

黒毛和種受胎牛の超音波断層装置による卵巣所見と血液中progesterone濃度

上村 俊一・小野 雅幸・鮫島 秀暢*・榎元 勝治
浜名 克己・後藤 和文・柳田 宏一

(家畜臨床繁殖学研究室)

平成5年8月10日 受理

Ultrasonic Findings in the Ovaries and the Associated Concentrations of Plasma Progesterone in Japanese Black Cows Transferred with Frozen-Thawed Embryos

Shunichi KAMIMURA, Masayuki ONO, Hidenobu SAMESHIMA*, Shouji ENOMOTO,
Katsumi HAMANA, Kazufumi GOTO and Kouichi YANAGITA

(Laboratory of Veterinary Reproduction)

緒 言

わが国でのウシ胚移植は、1960年代に最初に報告されて以来、各地で試験研究が継続されているが、従来の人工授精に比べいまだ満足すべき成果に至っていない³⁾。一連の受精胚移植技術の中で、最終的な受胎率向上のためには、移植胚の品質もさることながら受胎牛における受胎率が大きな課題となっている。これまで受胎率向上に関する研究は数多く報告されているが、黒毛和種受胎牛の性周期を Prostaglandin $F_{2\alpha}$ で同調し、移植前後の卵巣所見を超音波断層装置により詳細に検討した報告は少ない。

今回、放牧主体飼養の黒毛和種に生体由来ウシ凍結胚を移植し、移植前後の卵巣所見を超音波断層装置により観察するとともに、血液中の progesterone 濃度を測定した。

材 料 と 方 法

供試牛は、本学農学部付属入来牧場に飼養されている黒毛和種34頭（未経産～8産次， 1.94 ± 2.73 産次；平均±標準偏差）で、いずれも放牧主体で飼養されている。供試牛は性周期を同調するため、1992年4月27日に第1回目の Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (Estramate, 住友製薬, 大阪；以下 PG と略) を500 μ g 筋肉内に投与し、第2回投与を5月11日に行っ

た。供試牛には尾根部に発情検知器（ヒートマウントディテクター）を貼付するとともに、原則として1日2回行動観察を行い、スタンディング発情や外部生殖器の変化を観察した。供試した受精胚は、いずれも生体回収由来凍結胚で、耐凍剤として1.8M エチレングリコール，1.6M プロパンジオール+0.2M シュクロースならびに1.36M グリセリン+0.25M トレハロースを用いた。供試牛のうち、5月20日、21日および22日の直腸検査により卵巣に黄体が存在した29頭について、ダイレクト法で移植した。しかし、29頭のうち1頭は、移植後の超音波診断により機能的な黄体ではなく、黄体嚢腫であることが判明した。

超音波断層装置は、Aloka SSD-210 DX（アロカ、東京）に5 MHz の探触子を装着して用い、卵巣や子宮の状態を観察するとともに、パラロイド Type 667 により写真撮影した。超音波断層装置による卵巣の観察では、卵胞の直径が2 mm 以上のものでは、その形状とおおよその位置が観察されたが、今回は直径が5 mm 以上の卵胞について検討した (Fig. 1)。卵胞は最大直径により3種類に分け、小卵胞：5～9 mm，中卵胞：10～14mm ならびに大卵胞：15 mm 以上として、それぞれの卵胞数を計測した。黄体は、その最大直径を超音波断層装置により計測した。移植後、発情日を0日として34日目に超音波断層装置により最初の妊娠診断を行い、41日目に2回目の診断を行った。受精胚を移植した29頭のうち、無作為に抽出した9頭（経産牛4頭，未経産牛5頭）

* 株式会社新日本科学，鹿児島郡吉田町宮之浦2438
Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., 2438
Miyanoura Yoshida-chou, Kagoshima-gun



Fig. 1. Ultrasonic appearance of multiple follicles in the ovary in a recipient cow. A large single follicle with 11 mm in diameter (follicle no. 7), three medium follicles with 5-9 mm in diameter (follicle no. 8, 9, 11) and seven small follicles with less than 5 mm in diameter (follicle no. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10) were observed.

