

## 乳用牛において胚移植前の発情期膣粘液検査による受胎率向上及び 0.5%ポビドンヨード高容量子宮内注入の黄体機能への影響

三好里美・傍示和・増川慶大・久保貴士・高橋和裕\*

### Improvement of conception rate by estrous cycle vaginal mucus test before embryo transfer of dairy cows and effect of 0.5% povidone iodine high-dose intrauterine injection on luteal function

Satomi MIYOSHI, Nodoka KATAMI, Keita MASUKAWA, Takashi KUBO, Kazuhiro TAKAHASHI

#### 要 約

A農場の乳用牛において、胚移植（以下ET）前の発情期に膣粘液検査（以下VMT）で膿汁混在が無いことを確認してETを実施したところ、VMT未実施でETを実施した場合の受胎率と比較し、有意差はなかったが37.2%から54.5%に上昇した。

また、発情期のVMTで膿汁混在があった個体に対し0.5%のポビドンヨード（以下PI）で治療し、7～8日後のET実施に向けて黄体機能への影響を調査した。当試験場において、発情期に0.5%PIを子宮内に133ml注入したところ、7日後の血中プロゲステロン（以下P）値は平均2.0ng/mlと、PI無処置の場合の平均3.8ng/mlより有意に低かった。また、A農場において、発情期のVMTで膿汁混在があった個体に0.5%PIを133ml子宮内に注入したところ、有意な差ではなかったが8日後の黄体形成（20mm以上）割合は6/15頭（40.0%）で、VMTで膿汁混在の無いPI無処置の場合の18/28頭（64.3%）より減少した。このことから、発情期のVMTで膿汁混在があった個体へ0.5%PI、133mlを子宮内に注入した場合、黄体機能が減退することが推察された。

#### 結 言

子宮内膜炎は繁殖成績を低下させる要因の一つとされている。子宮内膜炎の診断は子宮内膜細胞診が最も信頼性が高い検査手法であるが、手技の煩雑さ等からその実施率は低い<sup>1)</sup>。子宮内膜炎はVMTで膿汁混在を伴う臨床性子宮内膜炎と膿汁の排泄が認められない潜在性子宮内膜炎に区別される。臨床性子宮内膜炎は分娩後40日以降の約20%の牛に認められ、VMTで膿汁混在を確認することは臨床現場に適した検査手法であることが報告されている<sup>2)</sup>。一方、分娩後5週におけるVMTで膿汁の排泄が認められず、子宮内膜細胞診のみ陽性となる潜在性子宮内膜炎も28%存在するとの報告もある<sup>3)</sup>。しかし、粘液の分泌が亢進する発情期にVMTを実施することで、潜在性子宮内膜炎においても粘液への膿汁混在の発見率が高くなるとされている<sup>4)</sup>。

本県では、近年、乳用牛への和牛受精胚のETが増加しているが、ET前に黄体確認は行っているものの、VMTを習慣としている農場はない。

そこで、定期的にETを行っているA農場においてET前の発情期にVMTを実施し、膿汁混在のない個体のみをET対象とすることにより受胎率の向上を試みた。

また、発情期のVMTで膿汁混在があった個体に対し、PIで治療し7～8日後のET実施に向けて黄体機能への影響について調査した。注入するPIの濃度については2.0%では細胞毒性が強いことが報告されている<sup>5)</sup>。また、AI実施翌日のPI注入において、2.0%より0.5%の方が受胎率が高いことが報告されており<sup>6)</sup>、0.5%PIの子宮内膜への侵襲性は低いと推察されることから、使用するPIの濃度は0.5%とした。注入する薬剤量について、乳用経産牛の両子宮角の先端まで行き渡らせるには香川畜試報告55（2020）

乳用牛において胚移植前の発情期膣粘液検査による受胎率向上及び 0.5%ポビドンヨード高容量子宮内注入の黄体機能への影響

※香川県農政水産部畜産課

30～60ml で十分としているものの、細菌発育率低下には 0.5%PI では膿様貯留物の 10 倍量以上必要と報告されている<sup>7)</sup> ことから、今回、潜在性子宮内膜炎での注入量 60ml<sup>6)</sup> より多い 133ml を子宮内に注入し、黄体機能への影響について調査した。

## 材料及び方法

### 試験1

調査内容：A農場（乳用経産牛280頭飼養）の分娩後40日以上経過した経産牛において、黄体期にクロプロステノールC（フジタ製薬）2mlを筋肉内投与し2～3日後又は自然発情により外部発情兆候を示した個体に対し外陰部から膣鏡（富士平工業）を挿入し、VMTを実施した。VMTで膿汁混在が無いことを確認した個体に発情から8日後にETを実施し、VMT未実施で同様に発情から8日後にETを実施した場合の受胎率とFisherの正確検定で比較した。なお、受胎牛は超音波画像診断装置（sasi-scan, BCF社）を用い卵巣画像で黄体長径20mm以上の個体のみとした。また、用いた胚は体内受精新鮮胚のみとした。妊娠鑑定は胎齢28日以降に経直腸超音波診断により実施した。

