



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

重軌馬における超音波画像検査を利用した卵巣・子宮の診断基準の策定

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-02-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 三木, 渉 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/77964

重挽馬における超音波画像検査を利用した
卵巣・子宮の診断基準の策定

2018年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科
(帯広畜産大学)

三木 渉

重軌馬における超音波画像検査を利用した
卵巣・子宮の診断基準の策定

三木 渉

目次

諸言.....	1
附) 図表.....	7

第1章

重鞍馬雌馬における交配適期の指標および GnRH 類似体ブセレリン単回投与が 排卵同期化と内分泌動態に及ぼす影響

1-1, 序論.....	13
1-2, 試験概要.....	15
1-2-1, 供試馬.....	15
1-2-2, ブセレリン投与量の検討.....	15
1-2-3, 試験方法.....	16
1-2-4, 採血.....	17
1-2-5, 内分泌動態の観察.....	17
・黄体形成ホルモン (LH).....	17
・卵胞刺激ホルモン (FSH).....	18
・エストラジオール-17 β (E ₂).....	19
・プロジェステロン (P ₄).....	20
1-2-6, 交配.....	21
1-2-7, 排卵確認.....	21
1-2-8, 妊娠診断.....	21
1-2-9, 統計学的解析.....	21
1-3, 結果.....	22
1-3-1, ブセレリン投与による排卵率.....	22
1-3-2, 排卵までの卵胞径および形状の変化.....	22
1-3-3, 排卵までの主席卵胞および子宮の浮腫像所見の推移.....	23
1-3-4, 排卵までの時間.....	24

1-3-5, 交配回数, 二排卵率, 受胎率.....	24
1-3-6, 内分泌動態.....	25
1-4, 考察.....	27
1-5, 小括.....	33
附) 図表.....	35

第2章

重軌馬雌馬における胚胞發育変化の特徴

2-1, 序論.....	45
2-2, 試験概要.....	47
2-2-1, 供試馬.....	47
2-2-2, 試験方法.....	47
2-2-3, 超音波画像検査.....	47
2-3, 結果.....	48
2-4, 考察.....	50
2-5, 小括.....	54
附) 図表.....	55
総括.....	61
謝辞.....	67
文献.....	68
学位論文要旨.....	79
Abstract.....	83

諸言

馬は人類において最も重要な家畜であり、過去から現在まで馬の従順性や機敏性から人類の友として認識されてきた[23]。馬は人とともに歴史を歩んできた家畜であり、日本には5世紀後半から6世紀にかけて、大陸から馬の文化が伝えられたとされている[34]。明治末から昭和初期までの日本には、約150万頭の馬が飼養されていた。戦前の馬の使役用途は、軍事、輸送（旅客、通信、物資・農産物・生産資材の運搬、造材搬出等）、農耕の3つが主要な使役用途であった。その中であって北海道は、馬産の最も盛んな地域の一つであり、現在においても北海道の全国シェアは、軽種馬の96%、農用馬の87%と圧倒的なシェアを誇っている[31, 32]。軽種馬とは、戦前の馬政計画上の定義で、品種ではサラブレッド（サラ系）、アラブ・アングロアラブ（アラ系）とされ、戦前では陸軍乗用馬、競走馬、戦後は主に平地競走馬として使役されている馬である[29, 38]。農用馬とは、品種の上では重種・中間種、使役目的では戦前は農用（農耕・役馬・輸送）に使役されていたが、今日では主に肉用、ばんえい競走用として使役され、もはや農用として農耕等に使役されている馬は稀である[38]。北海道は明治になってアメリカから西洋農法（プラウ農法）が導入され、北海道における農用馬の改良は、プラウやハローを牽引するための馬匹として、大型で強い牽引力を兼ね備えた馬への改良が行われてきた[28, 31]。終戦後は軍用馬に代わり、農耕馬や肉用馬としての需要から、より

大型で、より強い牽引力が求められ、海外からペルシュロン種、ブルトン種、ベルジャン種などの大型の馬が積極的に導入され品種改良が図られてきた[62]。昭和 22 年に始まった北海道のばんえい競馬の開催も農用馬の大型化に拍車をかける大きな要因となった[28] (Fig. 0-1.)。今日の重挽馬は、主にペルシュロン種、ブルトン種、ベルジャン種を掛け合せた交雑種であり、体重が 1 トンを超える世界最大級の馬、日本挽系種として認識されている[32] (Fig. 0-2.)。日本で用いられている馬の呼称は、過去に存在した国の機関である馬政局の提唱した軽種、中間種、重種、在来種の 4 種類がある[38]。現在は統計上では馬はその使役目的に応じて、軽種馬、農用馬、乗用馬、在来馬、肥育馬に区分され生産統計が報告されている[51]。日本国内の研究論文においては「重種」[52, 60]、あるいは「重種馬」とされているのが一般的であるが、本研究においては石井が提唱する「Heavy draft horses」の日本語直訳の「重挽馬」に統一して表記する[30]。

北海道主催の公営競馬「ばんえい競馬」は昭和 22 年、24 年から北海道 4 市（旭川・岩見沢・北見・帯広）で開催されてきたが、地方競馬の衰退から平成 19 年 4 月以降は帯広市単独開催となった[27, 37]。ばんえい競馬は、今なお重挽馬生産者の馬産への大きなインセンティブとして生産意欲を支え、北海道の馬文化の一つとして「北海道遺産」にも選定されている。一方では、馬肉（馬

刺し)の需要の高まりとともに、重挽馬を含めた肉用馬の消費者ニーズも高まってきているが、国内生産では全く不足しており、国内需要を満たすために国内生産頭数の2倍以上の馬が、カナダから生体輸入され国内で肥育された後に、国産高級馬肉(馬刺し)として流通している現状がある[36] (Fig. 0-3.)。日本では馬の食用文化に関しては地域性(九州, 北陸, 東北) (Fig. 0-4.)があるが潜在的な肉用馬としての需要は高く、効率的で安定的な重挽馬生産が求められている。しかし、潜在的需要の高まりとは逆に、近年の重挽馬の生産頭数は平成6年の約8,097頭をピークに、平成27年の1,101頭まで減少し、ばんえい競馬登録頭数も昭和55年の1,394頭から平成27年には716頭まで減少した現実がある[36]。種付け雌馬頭数に対する出生子馬頭数の比率(生産率)は平成6年の69%をピークに、繁殖雌馬飼養頭数の減少に伴い低下し、平成27年には48%と5割を下回るまで低下している[36] (Fig. 0-5.)。

重挽馬生産現場の背景として、飼養頭数の減少に伴い、畜産関係機関の馬専門担当者の減少、後継者不在による管理者の高年齢化、肥育馬の市場価格の変動が大きく重挽馬専業では畜産業としての経営が困難で、副業、趣味的な経営体系が大多数を占めている現状がある。また、飼養頭数の減少に伴い、獣医師が積極的に繁殖管理に接する機会も減少し、獣医学的な対応策が十分に発揮されず、個体価格の変動等の経済的事由も関わり、生産者や種馬管理者の経験に

基づいた非効率的な繁殖管理が主に行われている。さらに、少数の種馬が試情馬も兼ね、繁殖シーズン期間中は長距離輸送と頻回種付けによるストレスによる精液性状への悪影響や、衛生的な対応が不完全な状態での頻回交配が行われ、交配誘導性子宮内膜炎のリスクも高まってきている。このような背景が、重挽馬の生産効率低下の大きな要因となっていることが想定される。軽種馬の繁殖生理に関する研究は進んでいるが、重挽馬の特異な繁殖生理は明らかにされていない。そこで、第1章では、重挽馬の生産効率を向上させるために、その繁殖特性を明らかにし、1年1産を目指した生産効率を維持するための対応策を検討した。重挽馬の発情期の卵巢および子宮の形態的变化を超音波画像検査にて経時的に観察し、排卵前後の主席卵胞、子宮の形態的特徴を明らかにすることによって、重挽馬雌馬の適切な交配適期の指標を検討した。また、重挽馬における有効な排卵の同期化法を確立するために、重挽馬雌馬の排卵誘起を目的とした、GnRH類似体ブセレリン単回投与について、その効果と内分泌動態への影響を調査した。期間が限定された繁殖季節に効率的な繁殖管理を行う上で、馬は早期胚死滅の発生率が高く[6, 42, 46, 66]、早期の妊娠診断と胚胞の発育ステージに応じた的確な妊娠診断が要求される。しかし、重挽馬の妊娠ステージにおける胚胞発育の形態的特徴の報告はされていない。そこで、第2章では、超音波画像診断装置を用いて重挽馬の胚胞の発育変化の特徴を明らかにし、妊

娠診断のための標準像の検討と、触診では予測が困難な時期から胎齢予測の可能性の検討、および早期胚死滅や異常な胚発育を早期発見し、それらの鑑別診断の根拠を明確にすることを目的とした。

重挽馬の生産体系は、肉用馬としては肉牛生産と同様な効率的な繁殖管理技術が求められる。重挽馬の明らかにされていない繁殖特性を明らかにし、ばんえい競走馬、肉用馬、使役馬としての三面性を持つ重挽馬の生産体制を、獣医学的な対応策を通して我が国特有の馬生産産業として確立したいと考えた。

附) 図表



Fig. 0-1. Heavy draft horses running in Ban'ei horse rase.



Fig. 0-2. Japanese heavy draft mares.

The Japanese heavy draft mares is acknowledged as the largest horse in the world, weighing an average of approximately a ton.

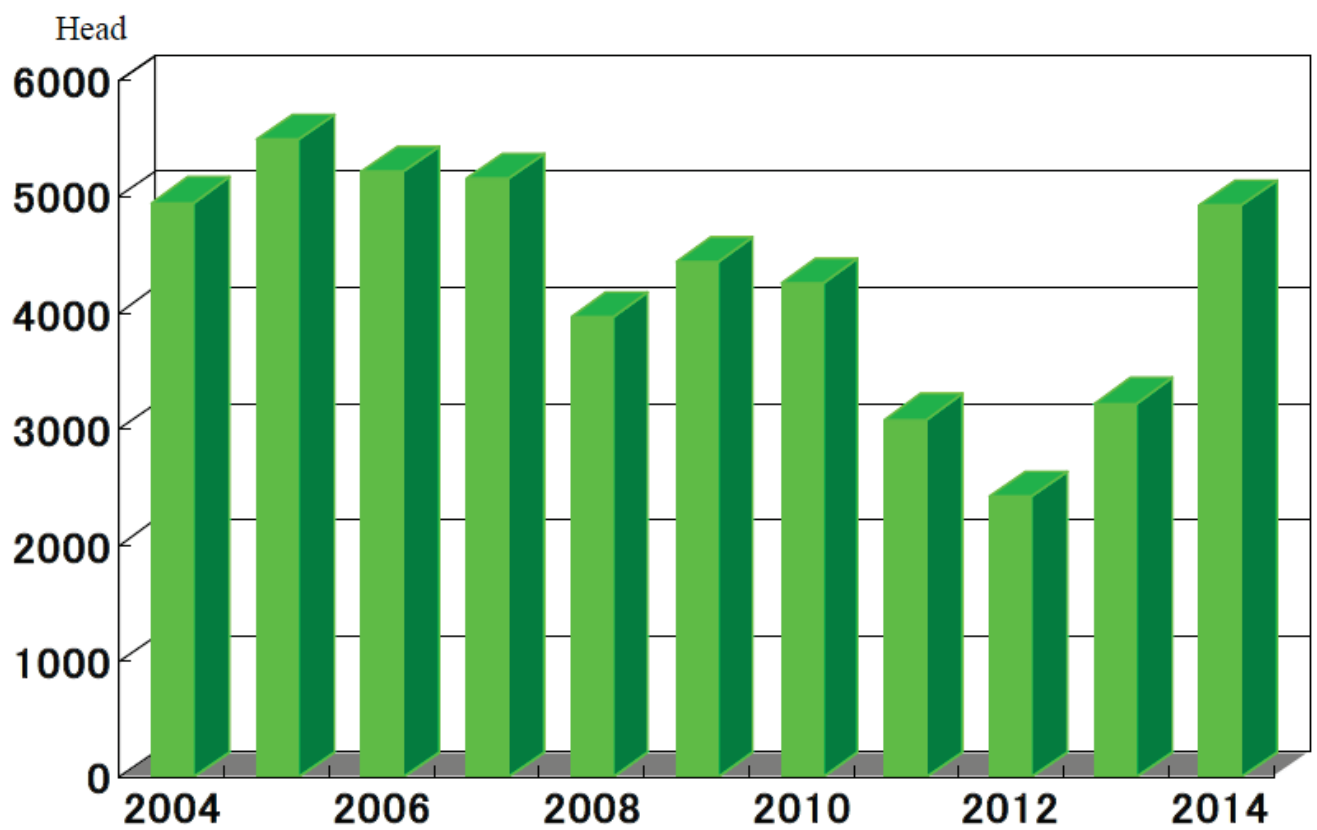


Fig. 0-3. Import number of beef horses from Canada.

(Cited from Japan Equine Affairs Association.)