について、発情後7週目、あるいは発情が回帰するまで毎週超音波断層装置により生殖器を観察するとともに、頸静脈より採血を行った。血液は遠心分離後、酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay, 以下EIAと略) によるEIAキットにより、血漿中のprogesterone濃度を測定した²⁾。得られたデータは、妊娠牛と非妊娠牛のそれぞれの平均値についてStudent's *t*-testにより統計的に解析した。

結 果

1. PGによる性周期の同調

第1回目のPG投与時における供試牛の性周期は、27頭が黄体期 (progesterone濃度 $6.73 \pm 2.84 \text{ ng/ml}$) で、7頭は非黄体期 (progesterone濃度 $0.66 \pm 0.14 \text{ ng/ml}$) であった。14日後の第2回投与時の性周期は、33頭が黄体期 (progesterone濃度 $7.02 \pm 1.68 \text{ ng/ml}$) で、非黄体期は1頭 (progesterone濃度 0.6 ng/ml) であった。PGの第2回投与後、2日～4日後に29頭で発情が見られ、発情時のprogesterone濃度は $1.44 \pm 1.46 \text{ ng/ml}$ であった。残りの5頭は無発情で、以後の試験から除外された。

2. 受精胚移植

29頭の供試牛について、発情後7日目に1～2個の凍結胚を黄体側子宮角にダイレクト移植した。超音波断層装置による妊娠診断では、移植側子宮角におけるエコーレベルの低い妊娠腔とその中に存在す

るエコージェニックな胎子を観察した。その結果、34日目の妊娠診断では12頭が受胎し、受胎率は41.4% (12/29頭) であった。しかし、41日目に実施した妊娠診断では受胎牛は9頭と減少し、残りの3頭では早期胚死滅が推測された。

妊娠牛と非妊娠牛について、受精胚移植時 (7日目) のprogesterone濃度を比較したところ、34日目の妊娠診断では妊娠牛 $7.06 \pm 1.02 \text{ ng/ml}$ と非妊娠牛 $6.54 \pm 2.84 \text{ ng/ml}$ 、および41日目の妊娠診断では妊娠牛 $7.37 \pm 0.93 \text{ ng/ml}$ と非妊娠牛 $6.48 \pm 2.63 \text{ ng/ml}$ となり、いずれも妊娠牛の平均値がわずかに高いものの統計的な有意差はなかった (Table 1)。耐凍剤の違いによる受胎率では、エチレングリコールで7/16頭 (43.8%)、プロパンジオール+シュクロースで4/8頭 (50.0%)、またグリセリン+トレハロースで1/5頭 (20.0%) と、前2者の成績がわずかに高かったが、有意差まではなかった。

3. 超音波断層所見

超音波断層装置により卵巣所見を継続的に観察した9頭のうち、受精胚移植により受胎した2141号牛と、移植後発情が回帰し、その後の人工授精で受胎した1677号牛についてFig. 2およびFig. 3に示した。発情時に存在した直径15mm (Fig. 2) と13mm (Fig. 3) の成熟卵胞は、7日目の移植時にはなく、同所に直径25mmと18mmの機能的な黄体が観察された。それに伴い血液中のprogesterone濃度も増加

Table 1. Plasma levels of progesterone on day of embryo transfer in pregnant cows and non pregnant cows diagnosed by ultrasonography on day 34 and on day 41 (day 0=estrus)

	Pregnancy diagnosis			
	On day 34		On day 41	
	No. cows (head)	Progesterone (ng/ml)	No. cows (head)	Progesterone (ng/ml)
Pregnant cows	12	7.06±1.02	9*	7.37±0.93
Non pregnant cows	17	6.54±2.84	20	6.48±2.63

Values are mean ± SD

*: Early embryonic death was suspected in 3 cows between day 34 and day 41.

