄体なし	3	4.8
	卵胞あり	1	1.6
黄体なし (56)	黄体あり	4	6.3
小計 (112)		8	12.7
合計 (112)		63	100

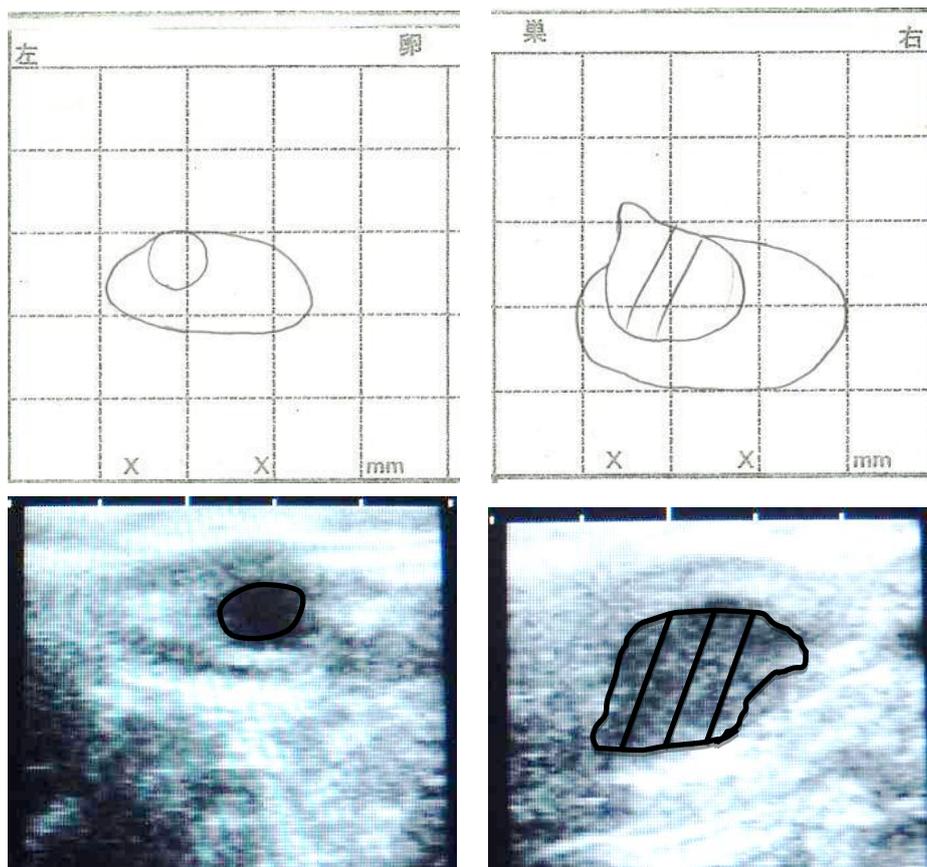


図1 触診とエコー像において卵巢所見が左右ともに一致している所見
(5日目の卵巢 上段：触診 下段：エコー像)

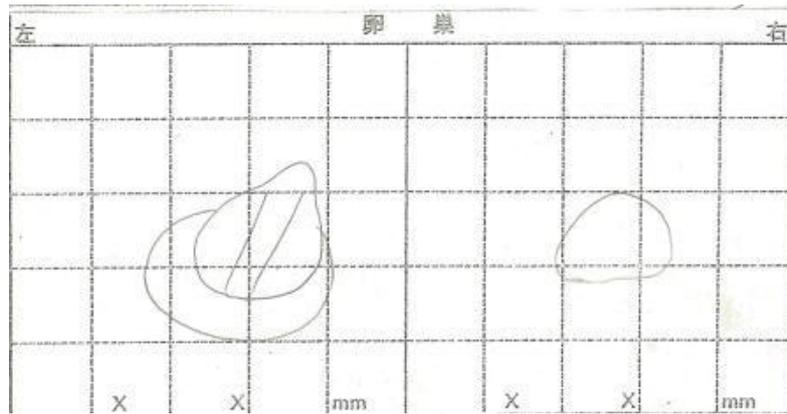


図2 エコー像で卵胞ありを触診で卵胞なしと判定した所見 (右卵巢：発情後5日目)