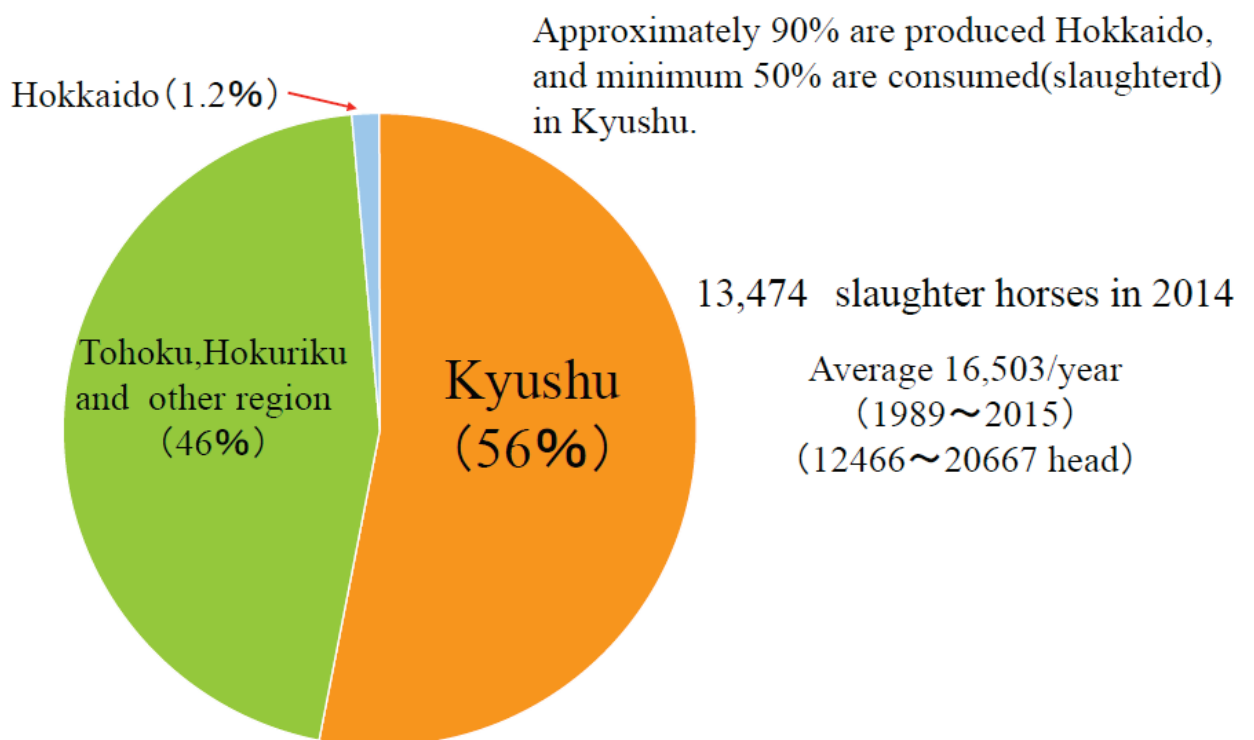


Fig. 0-4. The number of slaughter horses in 2014.
(Cited from Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.)

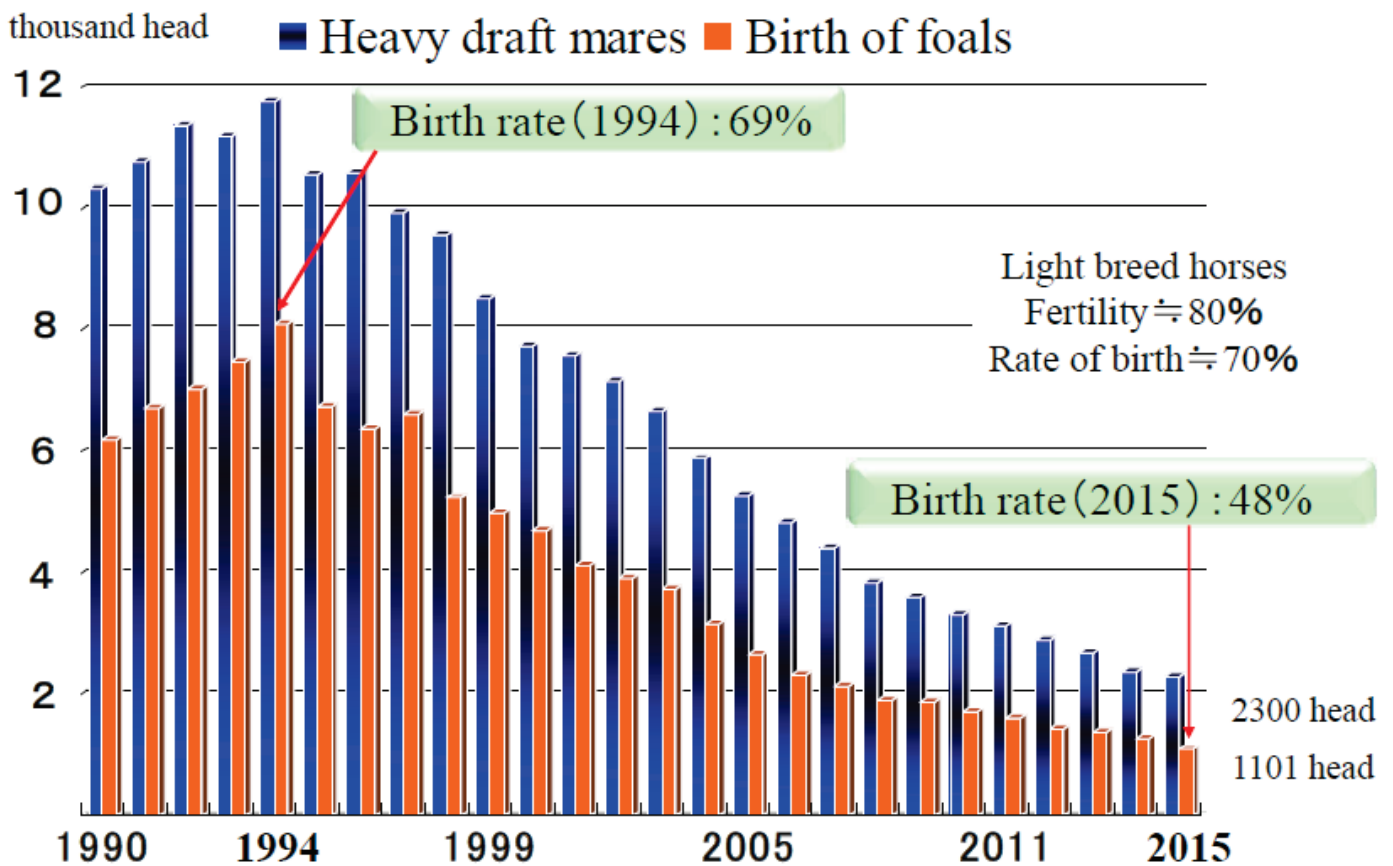


Fig. 0-5. Change in the number of breeding head of heavy draft mares and the number of birth rate of foals.
(Cited from Japan Equine Affairs Association.)

第 1 章

重鞭馬雌馬における交配適期の指標

および GnRH 類似体ブセレリン単回投与が排卵同期化と

内分泌動態に及ぼす影響

1-1. 序論

重挽馬は妊娠期間が 335～341 日と長く [2]，長日性の季節繁殖動物であるため交配時期が限定される。重挽馬の主要な生産地である北海道十勝の交配時期は 3～6 月に限定され，受胎の成否により重挽馬の生産性は大きく左右される。効率的な重挽馬生産のために，一発情一回の交配，または衛生的な人工授精による受胎が望ましいとされている。そのためには，交配適期の同期化が効果的であるが，重挽馬雌馬の発情期の主席卵胞および子宮の形態的特徴についての報告はなく，効果的な排卵の同期化に関する研究報告は少ない。

一般的に軽種馬の排卵誘起には，ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) が用いられている。直径 35mm 以上の卵胞に対して hCG1500～6000IU 投与し，48～72 時間以内に排卵が集中する高い排卵誘起効果が報告されている [10, 14, 22, 43, 45, 64]。hCG は安価で高い排卵誘起効果を示す反面，血中半減期が 30～36 時間と長く，複数排卵による双胎妊娠のリスク [54] や，抗体産生による反応性の低下が指摘されている [57, 61]。そこで，GnRH 類似体デスロレリンインプラント製剤 (Ovuplant™) による効果的な排卵誘起が試みられている [9, 12, 39, 41]。しかし，インプラント製剤の適応は不受胎の場合，下垂体性ダウンレギュレーションによる発情休止期や排卵間隔の延長が指摘され，排卵確認後インプラント製剤を除去することが推奨されている [12, 39]。また，日

本ではインプラント製剤は認可されていない。そこで、GnRH 類似体ブセレリン（以後ブセレリン）による排卵誘起が試みられ[4, 7, 25, 63]，ブセレリン単回投与による排卵誘起効果の報告がある[63]。一方で、ブセレリン単回投与は、LH の一過性の上昇を示すが、LH サージの持続には不十分であるとの報告もある[19, 43, 53, 56]。このため、ブセレリン 40 μ g を 12 時間間隔で 3~4 回反復投与によって、排卵までの時間の短縮が認められた報告 [61] や、ブセレリン 20 μ g 連続投与による排卵誘起効果の報告 [33] がある。軽種馬とは個体価値、使役目的が大きく異なる重挽馬の生産現場では、煩雑性と経済的理由からこのような排卵同期化は一般的ではなく、普及する可能性は低い。そこで本章では、超音波画像検査による重挽馬雌馬の発情期の卵巢（卵胞）、子宮の形態的变化を明らかにし、排卵時期予測の診断根拠と適切な交配適期の指標を示すと共に、経済的な排卵の同期化を目的とした、ブセレリンの単回投与による排卵誘起効果と、内分泌動態について調査することを目的とした。

1-2. 試験概要

1-2-1. 供試馬

ブセレリン投与量の検討には、北海道帯広市内 3 農場で飼養されている正常な発情周期を有する、未経産から経産（3～17 歳）の重挽馬雌馬、のべ 102 頭を用いた。

内分泌動態の観察と、発情期から排卵後までの卵巢（卵胞）、子宮の超音波画像検査による形態的特徴の観察は、北海道帯広市内 1 農場で飼養されている、正常な発情周期を有する未経産から異なる産次数の重挽馬雌馬 16 頭、のべ 22 頭を用いた。供試馬の年齢は 3～17 歳、平均 8.9 ± 4.7 (SD) 歳、産次数は 0～10 産（未経産 3 頭、経産 19 頭）、平均 3.2 ± 2.8 (SD) 産であった。

1-2-2. ブセレリン投与量の検討

連続する 2 繁殖シーズンの 4～6 月、正常な発情周期を有する重挽馬雌馬、のべ 102 頭に対して試情馬による発情徴候を示し、1～3 日間の経直腸超音波検査にて直径 45mm 以上の主席卵胞が認められた時にブセレリン[エストマール注、川崎三鷹製薬(株)、東京] $40 \mu\text{g}$ (n=31)、あるいは $20 \mu\text{g}$ (n=21) を頸部筋肉内投与し、同様の条件で観察した無処置群 (n=50) との 48 時間以内の排卵率の比較検討を行った。

1-2-3. 試験方法

ブセレリン投与量の検討結果よりブセレリン投与量を $40\mu\text{g}$ と設定し、超音波画像検査による発情期の卵巢（卵胞）、子宮の形態的变化を明らかにし、内分泌学的検索を目的として試験を実施した。また同時に、ブセレリン $40\mu\text{g}$ 単回投与による排卵誘起効果を検証した。

連続する2繁殖シーズンの4～6月、北海道帯広市内1農場に飼養され、正常な発情周期を有する未経産から異なる産次数の重挽馬雌馬16頭、のべ22頭を供試した。試情馬による発情徴候を示し直径45mm以上の主席卵胞が確認され、前日の検査記録に比べ子宮浮腫像の減少が観察された時に、ブセレリン $40\mu\text{g}$ を頸部筋肉内に投与した投与群 ($n=8$) と、同様の条件での観察時に、無処置で排卵まで観察した対照群 ($n=14$) において試験を行った。対照群の1例は分娩後15日、その他の例(21頭)は、分娩後29日以降の観察および空胎馬(4頭)における発情で観察を行った。投与試験は、総発情周期数を基に投与群、対照群をクロスオーバーデザインにより試験を実施した。

投与群は投与後、排卵確認まで6時間間隔、排卵後は48時間まで12時間間隔で卵胞（卵巢）、子宮の経直腸超音波検査を行った。対照群は、排卵確認後2日まで1日間隔で同様に卵胞（卵巢）、子宮の観察を行った (Fig. 1-1.)。卵胞および子宮の形態は、経直腸にて超音波診断装置[SSD-500, アロカ, 東京]に5MHz リニア型直腸検査用探触子 [UST-588-5, アロカ, 東京]を接続して検索し

た。描出された卵胞静止画像から任意の（長径+短径）/2を卵胞径として計測した（Fig. 1-2.）。

1-2-4. 採血

両群とも超音波検査に際し、ヘパリンナトリウム加真空採血管（Venoject II VP-H100K, テルモ（株），東京），および採血針（21 G × 1 1/2” needle MN-2138MS, テルモ（株），東京）を用いて頸静脈より採血した。採取した血液はすみやかに氷冷し，2時間以内に遠心分離し（12分，1,000×g），血漿を採取した。採取した血漿は，ホルモン濃度測定まで-30℃で冷凍保存した。

1-2-5. 内分泌動態の観察

黄体形成ホルモン（LH），卵胞刺激ホルモン（FSH）は東京農工大学家畜生理学研究室において二抗体RIA法を用いて定量を行った。エストラジオール-17β（E₂），プロジェステロン（P₄）は帯広畜産大学家畜生産衛生学講座宮本明夫研究室において二抗体EIA法を用いて定量を行った。

黄体形成ホルモン（LH）

血中LH濃度の測定は Hamada らの方法 [24] に準じた二抗体RIA法を用いた。標準液としてウシLH（USDA-bLH-B-5）を用いた。0.1% BSA-0.05M PBS（pH7.4）で希釈系列を作製し，100 μl ずつガラス試験管に分注し，1% BSA-0.05M PBS を50 μl

加え全量を150 μ lとした。同様に試験血漿50 μ lに1% BSA-0.05M PBS 200 μ lを加え、全量を150 μ lとした。次に第1抗体として抗ヒトLHウサギ血清 (YM#18) を用い、それを0.4% NRS-0.05M PBS (pH 7.4)で8万倍に希釈し、各試験管に50 μ lずつ分注し、断続3分間攪拌後、4°Cにて24時間反応させた。次にウマLHの¹²⁵I 標識抗原 (東京農工大学生理学研究室提供) を1% BSA-0.05M PBSで3500cpmに調整したものを50 μ lずつ分注し、断続3時間攪拌後、32°Cで24時間反応させた。更に第2抗体として抗ウサギ γ -グロブリンヤギ血清を50 μ lずつ分注して、断続3回攪拌後4°Cにて24時間反応させた。なお抗ウサギ γ -グロブリンヤギ血清は5%ポリエチレングリコール-0.05M PBS (pH 7.4)で200倍に希釈したものを使用した。反応後4°Cにて1700g/分で30分間遠心後上清を捨てて沈渣の放射活性を γ -カウンターで測定した。測定内変動係数は4.9%であった。また最小検出濃度は0.11ng/mlであった。