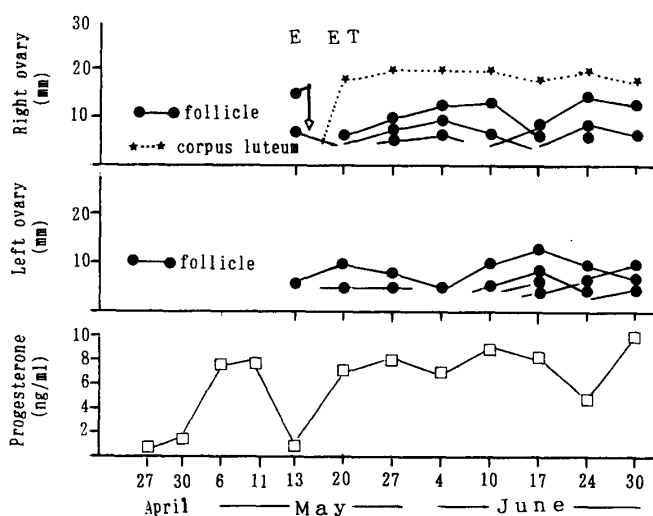


Fig. 2. Pattern of growth and regression of individual follicles with more than 5 mm in diameter and formation of corpus luteum observed by ultrasonography, and associated concentrations of progesterone in a pregnant heifer after embryo transfer on May 20 (Cow no. 2141). Arrow indicates ovulation.

E = estrus. ET = embryo transfer.

し、受胎した2141号牛では観察期間中高値を持続した。いっぽう、1677号牛では次回発情日に低下したが、人工授精後、新たに機能的な黄体が卵巣に形成されるとともに、再び progesterone 濃度が増加した。

超音波断層装置による継続的な観察から、卵巣では成熟卵胞以外に多くの卵胞が発育し、その後閉鎖退行することが判明した。そこで、妊娠した3頭と非妊娠の6頭について移植前後における卵胞数の推移と、黄体の最大直径ならびに progesterone 濃度を比較した (Table 2)。その結果、直径が5~9 mmの小卵胞は卵巣に常に2~4個あり、発情時には直

径が15mm以上の大卵胞が増える傾向にあった。しかし、妊娠牛と非妊娠牛ではその卵胞数に特に違いは見られなかった。黄体は最大直径がいずれも20 mm以上あり、非妊娠牛では次回発情予定日に直径が20mm以下となり、血液中の progesterone 濃度も低下した。妊娠牛と非妊娠牛では、発情後14日目と20日目の progesterone 濃度に有意差がみられた (P<0.05, P<0.01)。

考 察

受精胚移植の実用化のためには、最終的な受胎牛の受胎率向上が不可欠である。そこで34頭の黒毛和

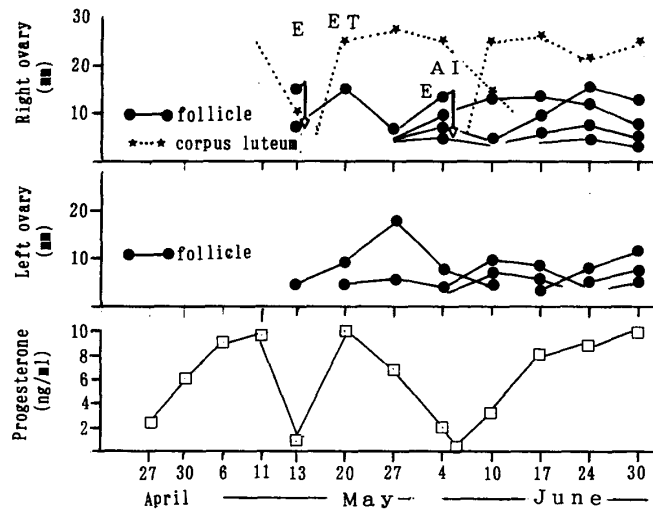


Fig. 3. Pattern of growth and regression of individual follicles with more than 5 mm in diameter and formation of corpus luteum observed by ultrasonography, and associated concentrations of progesterone in a non pregnant cow after embryo transfer on May 21 (Cow no. 1677). This cow was pregnant after the first AI on June 5. Arrow indicates ovulation. AI = artificial insemination. E = estrus. ET = embryo transfer.