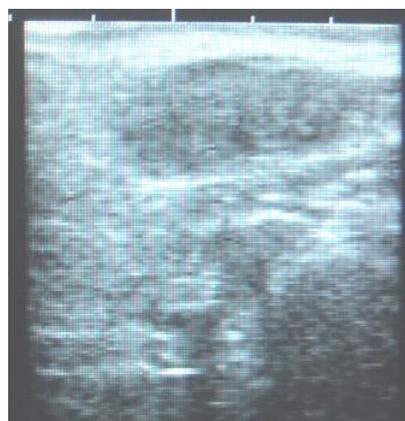
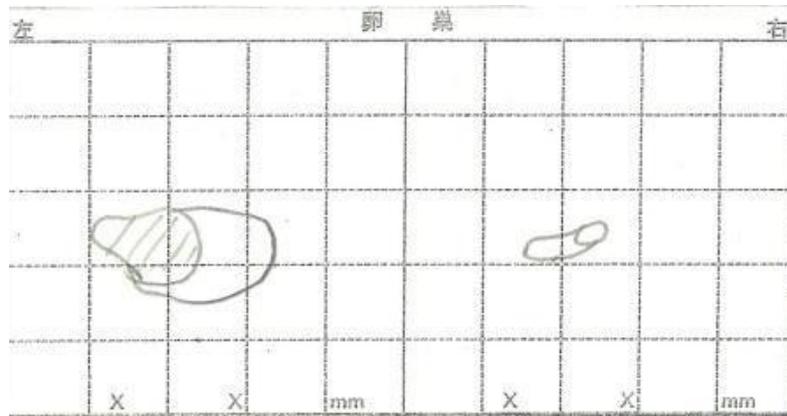


図3 エコー像で卵胞なしを触診で卵胞ありと判定した所見 (右卵巢：発情後5日目)