卵胞刺激ホルモン (FSH)

血中FSH濃度の測定は Hamada らの方法[24]に準じた二抗体RIA法を用いた。標準液としてウシFSH (USDA-bFSH-I-2) を用いた。0.1% Geratin-0.05M PBS で希釈系列 (0.02-10ng/100 μ l) を作製し、100 μ lずつガラス試験管に分注し、それ

に0.1% Geratin-0.05M PBS を200 μ l加え，全量を300 μ lとした。同様に試験血漿および血清100 μ lに1% Geratin-0.05M PBS 200 μ lを加え，全量を300 μ lとした。

次に第1抗体として抗ヒトFSHウサギ血清 (M91, Endocrine Service Limited , Bell Court, 69 High Street, Bidford on Avon, Warwickshire, B504BG UK) を0.4% NRS-0.05M EDTA-0.05 PBS (pH 7.4)で10万倍に希釈し，各試験管に100 μ lずつ分注し，断続3分間攪拌後，32°Cにて24時間反応させた。次に1% BSA-0.05M PBSで3500cpmに調整されたウマFSHの¹²⁵I 標識抗原 (東京農工大学生理学研究室提供) を50 μ lずつ分注し，断続3時間攪拌後32°Cで24時間反応させた。更に第2抗体として抗ウサギ γ -グロブリンヤギ血清を50 μ lずつ分注して，断続3回攪拌後4°Cにて24時間反応させた。なお，抗ウサギ γ -グロブリンヤギ血清は5%ポリエチレングリコール-0.05M PBS (pH 7.4) で200倍に希釈したものを使用した。反応後4°Cにて1700G/分で30分間遠心後，上清を捨てて沈渣の放射活性を γ -カウンターで測定した。測定内変動係数は13.5%であった。また，最小検出濃度は0.01ng/mlであった。

エストラジオール-17 β (E₂)

血漿中 E₂を抽出するために，血清 1 ml にジエチルエーテル 2ml を加え，60 分間攪拌した。攪拌後，室温に 30 分間静置した後，-30°C

の冷凍庫に移動し完全に凍結させた。その後、その上澄み部分の液を 5ml 試験管に移し、ドラフト内でウォーターバス内の温湯に浸し、水温を 30～60℃に上昇させながら、ジエチルエーテルを完全に揮発させた。揮発後、E₂用の assay buffer を 100 μ ml 加え、よく攪拌した後、2 抗体法 Enzyme immunoassay (EIA) を用いて測定した。この抽出法による E₂ の回収率は 85%であった。また、E₂ の EIA 標準曲線は 2～2000pg/ml の範囲で、ED₅₀ は 105pg/ml ，測定内変動および測定間変動はそれぞれ 6.5%および 7.6%であった。

プロジェステロン (P₄)

血清中 P₄ を抽出するために、血漿 200 μ ml にジエチルエーテル 1ml を加え、1 分間攪拌した。攪拌後、室温に 15 分間静置した後、E₂ と同様の方法で凍結、揮発をさせた。揮発後、試験管を冷却してから P₄ 用の assay buffer を 200 μ ml 加え、よく攪拌した後、EIA 法を用いて測定した。この抽出法による P₄ の回収率は 90%であった。また、P₄ の EIA 標準曲線は 0.05～50ng/ml の範囲で、ED₅₀ は 2.4 ng/ml ，測定内変動および測定間変動はそれぞれ 4.7%および 6.5%であった。

1-2-6. 交配

試験期間中，供試馬は試験農場で繋養されている種雄馬によって，試験とは独立して試情馬の反応に応じて，種馬管理者の判断で種雄馬による自然交配で行われた。

1-2-7. 排卵確認

排卵確認は，直腸検査および経直腸超音波検査にて行った。直前の検査で確認された主席卵胞が，直腸検査で触知されず，超音波画像検査にて出血体が確認されたことによって排卵とした。交配回数と，初回排卵から48時間以内に新たに排卵が確認された場合を2排卵として，2排卵率を比較した。

1-2-8. 妊娠診断

排卵確認日を0日として，排卵後14日と21日に経直腸超音波検査による胚胞確認による妊娠診断を行った。2回とも胚胞が確認され，胚死滅が確認されなかったことで妊娠陽性と診断し，両群における受胎率を比較した。

1-2-9. 統計学的解析

結果は平均値±標準誤差で示した。主席卵胞径は継続して計測し，ANOVAの分散分析により，卵胞径の変化について投与群と対照群との間で有意差検定を行った。群間での排卵率と妊娠率の相違はフィッシャーの正確率検定，交配回数

はウェルチの t 検定，二排卵率は カイ二乗検定を行った。すべての統計処理にはコンピューターのソフトウェア Stat View を使用し，5%未満の危険率で有意差ありとした。

1-3. 結果

1-3-1. ブセレリン投与による排卵率

48 時間以内の排卵率はブセレリン 40 μ g 投与群で 90.3% (28/31) ，ブセレリン 20 μ g 投与群は 71.4% (15/21) ，無処置群では 56% (28/50) であった (Fig. 1-3.)。ブセレリン 40 μ g 投与群の 48 時間以内の排卵率が，無処置群に比べて有意 ($P < 0.01$) に高かった。

1-3-2. 排卵までの卵胞径および形状の変化

排卵前 5~1 日までの平均卵胞径の推移を Fig. 1-4. に示した。対照群および投与群における，排卵前 3 日の卵胞径はそれぞれ 45.7 ± 1.1 mm (n=9) および 47.0 ± 1.6 mm (n=7) であり，排卵前 1 日に 50.3 ± 1 mm (n=14)，および 52.1 ± 1.9 mm (n=8) まで成長し排卵に至った。投与群と対照群の卵胞径は排卵に向け約 24 時間で 3~5mm 成長したが，卵胞発育に伴う卵胞径は両群間に有意な差は認められなかった。6 時間間隔で観察を行った投与群の 8 例において，6 例 (75%)

は排卵前 24～6 時間で卵胞は球形から楕円形，円錐形，または洋梨状への形態的变化が認められ排卵したが，2 例（25%）は球形のまま排卵に至り，明らかな形態的变化を呈することなく排卵に至る例も存在した。

1-3-3, 排卵までの主席卵胞および子宮の浮腫像所見の推移

典型的な一例における主席卵胞の確認から排卵までの主席卵胞と，子宮の浮腫像の超音波画像を Fig. 1-5. に示した。この例では排卵前 10 日に黄体と 35mm の主席卵胞が確認され，この時，子宮体および子宮角部は均一な高輝度像を呈し，典型的な黄体期の子宮像として確認された。排卵前 4 日では主席卵胞は卵胞径 40mm に成長し，子宮の浮腫像は最も明瞭になり，排卵前 2 日には子宮の浮腫像の減少傾向が認められた。この期間，主席卵胞は 1 日に約 3～5mm 成長し，排卵前 12～6 時間では主席卵胞は 60mm 以上に成長し，球形ではなくわずかに楕円形を呈し，子宮の浮腫像はほぼ消失していた。排卵前 6 時間以内では卵胞壁はさらに高輝度エコー域の二重構造が確認された後に排卵に至り，排卵後は主席卵胞が存在した部位は出血体として均一な高輝度像域として確認された。また，排卵 24 時間以内の卵胞で卵胞液中に小さな高エコー粒子像が散見され，卵胞壁の高輝度像化が確認された。

1-3-4. 排卵までの時間

供試馬の 24 時間間隔での排卵率を Fig. 1-6. に示した。排卵確認までの時間は投与群が 6～48 時間，平均 29 ± 9 (n=8) 時間，対照群が 12～120 時間，平均 59 ± 7 (n=14) 時間であった。投与群では 48 時間以内の排卵率が 100% (8/8) で，非投与群の 57.1% (8/14) に比べ高い傾向が認められた ($P \div 0.051$)。投与群では 6 時間以内に排卵が確認されたのが 37.5% (3/8)，また 42～48 時間が 62.5% (5/8) と 2 群に分かれた。対照群では 48～72 時間後に排卵したのは 1 頭 (7.1%) のみで 5 頭 (35.7%) は 72 時間以上経過した後に排卵に至った。

1-3-5, 交配回数, 2 排卵率, 受胎率

一発情あたりの交配回数は対照群では 1～3 回，平均 1.6 ± 0.2 (n=14) 回，投与群では 1～2 回，平均 1.8 ± 0.2 (n=8) 回で両群に有意な差は認められなかった。対照群では 3 回の交配が 3 例あったが，投与群では 2 回以上交配される例はなかった。投与群の 48 時間以内の 2 排卵率は 37.5% (3/8) で，対照群の 28.6% (4/14) に比べ高い傾向がみられたが有意な差は認められなかった。受胎率は投与群，対照群ともに 50% (4/8 および 7/14) で両群に差はなく，双胎妊娠も認められなかった。交配回数，複数排卵率，受胎率を Table 1-1. に示した。

1-3-6, 内分泌動態

投与群はブセレリン投与日, 対照群は投与群と同様に 45mm 以上の卵胞, 子宮浮腫像の減少が認められた日を 0 日とし, 排卵前 3 日から 4 日までの LH, FSH, プロジェステロン, エストラジオール- 17β の推移を Fig. 1-7. に示した。投与群における値は開始日と同じ時間の値, もしくは前後の平均を用いて 1 日 1 値として解析した。

LH の推移は対照群では, 0 日に 1.8 ± 0.4 (n=13) ng/ml から漸増し, 3 日には 3.0 ± 0.5 (n=11) ng/ml に上昇, 4 日に 2.6 ± 0.6 (n=9) ng/ml と減少に転じた。一方, 投与群では 0 日まで対照群と類似して推移し, ブセレリン投与時に 1.6 ± 0.3 (n=8) ng/ml を示したが, 投与後 1 日に 3.6 ± 1.5 (n=8) ng/ml に一過性に上昇し, 2 日には 1.7 ± 0.5 (n=8) ng/ml に減少した。

FSH の推移は対照群では, 排卵前 3 日から 1 日までは 2.0 ng/ml の近値で推移し, 2 日から増加に転じ 4 日に 5.6 ± 1.6 (n=9) ng/ml に増加した。一方, 投与群は 0 日に 2.1 ± 0.5 (n=8) ng/ml から 2 日に 3.1 ± 0.7 (n=8) ng/ml と一過性に増加し, 4 日に 2.3 ± 0.5 (n=6) ng/ml に減少し, 対照群に対して低値であったが有意な差は認められなかった。

P_4 の推移は投与群, 対照群とも排卵前 3 日から 1 日にかけて 0.5 ng/ml 以下の基底値で推移し, 2 日から 3 日に両群増加に転じ, 投与群で 4 日に $2.2 \pm$

0.5 (n=6) ng/ml, 対照群で 1.1 ± 0.3 (n=9) ng/ml に増加した。排卵が 48 時間以内であった投与群の P_4 は高い傾向であったが, 対照群との間に有意な差は認められなかった。

E_2 の推移は, 対照群は排卵前 3 日から増加し 2 日に 7.2 ± 2.2 (n=14) pg/ml とピークに達し, 3 日に 3.6 ± 0.7 (n=12) pg/ml と減少した。投与群では 0 日に 5.6 ± 1.4 (n=8) , 3 日に 2.5 ± 0.8 (n=6) pg/ml に減少した。両群ともに排卵確認前後に低下する傾向が認められた。

1-4. 考察

馬の排卵時期予測の指標として、主席卵胞径と子宮の浮腫像所見が有用であるとされている[8, 45, 55, 59]。馬の排卵前の卵胞径は約 35~50mm とされ、季節や馬の種類によって変動がある [58]。本研究において、世界最大級の馬として認識されている、日本輓系種（重輓馬）の排卵前の卵胞径は 50mm 以上で、60mm 以上に達する主席卵胞も認められ、報告されている馬の平均的な卵胞径より 10~25mm 大型であった。また、日本の重輓馬における排卵前の卵胞径に関する報告[35]とほぼ一致していた。馬の主席卵胞の直径は排卵時期を予測する最も有力な指標の一つである。馬の主席卵胞は、平均 7.5 日かけて発育し [13] , 牛と異なり長時間かけて成熟卵胞へと成長する。しかし、排卵直前の馬の卵胞の直径は 30~60mm と個体差が大きいことが報告されている[8]。試験期間中に供試馬も含めて観察することのできた、のべ150頭の排卵24時間以内の主席卵胞の直径は 53.8 ± 5.4 mm で、重輓馬の排卵前の主席卵胞の直径は約 50~60mm で軽種馬より大型であった (Table 1-2.)。サラブレッド雌馬において最大卵胞の直径が 40mm 以下のものの排卵率は 81.3%, 50mm 以上のものでは 97.4%と、発育とともに排卵率の増加が認められる[45]。重輓馬雌馬においては 40mm 以下で排卵することは極めて稀であり、重輓馬の排卵時の主席卵胞の直径は 50mm 以上であるといえる。

長日性季節繁殖動物である馬は繁殖期間中、時期により発情持続時間に差があることが知られているが 4 月、5 月、6 月では排卵前 24 時間以内の主席卵胞の直径に差は認められなかった (Table 1-2.)。

