

分娩後の黒毛和種における子宮の機能的回復状況推定方法の研究

高崎久子、宍戸容子、湯澤裕史、大島藤太¹⁾、櫻井由美²⁾

1) 現 県北家畜保健衛生所、2) 現 農政部畜産振興課

要 約

繁殖雌牛の授精適期推定方法を確立するために、オキシトシン(OT)負荷試験によるプロスタグランジン代謝産物(PGFM)の血中動態で分娩後の子宮の機能的回復状況を推定し、超音波画像診断装置(エコー)検査による卵巣所見及び子宮貯留物スコア、子宮内膜の細胞診による子宮内膜の多形核白血球(PMN)の割合との関連性を調査した。その結果、OT負荷試験による子宮の機能性評価は、エコー検査による子宮内貯留物の状況及び子宮内膜の細胞診のPMN出現率に関連性が見られた。このことから、人工授精(AI)の際に、エコー検査や子宮内膜の細胞診によって子宮の機能性の回復状況を推定し、これを指標として適期授精を行うことで、受胎率を維持できることが示唆された。

目 的

和牛繁殖農家の経営改善のためには、分娩間隔の短縮等による繁殖成績向上が重要である。その対策の一つとして、分娩後に繁殖機能の回復した個体を選定し、適期授精することがポイントである。分娩後の繁殖検査において、卵巣の回復状況は臨床診断、または血中ホルモン動態から評価しているが、子宮の回復状況については主として臨床診断であり、機能的な評価法は確立されていない。

末梢血で測定可能なプロスタグランジン代謝産物(PGFM)はプロスタグランジンF₂α(PGF₂α)の代謝産物であり、生体内のPGF₂α推移と同様な推移パターンを示すことから、生体内のPGF₂α分泌動態を把握できる¹⁾。また、PGF₂αは牛をはじめとした家畜において、性周期末期に黄体退行に先行して増加することが知られており^{1)~4)}、性周期末期に卵巣から分泌されるオキシトシン(OT)により、子宮からのPGF₂α分泌が促され、これが卵巣に作用し、黄体退行に重要な役割を果している⁵⁾。

牛子宮内膜においてOT受容体は黄体退行に伴い発情後17~18日に著しく増加する。この時期に過剰なOTを投与することで一過性にPGF₂α分泌が促進される。この生理作用は分娩後の子宮の機能的回復状況の推定に応用可能であり、OT投与に対する生理的反応性の高い牛群は低い牛群と比較して受胎性が高いとの報告がある⁷⁾。

そこで本研究では、分娩後の繁殖雌牛の授精適期推定方法を確立するためOT負荷試験によるPGFMの血中動態を指標とし、子宮の機能的回復状況を推定するとともに、臨床的診断方法との比較を行い、生産現場で利用可能な子宮の機能回復推定方法を検討した。

材料及び方法

試験には、栃木県畜産酪農研究センターで飼養している黒毛和種繁殖雌牛延べ16頭を供試した。16頭について、OT負荷試験及び超音波画像診断装置(エコー)検査を、8頭について子宮内膜の細胞診を実施した。

OT負荷試験は前回発情後18~19日にオキシトシン製剤ポストンエス:共立製薬株式会社(100単位/頭)を静脈内投与し、投与前(0分)、投与後30及び60分に頸部静脈より採血を実施した。血中PGFMの測定には市販のELISAキット(Cayman社)を使用し、OT投与前(0分)のPGFM濃度に対する60分後の増加割合を算出しこれを増加率とした。伊賀らの報告⁷⁾から増加率186.5%を基準に増加率が高い群を高増加率群、低い群を低増加率群に分類し、OT負荷試験後の受胎成績、分娩後の初回発情及び排卵、子宮内貯留物スコア、子宮内膜の細胞診、ならびに発情行動との関連性について調査した。

エコー検査は本田電子HS1500、IMAGO.s ECM製を用い、分娩後30、40、50及び60日に行った。黒毛和種における分娩後子宮修復は分娩後40日程度との報告から⁸⁾子宮内貯留物の状況に応じて、スコア0~2に分類し(表1)、卵巣は黄体の有無を確認し、分娩から初回排卵までの日数を調査した。

子宮内膜の細胞診はメトリブラシセット牛用 富士平工業株式会社製を用い、分娩後40日に頸管経由で子宮腔から採取した。検体はスライドグラスに塗抹し、メタノールで固定後ギムザ染色を行い、顕微鏡下(10×40)で子宮内膜細胞と混在する多形核白血球(PMN)を合計500個カウントし、細胞数からPMN割合を算出した。