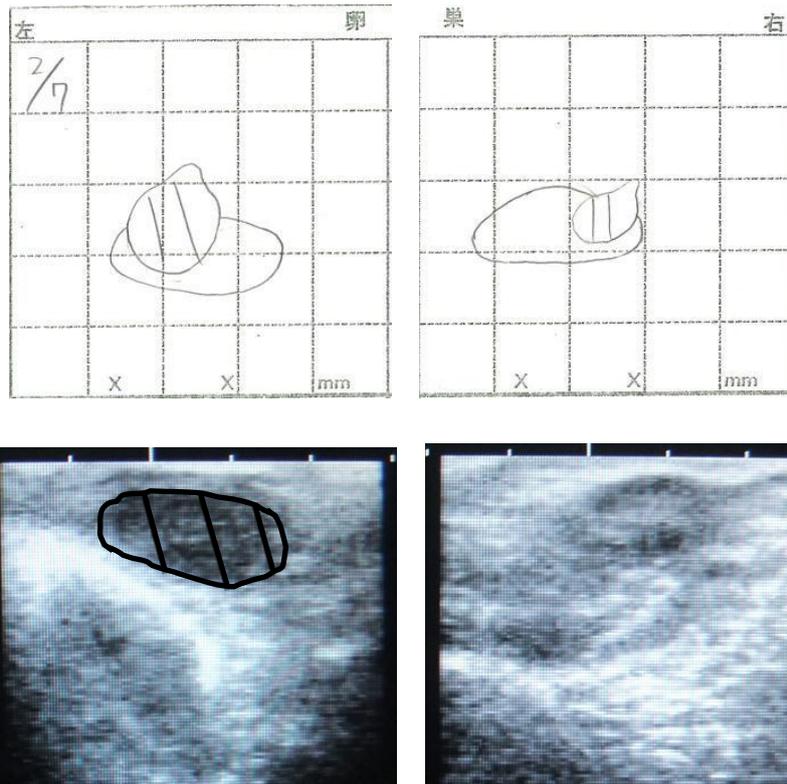


図4 エコー像で黄体なしを触診で黄体ありと判定した所見（右卵巢：発情後7日目）

調査2：卵巢所見と子宮・外陰部所見と血中プロジェステロン濃度の関連性調査

試験1で測定したウシの中でET実施可能と判断したウシ24頭において、試験1のエコー像からの測定値よりKastelicらの方法に基づき黄体組織面積と卵胞面積を算出した^{5) 6)}。直腸検査と超音波画像診断法を行った発情後5日目と7日目の子宮所見と外陰部所見及び受胎率との関連性を調べた。また同時に各供試牛から採血し、血中のプロジェステロンの測定を行い、子宮所見と外陰部所見及び受胎率との関連性を調べた。

材料および方法

1. 供試牛

試験1の調査牛のうち、ET実施可能と判断した12～18ヶ月齢のホルスタイン未経産牛24頭を試験に供した。

2. 移植胚

新鮮又は凍結の黒毛和種生体回収胚で、新鮮胚ではAランク（正常な発育ステージで、輪郭が明瞭、色調も正常、ほとんど変性部位無し）、A'ランク（正常な発育ステージで、輪郭が明瞭、ほぼ正常な形態を示すが、一部突起した細胞あるいは不均整が見られる。細胞の変性は10%以下有り）、Bランク（正常な発育ステージで、一部突起した細胞あるいは不均整がやや目立つが、変性部位が10～30%以下有り）の3ランクの胚を選別し、凍結胚ではAランクとA'ランクの胚を選別し、このうち後期桑実胚（CM）～拡張胚盤胞（ExBL）の時期の胚を用いた。

3. 移植方法

胚の移植は発情後7日目または8日目に受胎牛を柵場に保定し、移植器（ノースガン式移植器；富士

平工業製もしくはモー1号；ミサワ医科工業）にシース管カバーをかけて外子宮口まで挿入し、黄体が確認された卵巢と同側の子宮角に1胚移植した。

4. 採血及び処理法

供試牛の尾静脈から21Gの採血針を用いて真空採血管（ベノジェクトII分離剤入り）に発情後5日目と発情後7日目の計2回採血し、37℃で1h以上静置後、3000rpm、10minで遠心分離し、分離した血清を-30℃でP値の測定まで凍結保存した。

5. 調査項目

①卵巢所見

調査1からの卵巢中の黄体の測定値から面積を算出し、黄体に内腔が存在する場合は内腔の面積を中心腔面積として、黄体面積から抜いた黄体組織面積と、卵巢中に卵胞が存在する場合は同様に調査1からの卵胞の測定値から面積を算出して指標とした。

黄体組織面積と卵胞面積についてはKastelicらの方法^{5) 6)}に基づき算出した。

黄体組織面積＝黄体総面積－中心腔面積（のう腫様の場合）

黄体総面積＝{(黄体長径＋黄体短径)÷4}²×π

中心腔面積＝{(腔の長径＋腔の短径)÷4}²×π

卵胞面積＝{(卵胞長径＋卵胞短径)÷4}²×π

なお、卵胞面積は卵巢内に複数卵胞ある場合は大きいもの2つの卵胞面積を合わせたものを算出した。

②供試牛の子宮所見と外陰部所見

子宮所見は発情5日目と7日目の供試牛において子宮の太さ(指幅)、子宮形状(円柱状～扁平状)、子宮収縮、子宮肥厚を触診による直腸検査で確認した。また、外陰部所見は子宮粘液、外陰部充血、外陰部粘膜の弛緩または収縮、外陰部粘膜の状態を視覚的に観察した。各所見の記録は農業共済組合診療指針の繁殖記録様式にのっとり行った。