排卵前の卵胞形状は 84%が球形から円錐、洋ナシ状等に形状の変化が認められ、16%が球形の状態まで排卵に至った軽種馬の報告がある [55]。6 時間間隔で観察を行った投与群において、排卵前 6 時間に球形を呈していたのは 2 例 (25%) で、6 例 (75%) は、排卵前 24~6 時間は球形から楕円形、円錐形、また洋梨状への卵胞形の形態的变化が認められた。排卵 24 時間以内の卵胞壁で、エコー輝度の増加がみられた例は卵胞内圧の変化による影響と考えられ、卵胞液中の小エコー粒子像の確認は排卵前の出血に起因するものと考えられた。このような現象は必ずしも排卵と結びつく現象ではなく、出血が継続して出血性無排卵卵胞 (HAF: Hemorrhagic Anovulatory Follicle) も知られ、このような現象が確認された場合は、正常な排卵か否かの鑑別診断を考慮する必要がある。卵胞の形態的变化は排卵前 7 日にも認められる (3%) [55] ことから、卵胞の形態的变化のみで排卵時期を推測することは、適切ではない場合も存在する。軽種馬において子宮の浮腫像は排卵前約 3 日に最も明瞭になり排卵前 1~2 日に減少し、排卵時期の有力な指標とされている [8, 20, 26, 45]。しかし、繁殖シーズン移行期の排卵を伴わない発情においても 64%に子宮の浮腫像が認められ

[65], また, 子宮内膜炎において高度な浮腫像が認められる[58]ことから, 子宮の浮腫像所見のみで排卵の時期を判定することも適切ではない。このようなことから, 主席卵胞の直径および形状, 子宮の浮腫像の程度と合わせて生殖器の直腸検査所見(子宮の硬度), 外子宮口(弛緩), 外陰部の外貌所見(弛緩)を総合的に判断し, 交配適期を判断することが望ましいといえる。ブセレリン投与時期を 45mm 以上の主席卵胞を有し, 子宮の浮腫像の減少時に設定したところ 48 時間以内の排卵率は 100%であり, 36 時間以内が 37.5% (3/8), 36~48 時間が 62.5% (5/8)と 2 群に分かれた。36 時間以内に排卵が確認された群は, 投与時すでに排卵に近似した内因性のホルモン動態であったことが推測される。排卵が 36~48 時間に集中する傾向が認められたことは, ブセレリン投与による LH, FSH の一過性の上昇が卵胞の成熟を早め, 排卵を促進したと推測される。35mm 以上の卵胞を有する軽種馬への hCG 投与においても, 排卵が 36 時間前後に集中する傾向があるとの報告 [64] と同様な傾向が認められた。馬は複数排卵率が高く, 特にサラブレッド種では 37.2%に 2 排卵が認められ, 早期妊娠診断(排卵後 13~16 日)において 16.2%に双胎妊娠が認められている [50]。本試験では 2 排卵率が投与群で高い (37.5%) 傾向にあったが, 両群の受胎率はそれぞれ 50% (4/8, 7/14) で差はなく, 危惧された双胎妊娠例は認められなかった。

頻回交配が常態化している重挽馬生産において、交配回数の低減は交配誘導性子宮内膜炎のリスクを低下するうえでの課題である。試験期間中、両群とも種馬管理者の判断で種雄馬による自然交配が行われ、交配回数に有意な差は認められなかった。しかし、対照群では一発情3回交配が3例あったが、投与群では3回交配はなく全て2回以内であった。頻回交配を避けることは交配誘導性子宮内膜炎のリスクを低下し、種雄馬の負担軽減による利活用の促進に有用であると考えられる。

ブセレリン単回投与による内分泌動態の変化は、対照群と比較してLH, FSHにみられた。対照群のLHは排卵3日前より漸増し、排卵1~2日後にピークに達し、報告されている軽種馬のLH分泌パターンと近似していた[40, 47]。一方、投与群では投与6~24時間に一過性の上昇を示したのち低値で推移した。ブセレリン投与によりLH分泌が促進され、性腺刺激ホルモン分泌細胞が脱感作状態にあるか、LH分泌に負のフィードバックが働いていることが推察された。

馬の排卵前後におけるFSHは、対照群と同様に排卵後に上昇を開始する内分泌動態が知られている[11]。しかし、投与群では投与1~2日後に一過性の上昇を示し、排卵後は低値で推移した。ブセレリン投与によるFSH分泌刺激によるLHの推移と同様の作用が推察された。

プロジェステロンは排卵まで基底値で推移し、排卵後24~36時間に上昇し5

～7日に最大に達するとされ[40, 49], 両群ともに同様の推移を示した。投与群では排卵が全て投与後48時間以内に確認され, 投与後4日のプロジェステロン値は高かったことから, ブセレリン投与後の黄体形成に対する内分泌的影響はないものと推察される。

エストラジオール-17 β の推移は, 減少傾向に転じて排卵に至り, 報告されている軽種馬のエストラジオール-17 β 分泌パターンと近似していた [21, 40]。排卵前のhCG投与によって, エストラジオール-17 β の減少と卵胞発育の停止との関連が指摘されている[15]。エストラジオール-17 β は大型卵胞の顆粒層から分泌され, 卵胞の発育と成熟に密接に関与している。子宮の浮腫像所見が減少する時期は, エストラジオール-17 β が減少に転じ排卵に向けた卵胞成熟の指標となりうる。本研究においてもエストラジオール-17 β が減少傾向で排卵が認められたことから, エストラジオール-17 β の動態が子宮の浮腫像に関与していることが推察された。

本研究ではブセレリン投与群の48時間以内の排卵率が100%であり, 重挽馬雌馬が直径45mm以上の主席卵胞を有し, 子宮の浮腫像が減少傾向を示した時を客観的な交配適期とし, この時期におけるブセレリン40 μ g単回投与が排卵同期化に有用であることが明らかになった。さらに, 排卵誘起により, 交配回数を減らすことは交配誘導性子宮内膜炎のリスクを低減し, 重挽馬の効率的,

衛生的な繁殖管理技術の一つとなりうることが推察された。さらに、重軌馬の生産現場への獣医師の積極的な関与による、人工授精技術の普及に結びつことが示唆された。

1-5, 小括

重挽馬雌馬の発情期の主席卵胞，子宮の形態的変化を超音波画像検査により経時的に観察し，ブセレリンの単回投与が排卵と内分泌動態に及ぼす影響を検討した。重挽馬の排卵 24 時間以内の主席卵胞の直径は 53.8 ± 5.4 mm で，排卵前の主席卵胞の直径は軽種馬より大型であった。また，子宮の浮腫像は排卵前に減少もしくは消失が確認された。重挽馬雌馬 22 頭をブセレリン投与群 (n=8) ，対照群 (n=14) に分類し，試情馬による発情徴候を示し，45mm 以上の主席卵胞が存在し，前回検査所見と比較して子宮の浮腫像の減少が認識された時を交配適期として，ブセレリン $40 \mu\text{g}$ を頸部筋肉内投与した。経時的に経直腸超音波画像検査による卵胞，子宮の観察と血中 LH，FSH，プロジェステロン，エストラジオール- 17β を測定した。その結果 48 時間以内の排卵率は投与群 100% (8/8) で，対照群 57, 1% (8/14) に比べ高く (P=0.051) ，排卵確認までの平均時間は投与群 29 ± 9 (SEM) 時間で，対照群の 59 ± 7 (SEM) 時間より短時間で排卵に至った。交配回数，二排卵率，受胎率は両群に差は認められなかった。ブセレリン投与後 1~2 日に LH，FSH は一過性に上昇し，対照群における LH は排卵時に高く，FSH は卵胞の成長に伴い一過性の上昇が認められた。45mm 以上の主席卵胞を有し，子宮の浮腫像が減少傾向を示した時を重挽馬雌馬の適切な交配適期とし，ブセレリン $40 \mu\text{g}$ 単回投与は排卵誘起効果を有し，排卵の同期化に有用

であることが推察された。

附) 図表

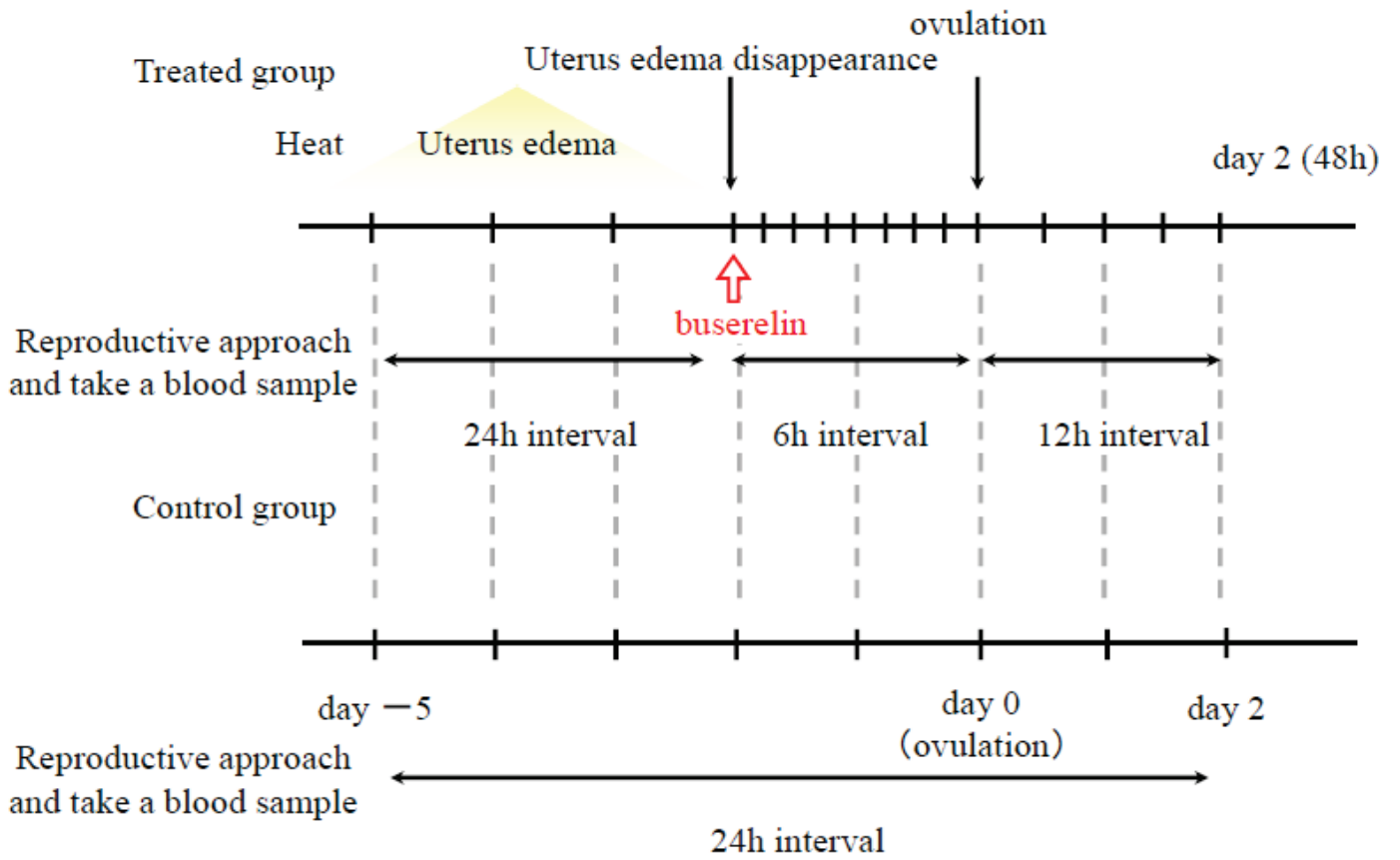
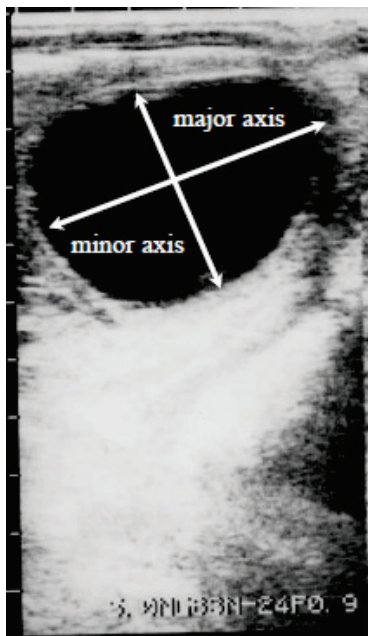


Fig.1-1. Outline of experiment.



Dominant follicle diameter

$$= \frac{\text{major axis} + \text{minor axis}}{2}$$

Fig.1-2. Measure of dominant follicle diameter.

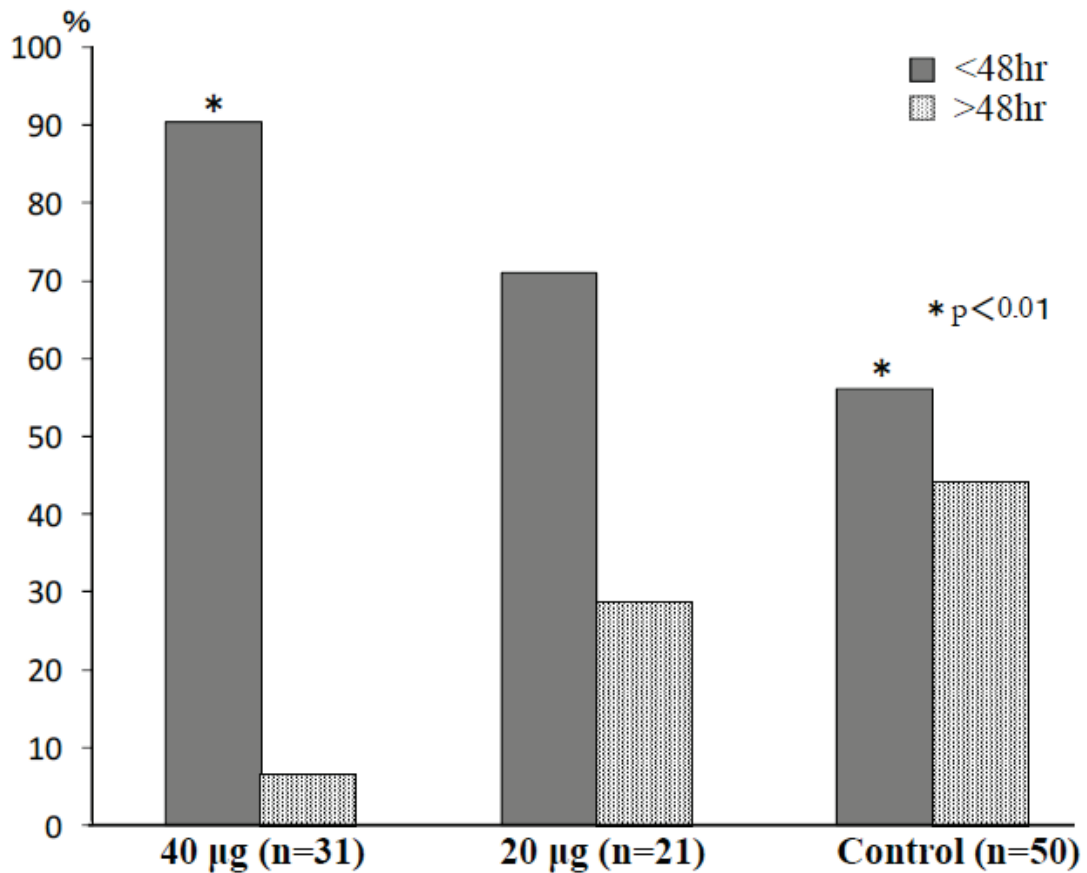


Fig.1-3. Comparison of the ovulation rate of the control mares and those administered 40 and 20 µg buserelin.