表1 子宮内貯留物によるスコア分類

エコー検査	
スコア0	子宮内貯留なし
スコア1	分娩後40日で貯留有
スコア2	分娩後50日で貯留有

供試牛は分娩後 60 日以降に発情を確認し、人工授精 (AI) を実施した。発情観察は 2~3 回/日実施し、補助的にテールペイント、歩数計による発情発見システムを使用した。なお、歩数計による発情観察では非発情時の平均歩数の 1.8 倍以上に上昇した時点を発情開始とし、1.8 倍以下に低下するまでの時間を発情持続時間とした。発情持続時間内の歩数累積から平均歩数累積を引いた値を増加歩数累積とした。

統計処理は平均値間の差の検定に t 検定を行った。有意水準は P<0.05 とした。

結果

OT 負荷試験を実施した 16 頭のうち高増加率群は 9 頭 (56.3%)、低増加率群は 7 頭 (43.8%) であった (表 2)。

表 2 OT 負荷試験における PGFM 値の動態比較

区	PGFM増加率 (%) (投与60分後/ OT投与前)	血中PGFM濃度		
		OT投与前 (pg/ml)	投与30分後 (pg/ml)	投与60分後 (pg/ml)
高増加率群 (n=9)	306.4 ±70.0	397.7 ±54.1	852.3 ±93.2	1120.4 ±201.5
低増加率群 (n=7)	146.1 ±8.9	582.9 ±134.7	754.8 ±154.8	864.1 ±234.2
全体 (n=16)	236.3 ±44.3	478.7 ±70.2	809.6 ±86.5	1008.3 ±156.1

OT 負荷試験後の発情時 AI を実施し、その後、受胎した群における OT 投与後 60 分の PGFM 増加率は不受胎となった群と比較して差は認められなかった (表 3)。

表 3 PGFM 血中動態と受胎の関係

区	PGFM増加率 (%) (投与60分後/ OT投与前)	血中PGFM濃度		
		OT投与前 (pg/ml)	投与30分後 (pg/ml)	投与60分後 (pg/ml)
受胎 (n=11)	250.6 ±62.9	455.1 ±70.0	845.8 ±113.4	991.5 ±177.8
不受胎 (n=5)	224.9 ±24.8	530.8 ±170.4	730.0 ±158.3	1045.2 ±314.4
全体 (n=16)	236.3 ±44.3	478.7 ±70.2	809.6 ±86.5	1008.3 ±156.1

OT 負荷試験において高増加率群の受胎率は 66.7%、低増加率群は 71.4% であり、受胎率に差は認められなかった (表 4)。

表 4 OT 負荷試験による受胎性評価と受胎率 (n=16)

OT負荷試験 (PGFM増加率) 区分	頭数	妊娠診断の結果		
		受胎(頭)	不受胎(頭)	受胎率 (%)
高増加率群 (>186.5%)	9	6	3	66.7
低増加率群 (≤186.5%)	7	5	2	71.4
全体	16	11	5	68.8

n=16 平均空胎日数71.6±3.9

分娩後初回発情及び初回排卵までの日数について、OT 負荷試験における高増加率群及び低増加率群、OT 負荷試験後発情の AI での受胎及び不受胎で比較したところ、有意差は認められなかった (表 5)。

表 5 初回発情と初回排卵 (n=16)

	受胎性評価		妊否		全体
	高増加率群	低増加率群	受胎群	不受胎群	
初回発情	41.8 ±2.7	60.7 ±11.5	47.1 ±7.0	53.8 ±8.1	49.3 ±5.4
初回排卵	46.8 ±4.4	42.5 ±4.8	45.1 ±3.8	45.0 ±6.5	45.1 ±3.3

エコー検査では、貯留が認められないスコア 0 が 75.0% (n=12)、分娩後 40 日で貯留が認められたスコア 1 が 18.8% (n=3)、分娩後 50 日で貯留が認められたスコア 2 が 6.3% (n=1) であった。貯留スコアと OT 負荷試験の関係では、有意差は認められなかった (表 6 及び図 1)。

表 6 エコー検査におけるスコア別割合と PGFM 増加率 (n=16)