③血中プロジェステロン値(P値)

血清中のP値の測定はCLIA法で測定した。

④妊娠鑑定

妊娠鑑定は発情後31日目～37日目に直腸壁から超音波診断装置（本多電子社製；HS-101V、直腸用50mmリニアプローブ；HLV-155(5.0MHz)）を用いて調査した。

6. 統計処理

子宮所見と外陰部所見の中で(－～＋＋＋)と評価できるものを数値化(表3)し、黄体組織面積と卵胞面積に対する子宮所見と外陰部所見の関連はピアソンの相関係数検定またはスピアマンの順位相関係数の検定を行った。受胎率は相関比を用いて検定した。

表3 子宮所見と外陰部所見の数値化

所見の種類	スコア				
	1	2	3	4	5
子宮形状	扁平	楕円	半円	円柱	
子宮収弾	—	±	+	++	+++
子宮の肥厚	—	+	++		
外陰部形状	緊縮	収縮	腫脹	弛緩	
外陰部粘膜充血	なし	あり			
外陰部粘膜湿潤	乾燥	湿沢			

結果

黄体組織面積と子宮及び外陰部所見と受胎率、卵胞面積と子宮及び外陰部所見と受胎率、卵胞面積を黄体組織面積で割った比率と子宮及び外陰部所見と受胎率で各供試牛を比較したところ、以下のようになった。

黄体組織面積と発情後5日目の子宮形状では黄体組織面積が大きいほど円柱から楕円に向かう傾向にあり ($rs=-0.29$)、面積が大きいほど外陰部充血は少ない傾向となり ($rs=-0.21$)、外陰部形状では面積が大きいほど締まる傾向が見られた ($rs=-0.35$)。発情後7日目の子宮肥厚でも同様に黄体組織面積が大きいほど肥厚が少なくなる傾向となり ($rs=-0.30$)、外陰部充血も5日目と同様の傾向 ($rs=-0.32$) となった。発情後7日目の外陰部形状では相関は認められなかった。

卵胞面積においては面積が大きくなるほど、発情後5日目の子宮肥厚が厚くなる傾向 ($rs=0.26$) がみられた。

なお、卵胞面積を黄体組織面積で割った比率においては、比率が高くなるほど発情後5日目の子宮肥厚が厚くなる傾向となり ($rs=0.38$)、外陰部形状でも高くなるほど腫脹や弛緩に向かう傾向で ($rs=0.28$)、7日目でも子宮肥厚は5日目と同様の傾向 ($rs=0.26$) が見られた。

5日目におけるP値と外陰部粘膜ではP値が高いほど充血しない傾向 ($rs=-0.26$) でかつ乾燥する傾向であった ($rs=-0.26$)、外陰部形状でもP値が高いほど外陰部が締まる傾向 ($rs=-0.23$) となった。7日目ではP値が高いほど外陰部粘膜が乾燥する傾向 ($rs=-0.21$) であった (表4)。

表4 d5およびd7の子宮・外陰部所見と黄体組織面積、P値、卵胞面積等との相関

相関係数 (rs)	d5						d7					
	子宮形状	子宮収弾	子宮の肥厚	外陰部形状	外陰部充血	外陰部湿潤	子宮形状	子宮収弾	子宮の肥厚	外陰部形状	外陰部充血	外陰部湿潤
黄体組織面積	-0.29	—	—	-0.35	-0.21	—	—	—	-0.3	—	-0.32	—
P値	—	—	—	-0.23	-0.26	-0.26	—	—	—	—	—	-0.21
卵胞面積	—	—	0.26	—	—	—	—	—	—	—	—	—
卵胞面積/ 黄体組織面積	—	—	0.38	0.28	—	—	—	—	0.26	—	—	—

※相関の目安

- : 相関なし
- ±0.7～±0.9 : 強い相関がある
- ±0.2～±0.4 : やや相関がある
- ±0.9～±1.0 : 極めて強い相関がある
- ±0.4～±0.7 : 相関がある