A dose of 40 or 20 µg buserelin was intramuscularly administered when mares presented signs of estrus to a teaser stallion and dominant follicles reached more than 45 mm in diameter. The ovulation rate within 48 hr in the control group was evaluated under the same conditions. The ovulation rate within 48hr after administration of 40µg buserelin was significantly higher than that of the control group, comparison between the 40µg buserelin group and control group. *p < 0.01 for

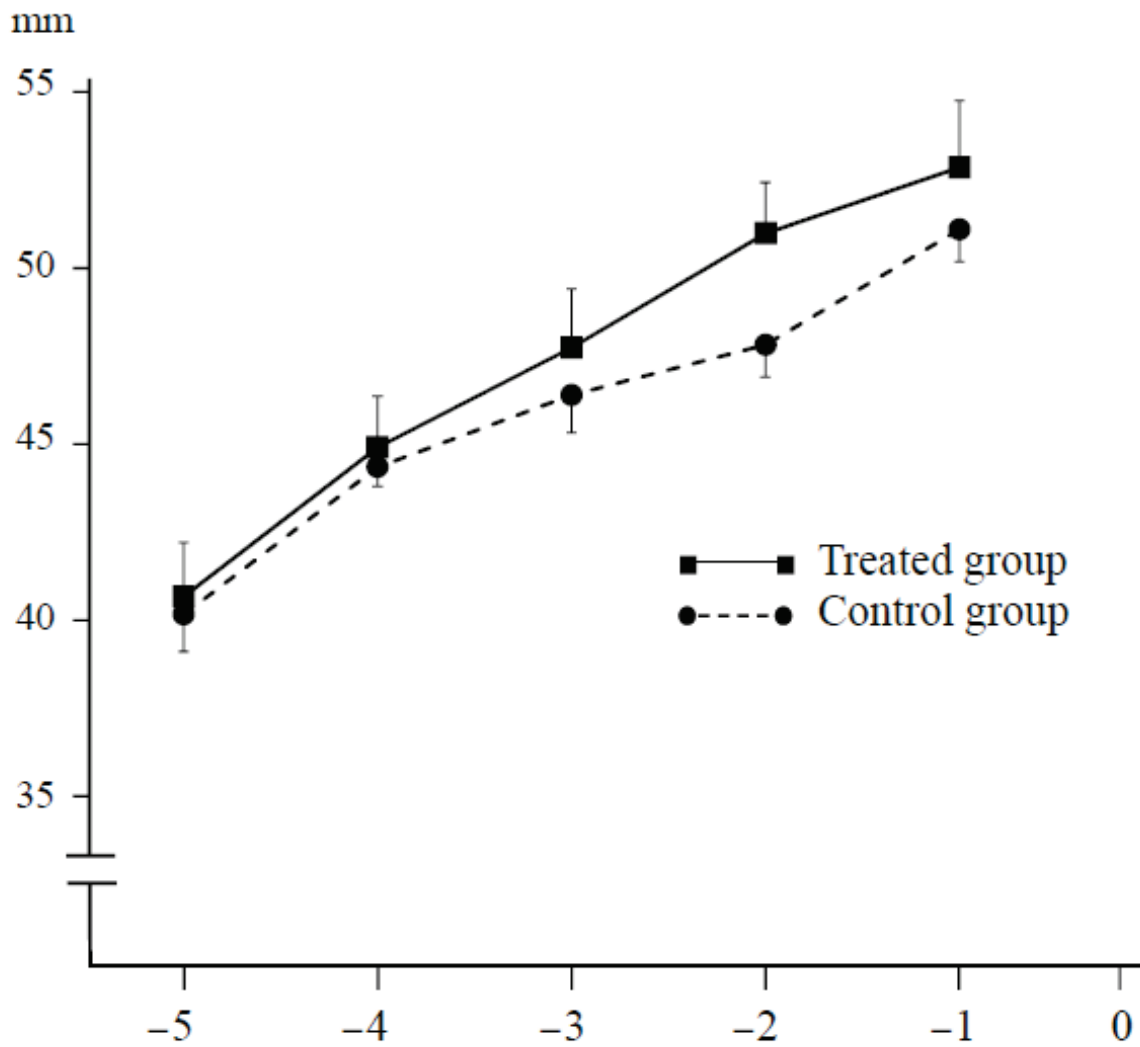


Fig.1-4. Changes in mean follicle diameter from 5 days before to 1 day before ovulation.

The mean follicle diameters (major axis + minor axis/2) from 5 days before (-5) to 1 day before (-1) ovulation are shown. Day 0 is the day of ovulation.

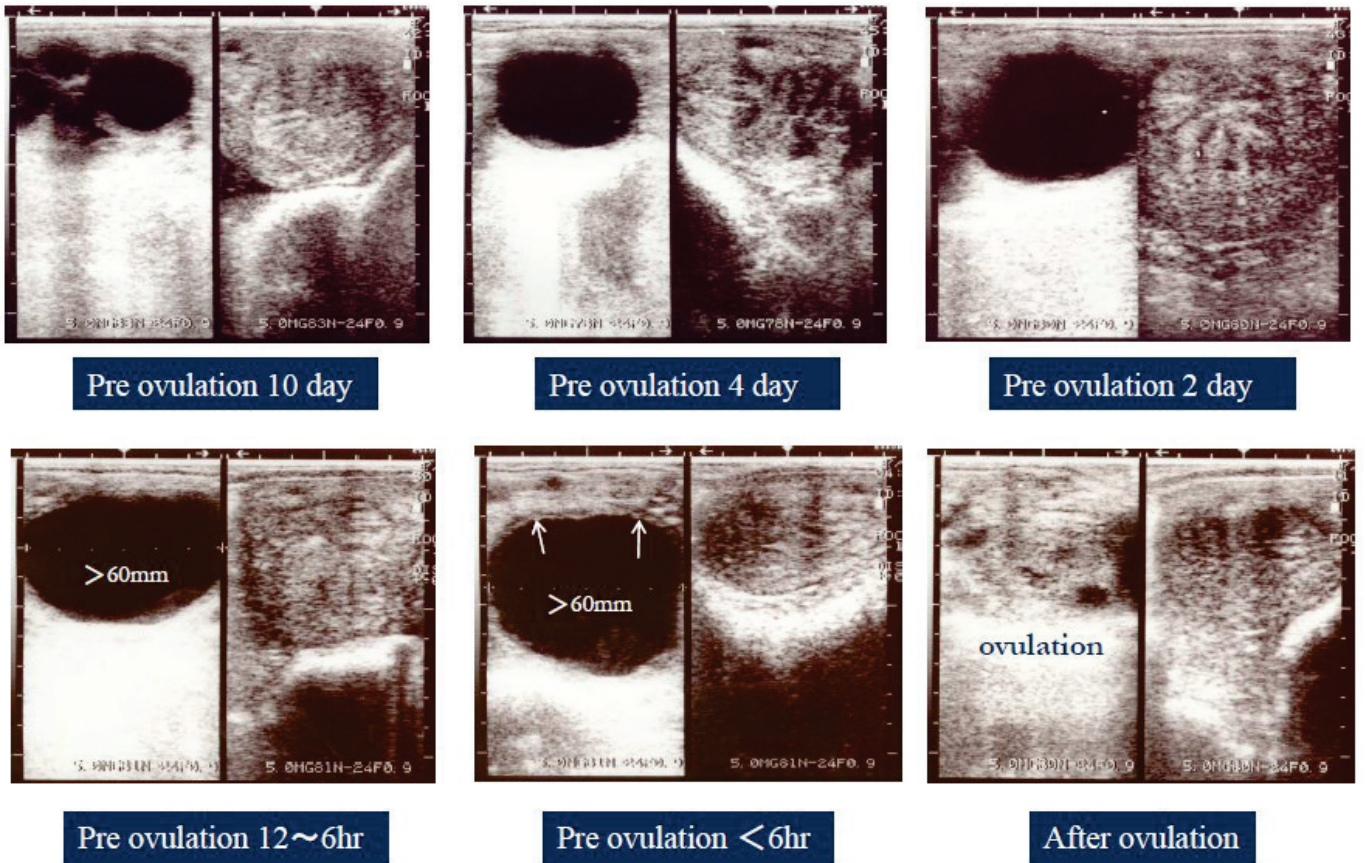


Fig.1-5. Temporal change in dominant follicle and uterine image until ovulation. ↑ : echogenic follicular wall.

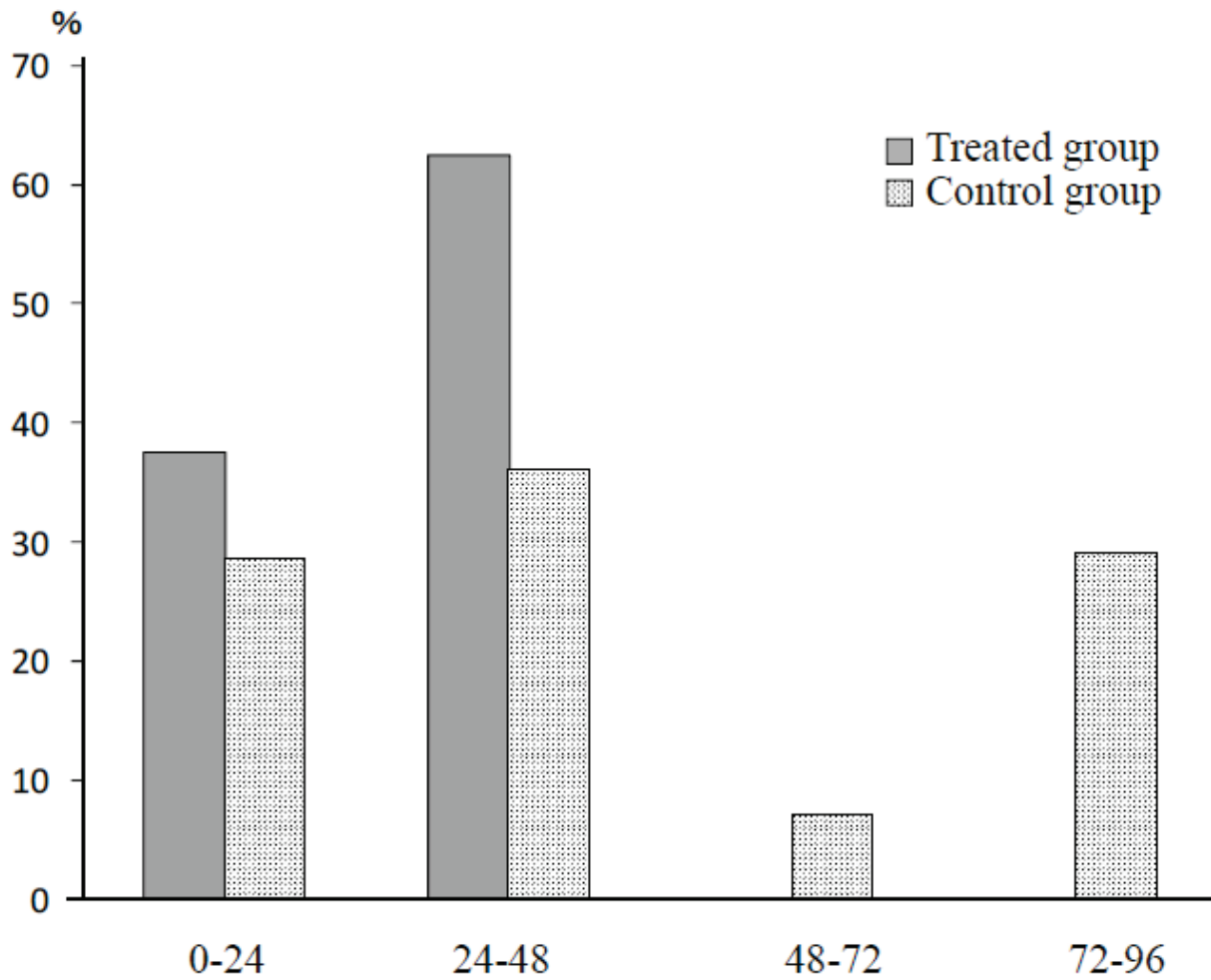


Fig.1-6. Interval between treatment and ovulation (hr).

The time of buserelin administration was designated 0 hr for the treated group, and the time at which the follicle diameter was more than 45 mm and uterine edema was decreased was designated as 0 hr for the control group.