試験区分：VMTで膿汁混在が無いことを確認した11頭（年齢 $5.1 \pm 2.0$ 、産歴 $3.5 \pm 2.0$ ）の受胎率を試験区、VMT未実施の43頭（年齢 $4.8 \pm 2.1$ 、産歴 $2.9 \pm 1.8$ ）の受胎率を対照区とした。

### 試験2

調査内容：当試験場の乳用経産牛5頭において、黄体期にクロプロステノールC（フジタ製薬）2mlを筋肉内投与し2日後の発情期にVMTを実施するとともに0.5%PIを133ml子宮内に注入し、7日後の血中P値を測定した。同一牛で0.5%PI無処置の場合の発情から7日後の血中P値を測定し両者をpaired t検定で比較した。なお、発情後の排卵は超音波画像診断装置（トリンガ リニア, Esaote社）により確認した。0.5%PIは動物用ネオヨジン液（ポビドンヨード2.0%, 共立製薬）33mlを生理食塩水（大塚製薬）100mlと混合し調製した。血中P値の測定は、尾静脈から採血して血清を分離し、測定時まで $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。P値の測定は、ECLIA法（福山臨床検査センター）で実施した。

試験区分：発情期に0.5%PIを子宮内に注入した5頭の7日後の血中P値を試験区、同一牛でPI無処置の発情から7日後の血中P値を対照区とした。

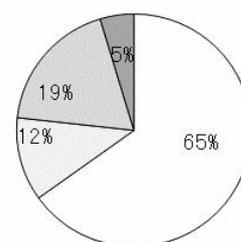
### 試験3

調査内容：A農場において、VMTにより膿汁混在があった個体に試験2と同様の方法で作成した0.5%PIを133ml子宮内に注入し、8日後に超音波画像診断装置（sasi-scan, BCF社）で黄体形成（長径20mm以上）割合を確認し、VMTで膿汁混在が無いPI無処置の場合とFisherの正確検定で比較した。

試験区分：0.5%PIを処置した15頭の黄体形成（長径20mm以上）割合を試験区、PI無処置の28頭の黄体形成（長径20mm以上）割合を対照区とした。

## 成 績

図1. 粘液検査結果



### 試験1

A農場において、ET前の発情期にVMT未実施で8日後に体内受精新鮮胚のETを実施した場合の受胎率は37.2%であった（表1）。A農場の経産牛43頭において、発情期に外陰部から膣

乳用牛において胚移植前の発情期膣粘液検査による受胎率向上及び 0.5%ポビドンヨード高容量子宮内注入の黄体機能への影響

鏡を挿入しVMTを実施したところ、膿汁混在が無かったのは28頭(65.1%)であった(図1)。

8日後に長径20mm以上の黄体があったのは18頭(64.3%)で、そのうち11頭について、同様にETを実施したところ受胎率は54.5%とVMT未実施の場合より高かった(表1)。なお、移植した胚の品質<sup>9)</sup>は表1のとおりである。

### 試験2

当試験場の供試牛5頭は発情期のVMTで膿汁混在は無かった。この5頭の発情期から7日後の血中P値(平均±標準誤差)は $3.76 \pm 0.89$ ng/mlであった。一方、発情期に0.5%PIを133ml子宮内に注入した場合の7日後の血中P値(平均±標準誤差)は $2.00 \pm 0.60$ ng/mlで有意に低かった(図2)。(p=0.039)

### 試験3

A農場において発情期のVMTで膿汁混在が無い28頭のうち、8日後に長径20mm以上の黄体があったのは18頭(64.3%)であった。一方、VMTで膿汁混在があった15頭に0.5%PIを133ml子宮内に注入したところ、8日後に長径20mm以上の黄体があったのは6頭(40.0%)と少なかった。(表2)。

表1 試験1の受胎率の比較

区分	ランク			計
	excellent	good	fair	
試験区 受胎率%	100	57.1	33.3	54.5
(受胎頭数/移植頭数)	1/1	4/7	1/3	6/11
対照区 受胎率%	33.3	31.2	55.6	37.2
(受胎頭数/移植頭数)	6/18	5/16	5/9	16/43