また P 値は黄体組織面積との間に d5 で正の相関 ($r_s=0.50$)、d7 でも正の相関 ($r_s=0.68$) が見られた (図 7)。

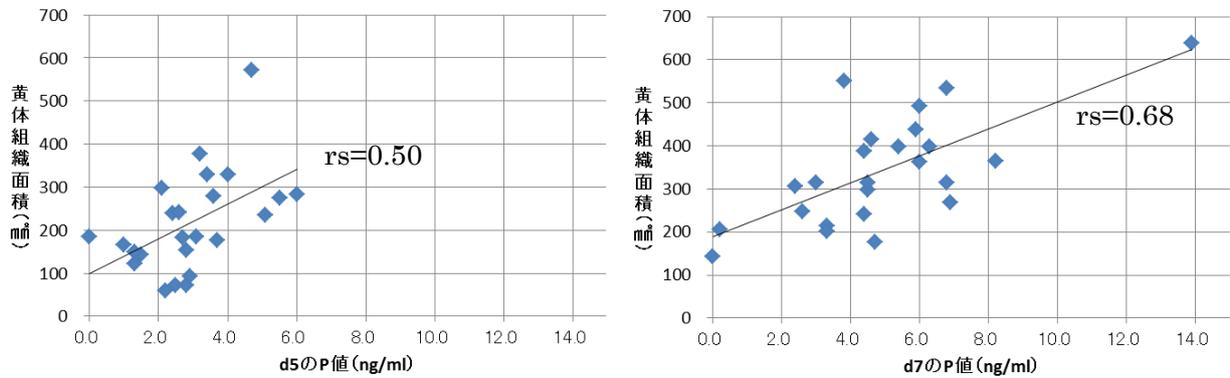


図 7 d5 及び d7 の P 値と黄体組織面積

調査 3：受胎牛及び不受胎牛における卵巢、子宮外陰部と血中プロジェステロン濃度との関係

調査 2 の結果をもとに受胎群・不受胎群に分けて比較した。

黄体組織面積は発情後 5 日目では受胎牛(n=10)、不受胎牛(n=14)及び中止牛(n=4)では分布に差は見られなかったが、発情後 7 日目になると受胎牛の群では面積の最小値が 240.5 mm²となっており、不受胎牛及び中止牛と比べ、全ての個体で面積の上昇が見られた。(図 8)。