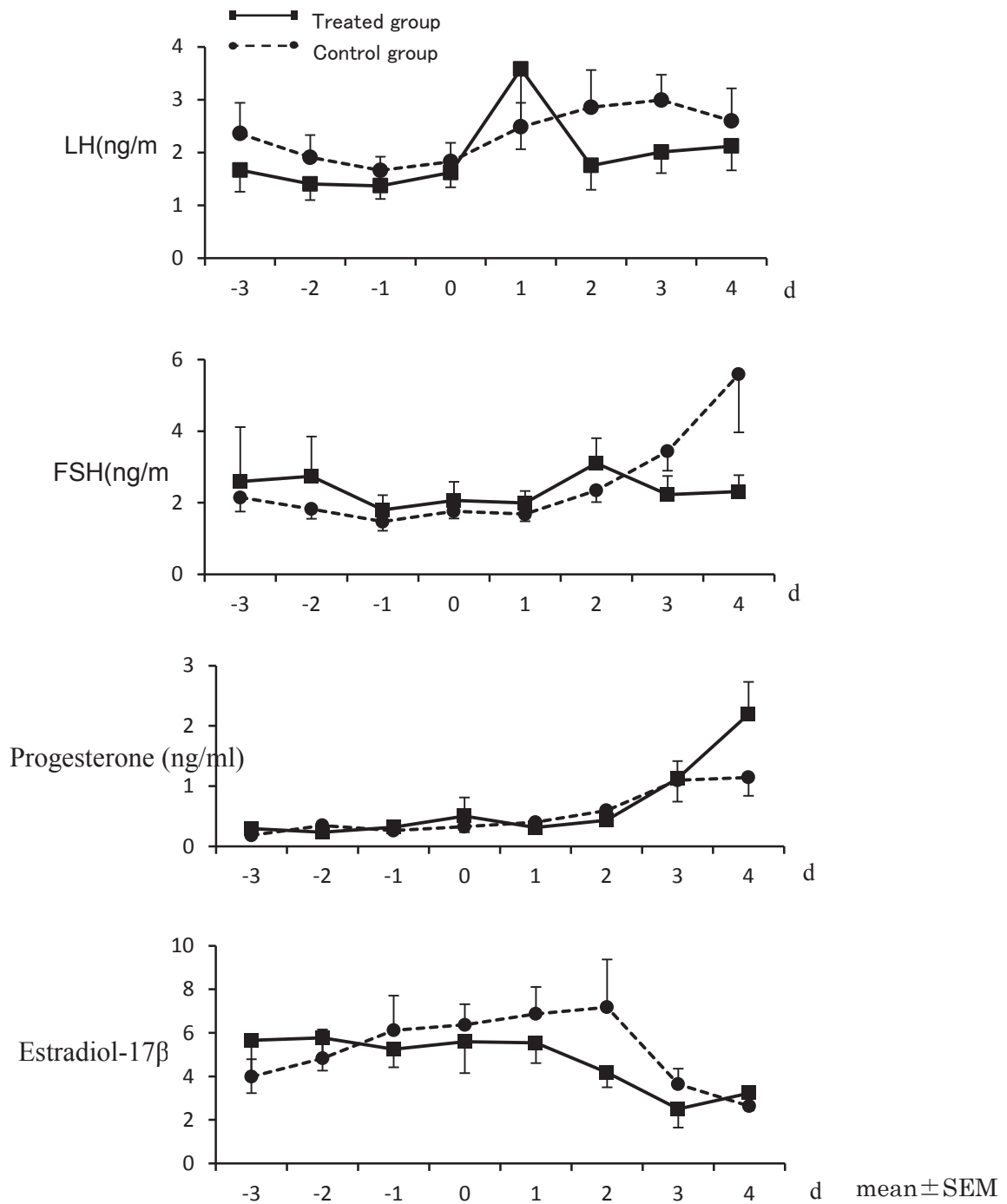


Fig.1-7. Plasma concentrations of LH, FSH, progesterone, and estradiol-17β.

Day 0 for the treated group was the day of buserelin administration, and for the control group, it was when follicles of more than 45 mm in diameter and a decrease in uterine edema were confirmed. For the treated group, values measured at the same time as the first day or averages of values taken around the same time were used as the date each day for analysis.

Table 1-1. Frequency of mating, double-ovulation rate, and fertility rate

	n	Frequency of mating *	Double-ovulation rate (%)	Fertility rate (%)
Treated group	8	1.8(1 – 2)	37.5	50
Control group	14	1.6(1 – 3)	28.6	50

* Mean (range)

Table 1-2. Diameter of preovulatory dominant ovarian follicle

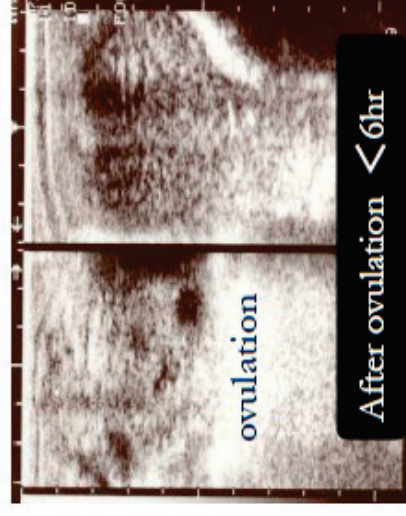
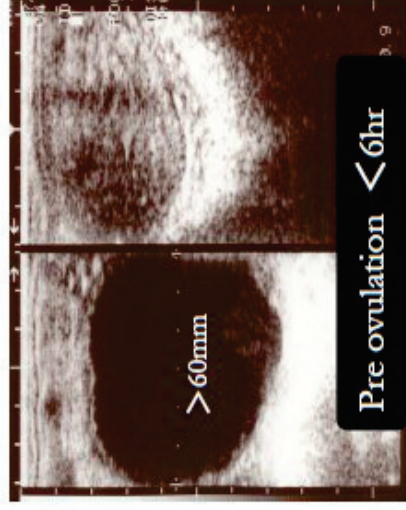
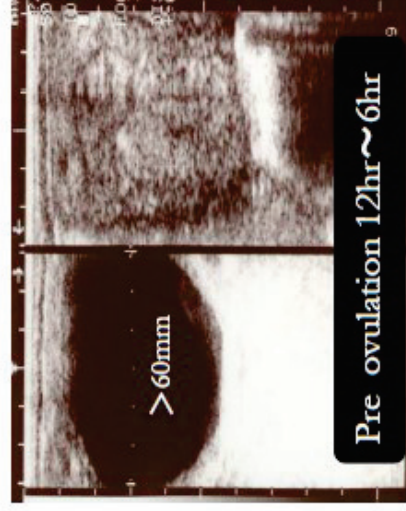
Pre ovulation 48hr to 24hr : $49.9 \pm 6.6\text{mm}$ (SD : n=69)

Pre ovulation 24hr to ovulation : $53.8 \pm 5.4\text{mm}$ (SD : n=150)

April: $53.4 \pm 5.9\text{mm}$ (SD : n=27)

May: $54.3 \pm 5.1\text{mm}$ (SD : n=70)

June: $53.3 \pm 5.7\text{mm}$ (SD : n=53)



第2章

重輓馬雌馬における胚胞発育変化の特徴

2-1. 序論

獣医療における超音波検査の分野はこの 30 年間で発展し、その最初の利用は馬の早期妊娠鑑定であったとされる。その最初の利用以来、技術は飛躍的に向上し様々な用途で応用され今日に至っている。馬の臨床に携わる多くの獣医師が超音波診断装置を利用し、いまや超音波検査はエックス線検査とともに馬の画像診断の主力となっている。馬は長日性の季節繁殖動物で、交配時期が限定され、2 排卵率、双胎妊娠率が高く、また、早期胚死滅の発生率が高いことが知られている [6, 42, 46, 66]。このような背景から、馬の妊娠診断で最初に応用された超音波検査は、とくに馬の早期妊娠診断、単胎と双胎の鑑別診断に威力を発揮し、その技術は発展、普及し続けている。また、馬は長日性の季節繁殖動物で交配期間が限定され、受胎の成否により生産性は大きく左右されることから、早期の妊娠診断と胚胞の発育ステージに基づいた的確な妊娠診断が要求される。しかし、馬で発達した超音波診断技術は軽種馬で研究が進んでいるが、体重が軽種馬の約 2 倍近い世界最大級の馬として認識されている日本挽系種、重挽馬の妊娠診断、胚胞発育経過の特徴に関する報告はない。早期の妊娠診断、胚胞発育ステージによる特徴を把握した上での的確な妊娠診断は、単胎と双胎の鑑別診断や子宮内膜嚢胞(シスト)との鑑別診断にも威力を発揮し、重挽馬の生産効率向上を図るために獣医師にとって必須の技術である。

第2章では、超音波画像検査による重軌馬の胚胎発育変化の特徴を明らかにし、妊娠診断のための標準像と、触診では予測困難な時期からの胎齢予測の可能性を検討し、早期胚死滅や異常な胚発育を早期発見する鑑別診断の根拠を明確にすることを目的とした。

2-2, 試験概要

2-2-1, 供試馬

北海道帯広市内に飼養されている正常な発情周期を有する未経産から産次数の異なる経産馬, 3歳~17歳の重挽馬雌馬, 述べ129頭を試験に供した。

2-2-2, 試験方法

試情馬による外部発情徴候が観察されてから1日1回, 継続して直腸検査および超音波画像検査により排卵まで主席卵胞の確認をおこなった。経直腸からの卵巣触診によって, 前日に確認された主席卵胞が触知されず, 超音波検査にて出血体を確認されたことをもって排卵と診断した。排卵確認日を0日として7日より, 経直腸から子宮の超音波画像検査により子宮角および子宮体部の画像診断による妊娠診断(胚胞の確認)を行った。種付けは全て自然交配で, 種馬管理者の判断で1発情期につき1~3回行われた。

2-2-3, 超音波画像検査

最初に胚胞が確認されたのは9日で, 個体によって40日まで, 胚胞の確認から形態的発育経過を超音波診断装置[SSD-500, アロカ, 東京]に5MHzリニア型直腸検査用探触子[UST-588-5, アロカ, 東京]を接続して観察した。胚胞の静止画像の任意の長径と短径を測定し, その平均を胚胞径として胚胞の発育経過を観察した (Fig. 2-1.)。

2-3, 結果

胚胞が最も早く観察されたのは9日(5mm)あるいは10日(5.5mm)であり、円形(球状)の無エコー性の(液体で満たされた)領域として、子宮角の横断面の中心に確認された。胚胞の多くは12日(12.4 ± 0.7 mm)以降に、球形の無エコー性の円形(球状)の構造物として観察された。12~16日(26.1 ± 3.4 mm)は、円形(球状)の無エコー性のカプセルとして明らかに胚胞を確認することができた。この期間は円形(球状)で推移し、胚胞の多くの背側と腹側の境界では、超音波の物理的反射像である正反射(specular reflections)が高輝度エコー像として観察された(Fig. 2-2.)。また、この期間は超音波検査を行っている間の移動性が高く、特に12~14日では子宮内を容易に移動することが観察された。17~18日の胚胞は多くの形状が一定であるが円形(球状)ではなく、わずかに卵円形を呈し19日(32 ± 2.5 mm)以降は次第に三角形を呈し、不規則な形状で推移した。12~19日の胚胞は一定の割合で胚胞径の増大($12.4 \pm 0.7 \sim 32 \pm 2.5$ mm)が確認された(Fig. 2-3.)。また、17日以降は子宮内の移動性は観察されなかった。22~25日に胚胞の腹側3分の1の領域に胚子(5~10mm)を確認することができたが、それ以外の領域で胚子は確認されなかった(Fig. 2-4.)。約18~28日の胚胞は三角形や不規則な形状で推移したが、胚胞径は35mm前後で大きな変化は観察されなかった。19日前後から28日頃までの胚胞は不規則で平坦な形状で発育する様子が観察され、それ以後

は再び一定の割合で胚胞径の増大が観察され、38日以降では胚胞は不規則な形状で60mm以上に発育した (Fig. 2-5.)。25日前後の胚子は胚胞の腹側部に位置するが、次第に28~30日では胚胞の中央へと移動することが観察された。また、28日以降で胚子の一部で心拍が確認でき、30日以降では明らかに胚子心拍を確認することができた。

2-4. 考察

卵巣や子宮の状態を把握するうえで、超音波検査の有用性は極めて高く、多くの場合は5~10MHzのリニア型プローブを応用することが推奨されている[5]。本研究においても5MHzのリニア型プローブを用いて良好な画像を描写することが可能であった。経直腸からの触診と超音波画像検査で出血体を確認することで排卵と診断したが、排卵後24時間以内に認められる出血体は、触診のみでは排卵前の卵胞と触診上の感触が非常に類似していた[48]。しかし、超音波画像検査では一目瞭然であり、触診のみでの排卵診断を行う場合は細心の注意と配慮が必要であることが明らかとなった。交配した個体では、排卵後6日前後に胚盤胞が卵管から子宮内腔に移行するが、胚盤胞を、排卵後9日前に超音波画像検査で描出することは困難とされている[3, 16, 17,]。本研究においても7日から超音波画像検査を行ったが、胚胞は7日、8日に確認されることがなく、9日(5mm)以降に円形(球状)の無エコー性領域として、子宮角の横断面の中心に確認された。胚胞の多くは12日(12.4 ± 0.7 mm)以降に円形(球状)の無エコー性領域として観察された。12日以前では胚胞が観察されない場合もあり、排卵日が確認されていない場合は、最終種付けから12日以降に妊娠診断を行うこと考慮する必要がある。12~16日(26.1 ± 3.4 mm)は、明らかに胚胞を確認することができ、胚胞の多くの背側と腹側の境界で、超音波の物理的反射像である正反射(specular reflections)が高輝度エコー像として観察