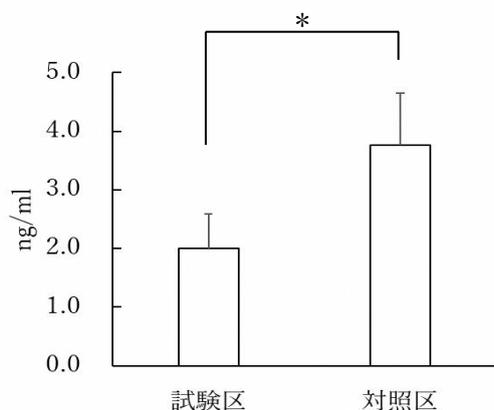


図2 試験2の血中P値の比較  
\*p<0.05

表2 試験3の黄体形成の比較

区分	黄体長径		計
	20mm以上	20mm未満	
試験区	6 (40.0%)	9 (60.0%)	15
対照区	18 (64.3%)	10 (35.7%)	28

## 考 察

A農場の乳用牛において、ET前の発情期にVMTを実施したところ、35%に膿汁混在が認められた。VMTの膿汁混在には膣炎や子宮頸管炎も存在するため必ずしも子宮内膜炎ではない<sup>3)</sup>が、今回ET対象から除外し受胎率向上を試みた。受胎牛の黄体形状は供用可能とされている黄体長径20mm以上<sup>8)</sup>の個体のみとした。また、使用する胚は体内受精新鮮胚のみとした。結果、症例数が少なく有意な差ではなかったが受胎率は37.2%から54.5%に上昇した。

さらに発情期にVMTで膿汁混在があった個体に対し、PIで治療し7~8日後のET実施に向けて黄体機能への影響について調査した。子宮内膜炎の治療としては、抗生剤やヨード剤の子宮内注入が多く行われている<sup>1)</sup>。特にヨード剤の注入は牛乳の出荷制限がないため使用しやすいが、子宮粘膜の炎症を誘起しPGF<sub>2α</sub>を産生して黄体退行作用を示すこと知られている<sup>10)</sup>。使用する濃度について2.0%PIは細胞毒性が強く<sup>5)</sup>、また1.0%PIでも性周期に変化を与えることが報告されている<sup>11)</sup>。一方、0.5%PIは潜在性子宮内膜炎が疑われる個体のAI実施翌日に60mlを子宮内に注入すると受胎率が向上するとの報告<sup>6)</sup>やETを行う全頭に発情日から2日以内に60ml注入すると受胎率が向上するとの報告がある<sup>12)</sup>ことから子宮内膜への侵襲性は低いと推察される。そこで、今回、臨床性子宮内膜炎における0.5%PIの子宮内注入について検証した。注入量については、細菌発育率低下には0.5%PIでは膿様貯留物の10倍量以上が必要との報告がある<sup>7)</sup>ことから、今回、膿汁排泄のない潜在性子宮内膜炎での注入量60ml<sup>6)</sup>より多い133mlを子宮内に注入し、黄体機能への影響について調査した。

ET前日及び人工授精5日目における血中P値は2.5ng/ml以上で受胎率が高いことが報告がされている<sup>13) 14)</sup>が、今回、発情期に0.5%PIを133ml子宮内に注入した場合の7日後の血中P値は平均2.00ng/mlでPI無処置の場合の血中P値の平均3.76ng/mlより有意に低かった。さらにA農場において、VMTで膿汁混在があった個体に0.5%PIを133ml子宮内に注入したところ、有意な差ではなかったが、8日後の黄体形成(20mm以上)割合は6/15頭(40.0%)で、VMTで膿汁混在のないPI無処置の場合18/28頭(64.3%)より減少した。黄体初期の子宮に対する機械的刺激は性周期を変化させることが報告されており<sup>15)</sup>、高容量のPI注入により黄体形成が抑制された可能性が推察された。また、成績は示していないが試験3において膿汁混在割合が高い個体ほど黄体形成が悪かった。今回、VMTで膿汁混在があった個体に0.5%PIを133ml子宮内へ注入した後の治癒状況も不明であり、子宮内の細菌感染が卵巣機能を低下させることも報告されている<sup>16) 17)</sup>ことから、試験3の結果については、子宮内膜炎が黄体形成を抑制した可能性もあると考えられた。

臨床性子宮内膜炎罹患牛へのPIの子宮内注入は、0.5%より2.0%の方が2週間後の子宮内膜細胞診における多形核好中球の割合が有意に低く、その後の初回AI受胎率も向上したとの報告があり<sup>18)</sup>、PIは有機物との接触で容易に失活するため、臨床性子宮内膜炎には2.0%PIの方が有効とされている<sup>19)</sup>。

以上より、発情期のVMTで膿汁混在が見られた個体に対しては7~8日後のETは一旦中止し、2.0%PI等で治療した後、発情期のVMTで膿汁混在がないことが確認できた新たな性周期でETを計画した方がよいと推察された。