エコー検査	n	%	PGFM増加率 (%)
スコア0	12	75.0	262.6
スコア1	3	18.8	172.7
スコア2	1	6.3	110.8

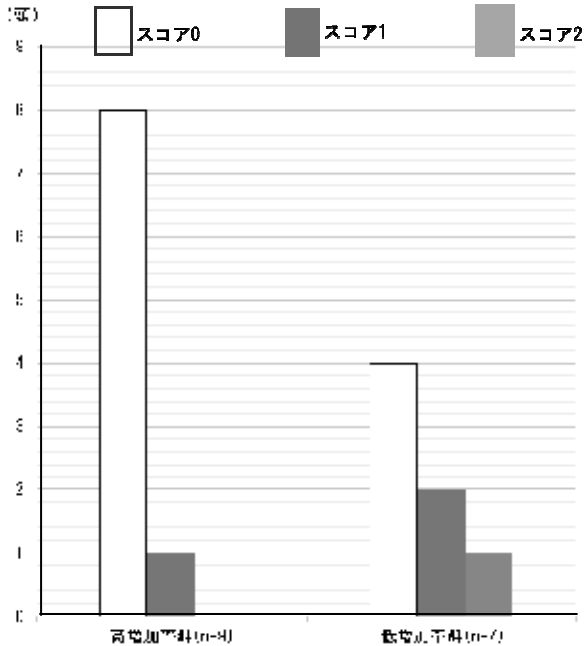


図1 エコー検査スコアと PGFM 増加率の関係 (n=16)

子宮内膜の細胞診を実施したすべての供試牛において、PMN 割合の平均値は $1.6 \pm 0.9(\%)$ であった。OT 負荷試験の高増加率群、低増加率群の平均値で比較したところ有意差は認められないものの、高増加率群で $0.25 \pm 0.5(\%)$ (低増加率群: $4.0 \pm 3.7(\%)$) 低い傾向 ($P=0.09$) にあった (図2)。

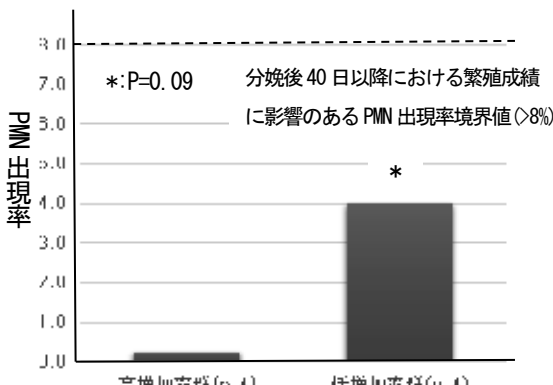


図2 子宮内膜の PMN 割合と PGFM 増加率の関係 (n=8)

OT 負荷試験による PGFM 高増加率群及び低増加率群で発情時の歩数情報(発情持続時間、増加歩数累積、歩数増加率)について比較したが差は認められなかった(表7及び図3)。

表7 OT 負荷試験による PGFM 増加率と発情の関係

項目	PGFM 増加率 (%)	発情持続時間 (時間)	増加歩数累積 (歩)	歩数増加率 (%)
高増加率群 (n=10)	293.8	18.8	5054.0	3.4
低増加率群 (n=6)	152.0	16.8	3034.2	3.5
全体 (n=16)	240.7	18.1	3800.3	3.4