(Fig. 2-2.) されたことから、この期間での子宮内膜の嚢胞（シスト）との類症鑑別診断において、正反射（specular reflections）の有無の確認は有用である。すなわち、子宮内膜の嚢胞（シスト）の形状は不整形で正反射（specular reflections）が観察されることは稀である。また、この期間は移動性が高く、特に 12～14 日では子宮内を容易に移動するが、17～18 日以降では移動性が確認されなかった。胚胞の成長と子宮の緊張は、子宮内腔を移動する胚胞が通常の固着部位とする子宮角基部に固着する胎齢 16 日まで続くとされ [16, 17] , 胚胞径はわずかに大型で推移した重鞭馬においてもほぼ同様の現象が観察された。固着前の胚胞は、子宮からのプロスタグランジンの放出を阻害するために、子宮内膜表面全体に接触しながら移動し、この移動性は馬の妊娠認識の時期とされる排卵から 14 日に最盛期を迎えるとされている [1, 16, 17]。これらのことから、重鞭馬の妊娠診断の初回の適正時期は、移動性を有し明らかに胚胞が確認できる排卵後 14～16 日が理想的といえる。この時期であれば双胎妊娠が確認された場合でも、容易に減胎したい胚胞を子宮角の先端に移動してクラッシングすることが可能である。22～25 日に胚胞の腹側 3 分の 1 の領域に胚子（5～10mm）が確認されたが、それ以外の領域で胚子は確認されなかった (Fig. 2-3.)。25 日以降の胚胞において胚子が確認されない場合は、すでに胚死滅か、胚胞ではなく子宮内膜嚢胞（シスト）を考慮するべきである。18～28 日の胚胞は三角

形や不規則な形状で推移したが、胚胞径は 35mm 前後で大きな変化は観察されなかった。ポニーと軽種馬において、胚胞の成長曲線は 9～16 日の時期においては直線的であり、18～26 日では胚胞は一定の大きさで推移し、28 日以降に再び成長曲線が直線的となる S 字状カーブを示すことが報告されている[18]。ほぼ一定のサイズで維持される 18～26 日の胚胞径は、25～30mm で推移し、ポニーより軽種馬の方が大きい傾向があったが、他の日齢では大きな差はないとされている[18]。重挽馬においても同様に、S 字状カーブを示す成長曲線が観察されたが、18～26 日の胚胞径は、30～40mm で報告されているポニーや軽種馬より大きい傾向が観察された (Fig. 2-5.)。このような差は馬の種類による子宮形状の大きさに起因することが推測される。胚胞の発育曲線が一定となる期間は卵黄囊の縮小に対して、尿膜囊が増大することによって胚胞の全体像に変化がない時期であり、胚胞形状の変化は発育に伴う子宮の圧力と子宮内膜形状によるものと考えられる。28 日以降は尿膜囊の増大によって、再び直線的な発育曲線を示すことが考えられた。25 日前後の胚子は胚胞の底部に位置するが、次第に 28～30 日では胚胞の中央へと移動することが観察され、このことは卵黄囊の縮小に伴う現象であると考えられた。また、28 日以降で胚子の一部で心拍が確認でき、30 日以降では明らかに胚子の心拍を確認することができた。このことから、この時期に胚子の心拍が確認できない場合は胚死滅を考慮するべ

きである。

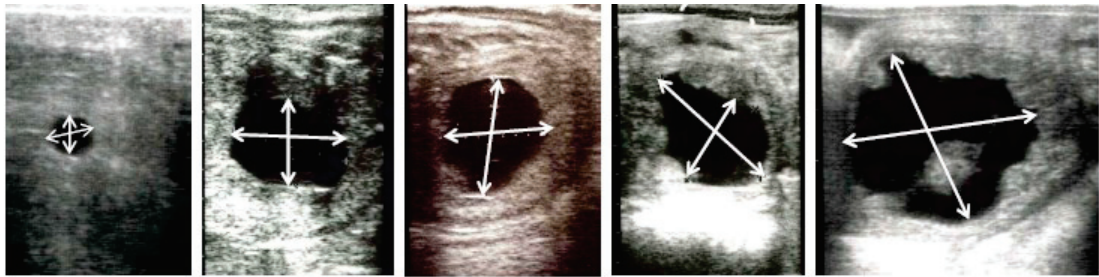
馬の理想的な妊娠診断の時期として、胚胞の発育経過に応じて複数回行うことが理想的である。すなわち、妊娠診断は初回が双胎妊娠の場合の減胎処置の可能性から胚胞の子宮内固着が起こる前 14～15 日、2 回目が 24～27 日、3 回目は 33～35 日、そして秋の 4 回実施することが望ましいとされている[58]。しかし、経済的理由等から重挽馬の繁殖現場では頻回妊娠診断が困難である場面が多い。妊娠診断は複数回行うことが理想的ではあるが、1 回のみ実施する際の時期としては胚死滅率が低下し[58]、明らかに心拍の観察ができる 30 日前後に実施することが望ましい[44]。Fig. 2-6. に排卵確認後 10～30 日まで定期的に観察した、同一重挽馬の胚胞の超音波画像を標準像として示した。

重挽馬の定期的な妊娠診断を行うに当たり、胚胞の発育経過に伴う特徴 (Fig. 2-6.) を把握した上で妊娠診断をすることが重要である。重挽馬の理想的な妊娠診断の時期と回数として、初回は双胎妊娠の場合、減胎処置が可能な 15 日前後、2 回目は胚死滅率が低下し胚子心拍が確認できる、30 日前後の 2 回行うことが理想的である。また、このことによって正常な胚胞の発育と子宮内膜嚢胞 (シスト) との類症鑑別、双胎妊娠や早期胚死滅の診断を的確に行うことができ、限られた交配期間に効率的に的確な交配が可能になり、重挽馬の繁殖効率の向上に結びつくことが推察された。

2-5, 小括

重挽馬の妊娠診断の精度を向上するために、胚胞の発育変化の特徴を明らかにし、胚胞発育の標準像を作成することを目的として研究を行った。重挽馬雌馬、のべ129頭について排卵確認日を0日とし、9～40日まで胚胞の確認から胚胞の形態的発育変化を超音波診断装置にて観察した。胚胞の任意の長径、短径を測定し、その平均を胚胞径として観察した。その結果、胚胞は9日で5mmの円形(球状)の無エコー領域の胚胞として確認され、12～17日は円形(球状)から卵円形、18(35.3±4.7mm)～28日(33.8±4.6mm)は胚胞径に大きな変化はなく不規則な形態で推移した。29～40日(66mm)は不規則な形態で再度、胚胞径の増加が観察された。22～25日で胚子の確認、30日前後で胚子の心拍が確認できた。軽種馬の胚胞径は18～28日までは25mm前後で推移するとの報告と比べ、重挽馬の胚胞は大型(約35mm)で推移した。一方、胚胞径の発育に伴う変化や、S字状カーブの成長曲線、胚子の形態的变化は報告されている他の馬と同様であった。重挽馬の理想的な妊娠鑑定の時期と回数として、初回は双胎妊娠の場合、減退処置が可能な15日前後、2回目は胚死減率が低下し胚子心拍が確認できる、30日前後の2回行うことが理想的であると考えられた。

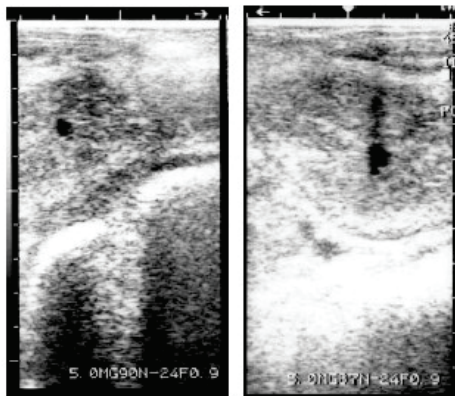
附) 图表



The diameter of an embryonic vesicle was measured as the mean of arbitrary long and short diameters.

$$\text{Embryonic vesicle diameter} = \frac{\text{major axis} + \text{minor axis}}{2}$$

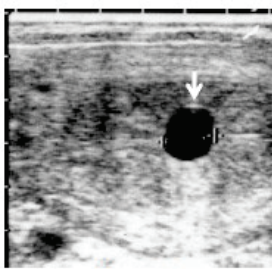
Fig. 2-1. Measure of embryonic vesicle diameter.



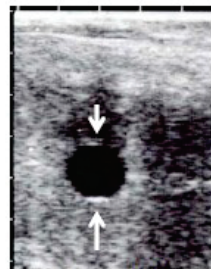
Day 9 (5mm)

Day 10 (5.5mm)

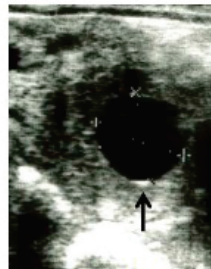
- Days 9 and 10 ; 5-6 mm echo free region
- Days 12 to 16 ; spherical
- Days 12 to 16 ; Specular reflections (↓)



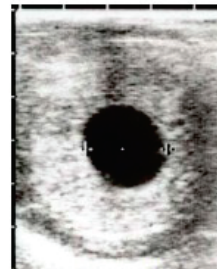
Day 12
(12.4±0.7mm)



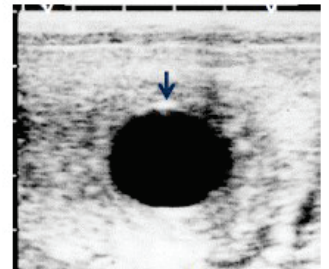
Day 13
(17.2±4.1mm)



Day 14
(18.9±3.0mm)



Day 15
(23.1±3.7mm)



Day 16
(26.1±3.4mm)

Fig.2-2. Growth of embryonic vesicle days 9 to 16.

It was first confirmed as a 5–6-mm spherical echo-free region on days 9 and 10 and remained spherical on days 12–16; specular reflections (arrows) were confirmed.

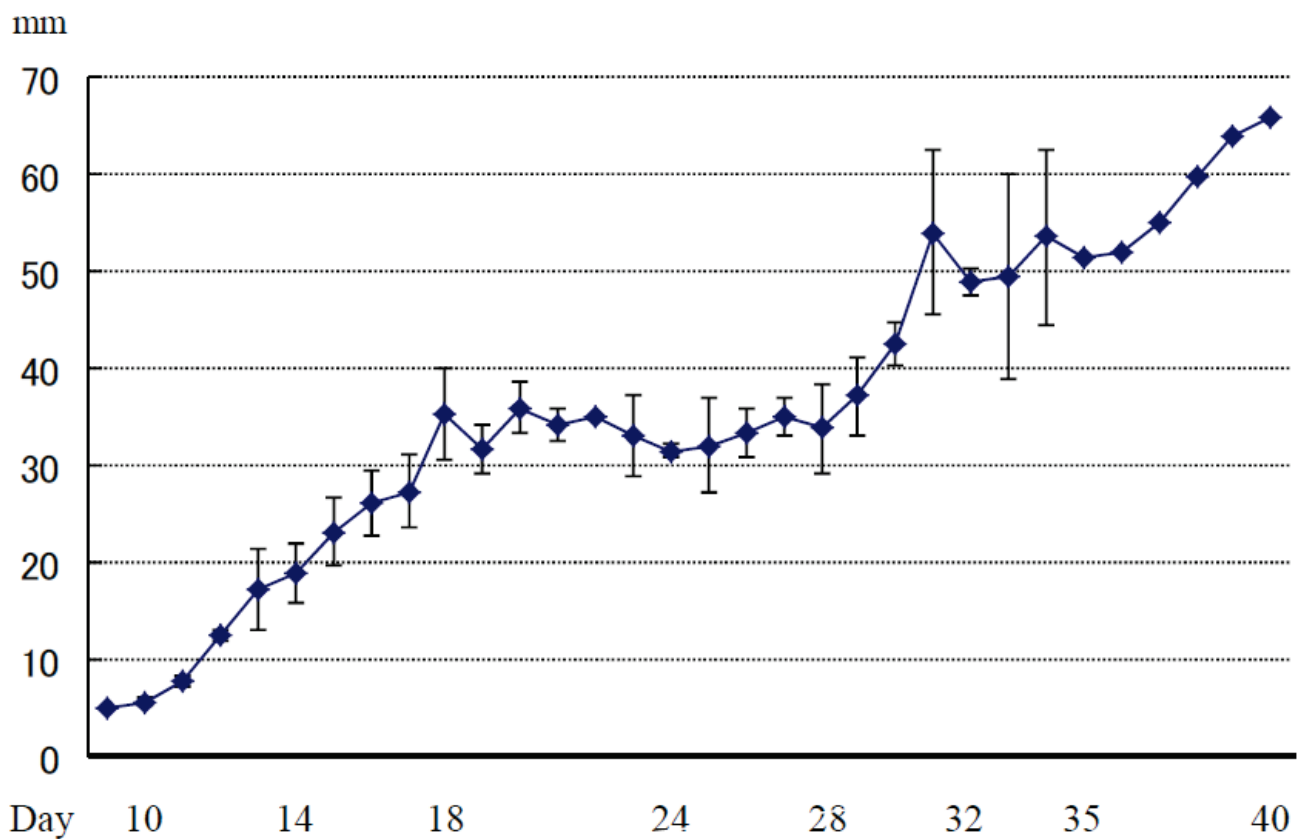
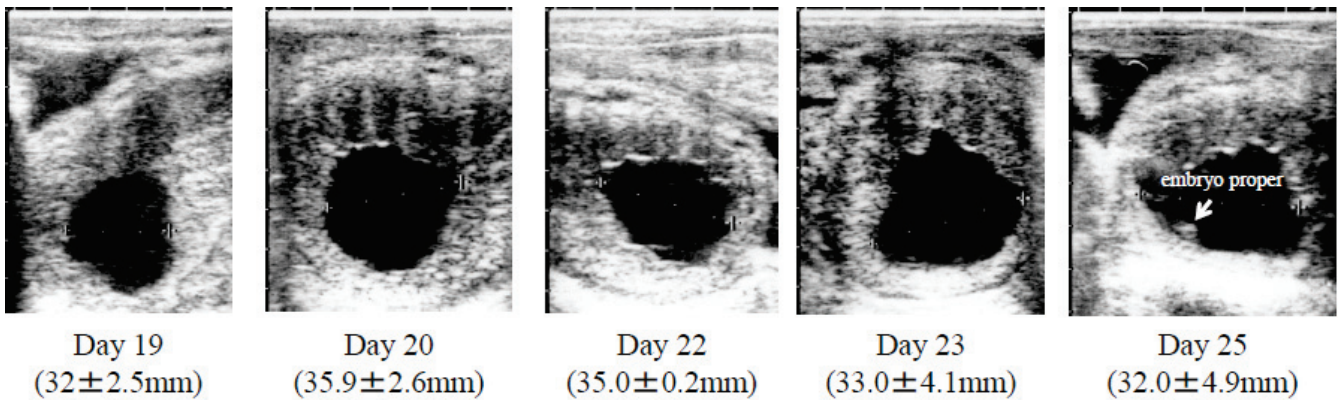


Fig.2-3. Expansion profile from cross sections of embryonic vesicle.