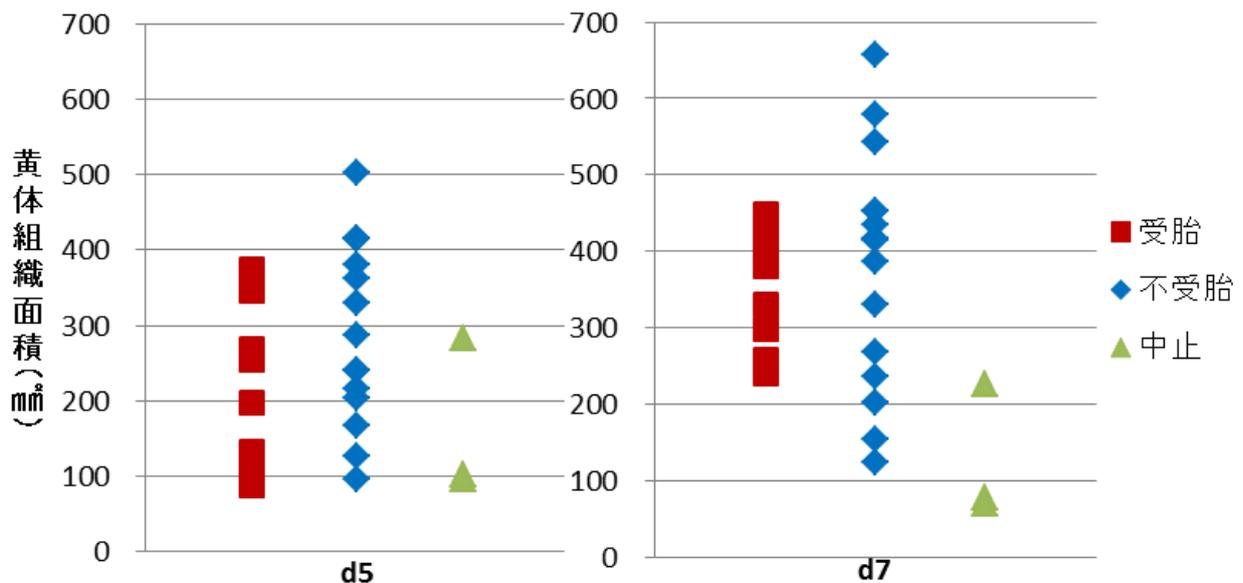


図 8 受胎別黄体組織面積

P 値においても発情後 5 日目において受胎牛と不受胎牛の分布に大きな差は見られなかったが、発情

後 7 日目においては受胎牛の群の P 値の最低値は 2.6ng/ml となり、受胎牛の全ての個体で P 値の上昇がみられた。不受胎牛においては P 値が 5 日目よりも低下する個体も見られた (図 9)。

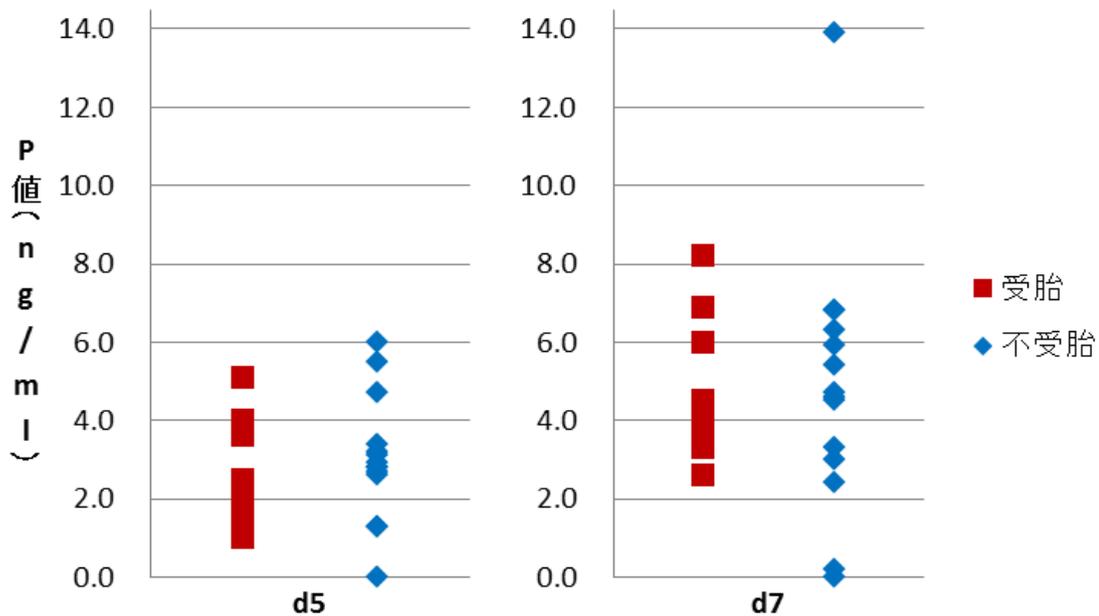


図 9 受胎別 P 値

考 察

直腸検査による触診と超音波画像診断法によるエコー像では卵巣において 5 日目・7 日目の長径及び短径ともエコー像による測定値が大きい結果となり、触診では卵巣を小さく判断する傾向があった。黄体・卵胞においても同様の傾向が認められ、用手法となる触診では全体的に対象を小さく判断する傾向があり、自分の指巾を前もって把握して大きさを判定する必要性を確認した。