Table 2. Number of follicles characterized with their diameter and maximum diameter of corpus luteum by ultrasound examination, and associated concentrations of plasma progesterone in pregnant cows and non pregnant cows after embryo transfer

		Estrus	Day ET	Day 14	Day 20	Day 27	Day 34	Day 41	Day 48
Pregnant cows (N=3)									
No. of follicles	F1	2.3	1.7	3.7	3.7	3.3	3.7	3.7	3.7
	F2	0.3	1.0	1.0	0.7	1.3	1.7	2.0	1.0
	F3	1.0	0	0	0.7	0.7	0	0.3	0.7
CL diameter (mm)		-	22.0	21.7	20.0	20.7	22.0	20.7	22.3
Progesterone (ng/ml)		1.0	7.7	8.1 ^a	8.5 ^a	9.2	8.3	5.1	9.2
Non pregnant cows (N=6)									
No. of follicles	F1	2.3	2.2	2.8	3.7	-	-	-	-
	F2	0.8	1.0	0.5	0.8	-	-	-	-
	F3	0.5	0.8	0.8	1.0	-	-	-	-
CL diameter (mm)		-	23.2	22.0	18.3	-	-	-	-
Progesterone (ng/ml)		1.2	5.9	4.6 ^b	0.8 ^b	-	-	-	-

-: not determined

F1: diameter of follicles = 5-9mm; F2: diameter of follicles = 10-14mm

F3: diameter of follicles \geq 15mm

Values followed by the different superscript in the same column are significantly different. Small letters: $P < 0.05$ and capital letters: $P < 0.01$.

種において、PGの2回投与により性周期を同調し、発情を示した29頭について凍結胚を移植したところ、超音波断層装置による34日目の観察では12頭(41.4%)が受胎していた。しかし、41日目では受

胎牛は9頭(31.0%)に減少し、残りの3頭についてはこの時点での早期胚死滅が推測された。一般に新鮮胚移植に比べ、凍結胚移植では受胎率がやや低下するとされ³⁾、また本試験では供試した胚の品質

に A~C ランクと幅のあることが低受胎率の要因と推測された。

妊娠牛と非妊娠牛の早期判別法として、次回発情予定日での血液中 progesterone 濃度の変動がある。卵巣における黄体の大きさと血液中 progesterone 濃度は相関することから⁴⁾、今回、超音波断層装置により黄体の直径を測定し、受精胚移植後の妊娠牛と非妊娠牛の違いを検討した。その結果、統計学的に有意差はないものの、次回発情予定日で妊娠牛の黄体直径 (20.0mm) が非妊娠牛 (18.3mm) より大きく、血液中 progesterone 濃度は妊娠牛 (8.5ng/ml) と非妊娠牛 (0.8ng/ml) に有意差がみられた ($P < 0.01$)。

ウシの性周期における卵巣を超音波断層装置により連日観察した成績では^{5,6)}、成熟卵胞以外の小卵胞や中卵胞においてその卵胞数や直径が特異的な変動を示す、いわゆる wave のあることが明らかにされた。また、卵胞数の変動を毎日観察したところ、妊娠牛では次回発情予定前に直径が 11~13mm の卵胞数が非妊娠牛より有意に増加したとする成績がある⁶⁾。そこで、今回卵胞を直径により 3 つに分類し、卵胞数の変動を検討したが、妊娠牛と非妊娠牛の間に明瞭な違いは見られなかった。これは今回の観察が 1 週間毎であり、また供試例数も妊娠牛 3 頭、および非妊娠牛 6 頭と少なく、そのため両者の違いが明瞭にできなかったものと思われる。妊娠の成立には、複雑な要因が関与しており、今後も超音波断層装置による生殖器の観察をより頻回に行うとともに、progesterone 以外の他の血液生化学的成分¹⁾や早期妊娠因子 (EPF) の測定⁷⁾ などにより、受胎牛の受胎率向上を図っていく必要がある。

今回、性周期を同調した黒毛和種に凍結胚を移植し、移植前後の卵巣所見を超音波断層装置により観察するとともに、血液中の progesterone 濃度を測定したところ、胚移植時の卵巣所見や progesterone 濃度には妊娠牛と非妊娠牛の間に差が見られなかった。しかし、次回発情予定日で非妊娠牛は黄体の直径が減少するとともに血液中の progesterone 濃度も低下したが、妊娠牛ではそれらの低下はなく、ほぼ一定で推移した。