## 引用文献

- 1) 大滝忠利, 乳牛の子宮炎・子宮内膜炎の診断・治療方法ならびにその問題点と対策—乳牛の子宮炎・子宮内膜炎に関する全国アンケート調査から—, 家畜感染症学会誌, 5巻, 3号, 99-111 (2016)
- 2) 大川洋明, 藤倉篤史, 乳用牛群における膣検査により診断した臨床性子宮内膜炎の罹患率と危  
香川畜試報告 55 (2020)

乳用牛において胚移植前の発情期膣粘液検査による受胎率向上及び 0.5%ポビドンヨード高容量子宮内注入の黄体機能への影響

- 險因子の検討, 産業動物臨床医誌, 7 (増刊号) 225-230 (2017)
- 3) 八木沢拓也, 臨床現場における子宮内膜炎の診断法の一考察, 家畜感染症学会誌, 6 巻, 4 号 19-26 (2017)
  - 4) 加茂前秀夫, 臨床繁殖学, 文永堂出版, 第 4 版, 313-317 (2011)
  - 5) 岩沢篤郎, 中村良子, ポビドンヨード製剤の細胞毒性とモルモット創傷部に対する影響, 感染症学雑誌, 77, 11, 948-956 (2003)
  - 6) 秋田真司, 潜在性子宮内膜炎に対する AI 後子宮内薬液注入-0.5%ポビドンヨードを中心に-, 家畜感染症学会誌, 6 巻 4 号, 27-33 (2017)
  - 7) 伊賀崎大, 三堂祥吾, 北原豪, 大澤健司, 牛子宮内膜炎治療薬としてのポリビニルピロリドンヨード液の最適子宮内注入濃度および量について-in vitro における検討, 第 108 回日本繁殖生物学会大会講演要旨集, 2-26 (2015)
  - 8) 村上司, 安達善則, 牛の胚移植における黄体と卵胞の共存する例および囊腫様黄体形成例の受胎牛としての適応性, Journal Reprod Dev, 40, j81-j86 (1994)
  - 9) 家畜人工授精講習会テキスト (家畜体内受精卵・家畜体外受精卵移植編) 日本家畜人工授精師協会 P86 (2013)
  - 10) 中原達夫, 百目鬼郁男, 山内亮, 牛におけるヨード溶液子宮内注入の性周期におよぼす影響 II. 黄体退行因子の産生時期, 家畜繁殖誌 21 巻 1 号, 1-6 (1975)
  - 11) 中原達夫, 百目鬼郁男, 乾純夫, 山内亮, 牛におけるヨード剤子宮内注入の性周期に及ぼす影響 I. 性周期の変化と子宮粘膜の炎症性変化の関連, 家畜繁殖誌 13 巻 2 号, 57-65 (1967)
  - 12) 山口英一郎, 井上彰, 兼重恵里, 佐藤弘泰, 高橋幸一, 増戸弘典, 森清之, 乳用種経産牛に対する 0.5%ポビドンヨード剤子宮内注入による受精卵移植受胎率向上の試み, 平成 30 年度家畜診療等技術関東地区発表会講演要旨 (2018)
  - 13) Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T, Kaneda Y, Pregnancy rate and blood progesterone concentrations on the previous day and the day of frozen embryo transfer in parous recipient cows of Japanese Black. J Reprod Dev 44, 413-419 (1998)
  - 14) 小林崇之, 堀川明彦, 笹木教隆, ホルスタイン種経産牛における活性酸素代謝産物 (d-ROMs 濃度) および血中プロゲステロン (P4) 濃度が人工授精の受胎率に及ぼす影響, 福井県畜産試験場研究報告, 7-12 (2016)
  - 15) 山内亮, 中原達夫, 金田義宏, 乾純夫, 牛における液状粘性物質子宮内注入の性周期に及ぼす影響, 家畜繁殖誌 12 巻 2 号, 58-65 (1966)
  - 16) E. J. Williams, D. P. Fischer, D. E. Noakes, G. C. W. England, A. Rycroft, H. Dobson, I. M. Sheldon, The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow, Theriogenology, 68, 549-559 (2007)
  - 17) W. S. Senosy, M. Uchiza, N. Tameoka, Y. Izaike, T. Osawa, Association between evaluation of the reproductive tract by various diagnostic tests and restoration of ovarian cyclicity in high-producing dairy cows, Theriogenology, 72, 1153-1162 (2009)
  - 18) Mido Shogo, Murata Nozomu, Rawy Mohamed Sadawy, Kitahara Go, Osawa Takeshi, Effects of intrauterine infusion of povidone-iodine on endometrial cytology and bacteriology in dairy cows with clinical endometritis. The Journal of veterinary medical science, May03 Vol. 78, issue(4), 551-556 (2016)
  - 19) 大澤健司, 総論: 牛の子宮修復過程と子宮内膜炎, 臨床獣医, 臨時増刊号, 第 36 巻第 7 号, 42-50 (2018)