触診とエコー像での異なる判定は卵胞に対して多く、内容では触診において卵胞なしと判断したものとエコー像では卵胞ありとしたものが最も多い。用手による触感での判断・卵胞の卵巣内での位置・子宮や卵巣の大きさの個体差等様々な要因が関係すると思われる。黄体に関しても異なる判定は少ないながらも、触診で黄体なしと判定したものがエコー像では黄体が判定されているものがあつた。また、エコー像では 5 日目・7 日目とも多くの黄体で様々の大きさの内腔が確認されたことから、黄体突破口の確認や、充実した黄体に感じられても指先で軽く圧迫させることにより内腔の確認をすることが重要と考えられた。

黄体組織面積と子宮及び外陰部の所見は 5 日目で子宮形状・外陰部充血・外陰部形状、7 日目で子宮肥厚・外陰部充血の項目で弱いながらも相関を示しており、黄体の大きさが関係していることが考えられた。また、卵胞面積を黄体組織面積で割った比率においても、5 日目で子宮肥厚・外陰部形状、7 日目でも子宮肥厚の項目と弱い相関を示していることから、卵胞と黄体の影響が相互に関与していることも考えられる。移植判断の実施には子宮肥厚を始めとする子宮・及び外陰部所見が重要となることが再確認された。

P 値と子宮及び外陰部所見では発情後 5 日目で外陰部形状、外陰部充血、外陰部粘膜の湿潤、7 日目で外陰部粘膜の湿潤状態の項目で弱い相関が見られたことから、子宮及び外陰部所見と黄体の大きさは関係していると考えられた。また黄体組織面積と P 値では正の相関が認められたことから、のう腫の判断をした上で黄体が大きいほど、P 値が高くなることが示唆された。

受胎の有無別では 5 日目から 7 日目の黄体組織面積の推移が P 値の推移とほぼ一致しており（図 8・9）、このことから黄体組織面積と P 値が正の相関があることを裏付けていると考えられた。黄体組織面積では発情後 5 日目では受胎牛と不受胎牛での分布に差は見られず 5 日目の時点では黄体の大きさで移植の実施を判断するのは難しいと考えられた。7 日目では受胎牛の全個体で黄体組織面積が上昇し、受胎群の黄体組織面積の最小値が 240.5 mm²であり、黄体組織面積が 200 mm²程度以下ではいずれも不受胎群に含まれることから、7 日目の黄体組織面積が 200~240 mm²の間に受胎と不受胎を分ける境界が考えられ、それ以上の面積の黄体では受胎の有無は黄体組織面積以外の要因も考えられる。黄体組織面積が 240 mm²とすれば Kastelic らの方法から算出すると黄体の長径と短径の合計が約 3.5cm となり、移植の実施を判断する場合、発情後 7 日目の黄体はこれ以上の大きさが求められると考えられた。

今回の調査から ET 実施は、受卵牛の黄体の大きさとその突破口やのう腫及び共存卵胞の存在の有無を調べ、子宮及び外陰部所見などからその黄体および共存卵胞の影響を見て判断をすることの重要性を確認した。

参考文献

- 1) 壁谷早苗ら：ウシ卵巢の卵胞および黄体の超音波画像診断法および触診法による観察精度の比較 Journal of Rakuno Gakuen University 33(2) 341-346 (2009)
- 2) 乳牛の超音波画像診断解析による繁殖機能と栄養状況 根釧農試研究通信 第 2 号(1993)
- 3) 石井一功ら：牛の繁殖管理における超音波画像診断 1-31
- 4) 木之下明弘ら：正常な発情周期中の未経産乳牛における卵胞の発育動態の解析 日畜会報 69(7) 690-696(1998)
- 5) 千田惣浩ら：牛移植前後のホルモン処置による受胎率向上 東北農業研究 第 56 号 119-120(2003)
- 6) J.P.Kastelic ら：Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers Theriogenology Vol.33 No.6(1990)