要 約

黒毛和種に受精胚を移植し、移植前後の卵巣所見を超音波断層装置で観察するとともに、血液中 progesterone 濃度を測定し、妊娠牛と非妊娠牛の違

いを検討した。供試牛は放牧主体飼養の黒毛和種 34 頭で、Prostaglandin $F_{2\alpha}$ の 500 μ g を 2 週間間隔で 2 回投与し、性周期を同調した。その結果、29 頭が発情徴候を示し、発情後 7 日目に生体回収由来凍結胚をダイレクト法で黄体側子宮角に移植した。発情後 34 日目に超音波断層装置で妊娠診断をしたところ、12/29 頭 (41.4%) が受胎していたが、41 日目に再度診断したところ、9/29 頭 (31.0%) と減少した。妊娠牛と非妊娠牛について、受精胚移植時の血液中 progesterone 濃度を比較したところ、両者に差はみられなかった。受精胚移植後の卵巣所見では、妊娠牛は非妊娠牛に比べ次回発情予定日の黄体の最大直径が大きい傾向にあり、血液中 progesterone 濃度は有意に高かった。卵胞の直径により 3 つに分類した卵胞数の変動では、発情予定日に直径 15mm 以上の大卵胞が増加する傾向にあったが、性周期による変動は明瞭ではなく、また妊娠牛と非妊娠牛についても大きな違いは見られなかった。

謝辞 本研究の遂行に際し黒毛和種の管理および行動観察を担当して頂いた本学農学部付属入来牧場の紙屋茂枝官および片平清美技官に深謝するとともに、ホルモン測定に御協力頂いた本学家畜臨床繁殖学研究室の近藤晋君および斉藤美紀君に謝意を表す。

引用文献

- 1) Butler, W. R. and Smith, R. D.: Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, **72**, 767-783 (1989)
- 2) 上村俊一・大中美緒: EIA と RIA により測定した牛の血液中および乳汁中 progesterone 濃度。鹿大農学術報告, **43**, 63-67 (1993)
- 3) 金川弘司: わが国におけるウシ受精卵 (胚) 移植の現状と臨床応用。家畜診療, **350**, 5-11 (1992)
- 4) Kastelic, J. P., Bergfelt, D. R. and Ginther, O. J.: Relationship between ultrasonic assessment on the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*, **33**, 1269-1278 (1990)
- 5) Murphy, M. G., Boland, M. P. and Roche, J. F.: Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. *J. Reprod. Fertil.*, **90**, 523-533 (1990)
- 6) Pierson, R. A. and Ginther, O. J.: Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology*, **29**, 21-37 (1988)
- 7) Sakonju, I., Enomoto, S., Kamimura, S. and Hamana, K.: Monitoring bovine embryo viability with early pregnancy factor. *J. Vet. Med. Sci.*, **55**, 271-274 (1993)
- 8) Savio, J. D., Boland, M. P. and Roche, J. F.: Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. *J. Reprod. Fertil.*, **88**, 581-591 (1990)

Summary

In the Japanese black cows transferred with frozen-thawed embryos, a few ultrasonic findings made on the ovaries, and the associated concentrations of plasma progesterone were determined after examinations, and the obtained results were compared between the pregnant cows and the non pregnant ones. The estrous cycles of the 34 Japanese black cows were synchronized with the prostaglandin $F_2\alpha$ injections executed 2 times. And 29 cows showed estrus, and those were subjected to the embryo-transfer on the 7th day (day 0=estrus). On the 34th day 12 cows were diagnosed by ultrasonography to be pregnant (12/29=41.4%), whereas on the 41st day only 9 cows were fixed to be pregnant steadily (9/29=31.0%). In between the 34th day and the 41st day early embryonic deaths were suspected in 3 cows. On the embryo-transfer day, between pregnant cows and non pregnant ones no difference was noted in the concentrations of plasma progesterone. In the ultrasonic findings made on ovaries on the 20th day, or the second estrous day, in the pregnant cows there was a revelation of a larger diameter of corpus luteum (not significant), and higher concentrations of progesterone (significant) than those in non pregnant cows. Although the largest sized follicle with the diameters ≥ 15 mm tended to be increasing during the estrous period, the number of follicles characterized with their diameters varied without any significance, depending on the progression of the estrous cycle. There was no significant difference noted in the number of follicles between the pregnant cows and the non pregnant ones.