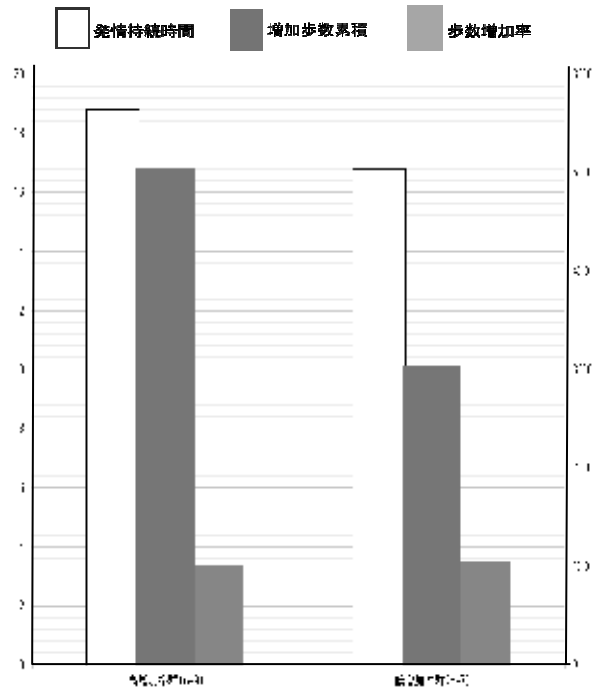


図3 OT 負荷試験による PGFM 増加率と発情の関係

考察

分娩後 PGFM は高値を示し、子宮の回復に伴ってその値が低下するとの報告があり⁹⁾今回の試験でも有意差は認められないものの低増加率群は高増加率群と比較して OT 負荷前の PGFM 値が高値であった。このことから低増加率群は高増加率群と比較して子宮の回復が遅い可能性がある。今回の試験では、有意ではないものの、子宮回復状況を調査したエコー検査及び子宮内膜の細胞診で比較的子宮回復の遅延が認められる検体において、PGFM 増加率が低い傾向であった(表6及び図3)。子宮内膜の細胞診においては、検体数を集積することにより受胎性評価との関連を明確に示すことが可能性であり、また、子宮の形態的評価と機能的評価が関連していれば、エコー検査や子宮内膜の細胞診により生殖器の機能的回復状況を推定できる可能性がある。

黒毛和種における分娩後の子宮修復は、分娩後40日

分娩後の黒毛和種における子宮の機能的回復状況推定方法の研究

程度必要であるとされており⁸⁾、乳用牛においてもエコー検査による子宮内貯留物が分娩後40日以降で観察された場合、その後の繁殖成績に影響を及ぼすことが報告されている¹⁰⁾。今回の調査では1頭を除いた全ての供試牛で40日以内に子宮内貯留物は消失していた。また子宮内膜の細胞診では分娩後40日以降においてPMN出現率が8%を超えると繁殖成績に影響があるとされているが、今回の検査では全ての供試牛において8%以下であった。しかしながら、子宮機能を推定するOT負荷試験では供試牛の43.8%でPGFMの増加率が低く、子宮の機能的回復が十分ではない可能性が示唆された。このため、OT負荷試験ではエコー検査や子宮内膜の細胞診では捉えられない機能的評価ができる可能性がある。

しかしながら、OT負荷試験は採血回数も多く、血漿

サンプルから抽出が必要であるなど、手技が煩雑であり、負荷から評価まで少なくとも1日を要する。エコー検査や子宮内膜の細胞診により子宮の機能的な回復状況の推定が可能であれば、リアルタイムでの診断が可能となる。

本研究の結果から、エコー検査や子宮内膜の細胞診により分娩後の子宮の機能的な回復状況の推定が可能であり、これを指標として適期受精を行うことで、受胎率を維持できることが示唆された。

謝辞

PGFMの測定及び解析については、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センターの伊賀浩輔先生に丁寧な御指導をいただきました。心より感謝いたします。

参考文献

- 1) KINDAHL, H., L. E. EDQVIST, A. BANE and E. GRANSTROM(1976)、Acta Endocrinol、82:134-149
- 2) PETERSON, A. J., R. J. FAIRCLOUGH, E. PAYNE and J. F. SMITH(1975)、Prostaglandins、10:675-684
- 3) NANCARROW, C. D., J. BUCKMEATER, W. CHAMLEY, R. I. COX, I. A. CUMMING, L. CUMMINS, J. P. DRINAN, J. K. FINDLAY, J. R. GKODING, B. J. RESTALL, W. SCHNEIDER and G. D. THORBURN(1973)、J. Reprod, Fertil、32:320-321
- 4) SHEMESH, M. and W. HANSEL(1975)、Proc. Soc. Exp. Biol. Med、148:123-126
- 5) 中原達夫(1988)、日本畜産学会報、59(2):107-116
- 6) Mayer H. H. Mittermeier T. and Schams D(1988)、Acta Endocrinol、118:96-104
- 7) 伊賀浩輔(2016)、第109回日本繁殖生物学会講演要旨集、J149
- 8) 岡野彰、福原利一(1980)、日本畜産学会報、51、284-292
- 9) 伊賀浩輔(2013)、日本胚移植学会雑誌、35(3)、117-122
- 10) 小山毅(2012)、北海道獣医師会雑誌、56:10-15

英訳表題

Study on estimation the recovery status the uterus functions in Japanese black cows after parturition

Summary

To establish a method for estimating the optimal time for artificial insemination in Japanese Black cows, we attempted estimation of the functional recovery status of the uterus by measured the kinetics of prostaglandin metabolites (PGFM) in the oxytocin (OT) challenge test. And it compared this results with ovarian findings and uterine reservoir scores by ultrasonography, and endometrial polymorphonuclear leukocyte (PMN) percentage by endometrial cytology. From these results, it was found that it is possible to estimate the recovery status of uterine functionality using an ultrasonography or endometrial cytology when performing artificial insemination. In addition, it was suggested that the conception rate could be maintained by performing artificial insemination using the recovery of uterine functionality as an index.