The rate of expansion appeared to increase gradually over day 9 to 10, and then expansion increased linearly to day 18, day 18 to 28 were S-shaped, with distinct plateau during approximately days 18 to 28.

Values are presented as mean \pm SEM.



- Days 19~ ; Embryonic vesicles grew in spherical to irregular shapes
- Day 22~25; Embryo proper was confirmed
- Day 18~28 ; The diameter of embryonic vesicles remains unchanged around 35 mm

Fig.2-4. Growth of embryonic vesicle days 9 to 16.

After days 19 embryonic vesicles grew in spherical to irregular shapes, around days 22 to 25 embryo proper was confirmed, then the diameter of embryonic vesicles remains unchanged around 35 mm over days 18–28.

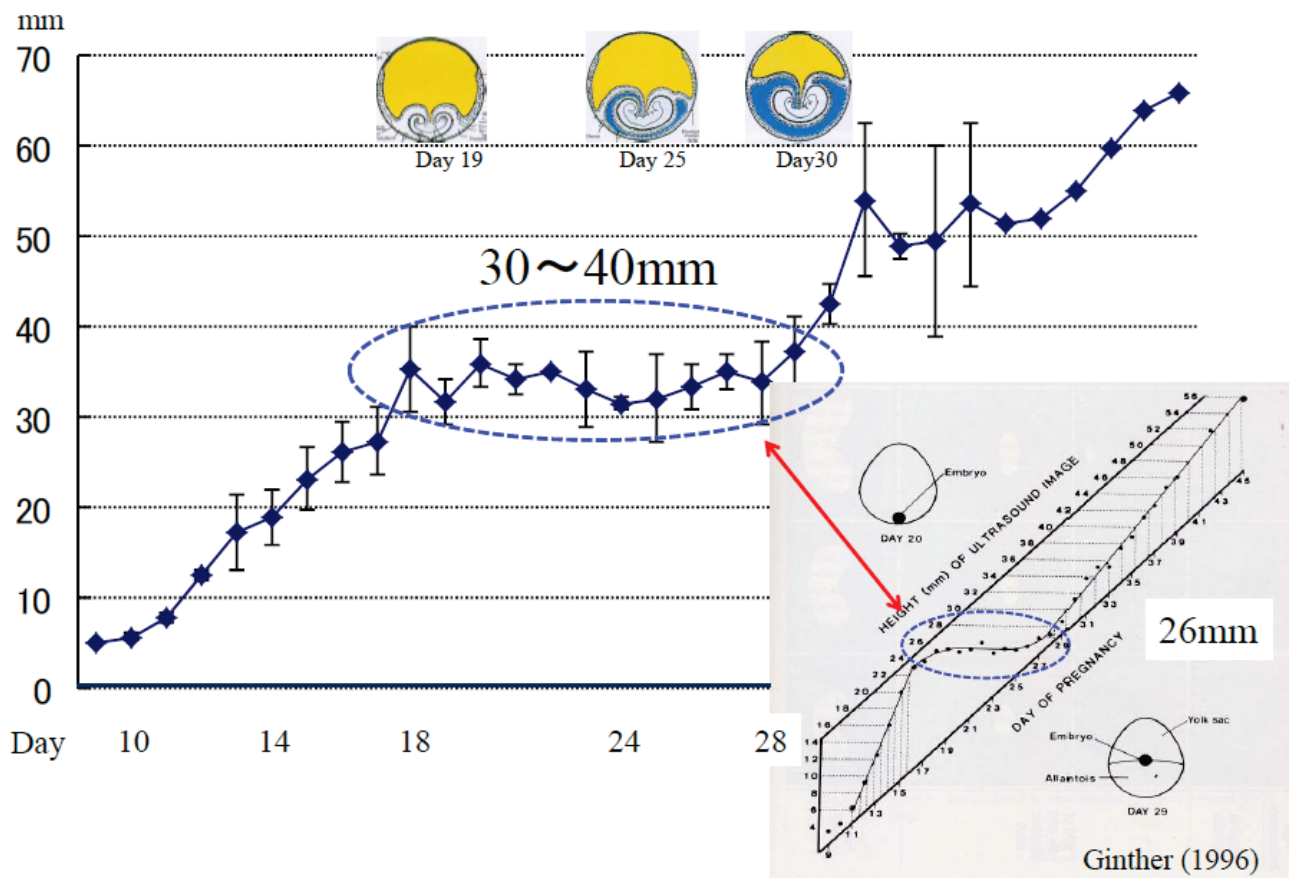


Fig.2-5. Days 18 to 28 with distinct plateau, embryonic vesicle diameter were 30 to 40 mm in heavy draft horses, that were bigger than other horses (Ginther,1996). Schematic illustrations of the embryonic vesicle on 19, 25 and 30 days after mating are depicted on the top.

Values are presented as mean \pm SEM.

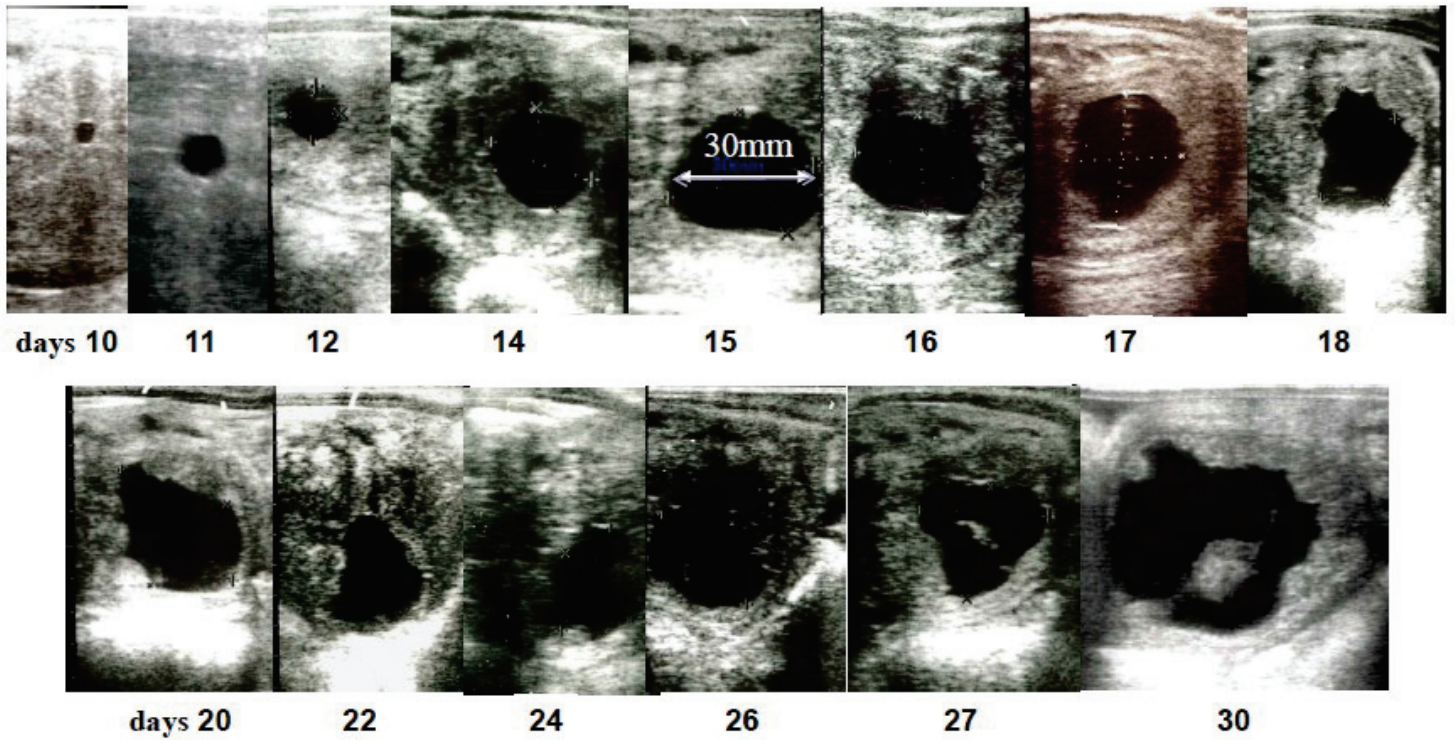


Fig.2-6. Standard image of growth of embryonic vesicles in the same heavy draft mare.

Morphological changes of embryonic vesicles from day 10, at which embryonic vesicles could be confirmed, to day 30 after confirmation of ovulation in the same heavy draft mare.

総括

世界最大級の馬として認識されている重挽馬（日本挽系種）の利用は、ばんえい競走馬，肉用馬，使役馬としての三面性があり，その生産は我が国特有の馬生産産業である。しかし，重挽馬の産駒生産率は約 50%弱と軽種馬に比べ約 20%低く推移している。その要因として，重挽馬の特異な繁殖生理が明らかにされておらず，獣医学的な対応策が十分に講じられていない点が挙げられる。そこで，重挽馬の繁殖特性を明らかにし，1年1産を目指した生産効率を維持するための対応策を検討した。

第1章では重挽馬の交配適期の指標を明らかにするために，超音波画像検査による発情期の卵巢（卵胞）および子宮の形態変化を経時的に観察し，排卵前後の主席卵胞，子宮の形態的特徴を観察した。また，重挽馬雌馬の排卵の同期化を目的とした GnRH 類似体ブセレリン単回投与について，その排卵誘起効果と内分泌動態への影響を調査した。

連続する2繁殖シーズンの4～6月，北海道帯広市に飼養されている，正常な発情周期を有する重挽馬雌馬，のべ102頭に対して排卵誘起のためのブセレリン至適投与量の検討試験を行った。試情馬による発情徴候を示し，1～3日間の経直腸超音波検査にて直径45mm以上の主席卵胞が認められた時に，ブセレリン40 μ g（n=31）あるいは20 μ g（n=21）を筋肉内投与し，無処置で経過観察を行った対照群（n=50）と合わせて，48時間以内の排卵率を調査し，効果的

なブセレリン単回投与量を検討した。その結果、ブセレリン 40 μ g 投与群の 48 時間以内の排卵率は 90.3% (28/31) であり、対照群の 56% (28/50) に比して有意 ($P < 0.01$) に高かった。この結果より、ブセレリン投与量を 40 μ g と設定し以降の試験を行った。排卵前後の内分泌動態を明らかにするために、正常な発情周期を有する重挽馬雌馬、のべ 22 頭に対してブセレリン投与試験を行った。試情馬による発情徴候を確認し、直径 45mm 以上の主席卵胞が確認され、子宮浮腫像の減少が観察された時に、ブセレリン 40 μ g を筋肉内投与する投与群 (n=8) と、同様の観察時点から無処置で排卵まで経過を観察する対照群 (n=14) に区分した。投与群は排卵まで 6 時間間隔、排卵確認後は 48 時間まで 12 時間間隔で、対照群は排卵確認後 48 時間まで 24 時間間隔で経直腸超音波検査により、卵胞 (卵巣) および子宮の形態変化を観察した。卵胞の静止画像から (長径 + 短径) / 2 を卵胞径として計測した。また、両群とも超音波検査時に採血を行いホルモン測定に供し、排卵前後の内分泌動態を調査した。

重挽馬の排卵前日の観察における卵胞直径は、対照群、投与群それぞれ $50.3 \pm 1\text{mm}$ (n=14) , $52.1 \pm 1.9\text{mm}$ (n=8) であり、卵胞直径は排卵に向けて 1 日あたり 3~5mm 前後成長し、卵胞発育に伴う卵胞直径に両群に差はなく、報告されている馬の排卵前の平均的な卵胞直径より大型であった。

ブセレリン 40 μ g 投与により排卵した 8 例において、排卵 6 時間前に球形を

呈していたのは2例(25%)で、6例(75%)は、排卵前24~6時間は球形から円錐形、また洋梨状への形態的变化が認められた。卵胞の形態変化は排卵7日前にも認められることから、卵胞の形態変化のみで排卵時期を推測することは適切ではないと考えられた。

子宮の浮腫像は排卵前4~3日に最も明瞭になり、排卵1~2日前に減少傾向を示した。ブセレリン投与後48時間以内の排卵率は、投与群で100%(8/8)であり、対照群57.1%(8/14)に比べ高い($P=0.051$)傾向が認められた。投与から排卵までの時間は、6時間以内が37.5%(3/8)、36~48時間が62.5%(5/8)で2群に分かれ、排卵がブセレリン投与後36~48時間に集中する傾向が認められた。

対照群ではLHは排卵時に高く、FSHは排卵後に上昇が認められたのに対し、投与群では、ブセレリン投与6~12時間後に、LH、FSHは一過性に上昇したが、その後上昇はみられなかった。投与群ではLH、FSHの一過性上昇がみられたことから、ブセレリン投与により性腺刺激ホルモン分泌細胞が脱感作状態にあるか、LH、FSH分泌に負のフィードバックが働いていることが推測された。LH、FSHの一過性の上昇が卵胞の成熟を早め、排卵を促進したと推察される。

交配回数、2排卵率、受胎率は両群間に差が認められなかった。ブセレリン投与群の48時間以内の排卵率が100%であり、重挽馬雌馬が直径45mm以上の

主席卵胞を有し、子宮の浮腫像が減少傾向を呈した時を交配適期とし、ブセレリン 40 μ g 単回投与の排卵同期化への有用性が明らかになった。さらに排卵誘起により、交配回数を減らすことは交配誘導性子宮内膜炎のリスクを低減し、重挽馬の効率的、衛生的な繁殖管理技術となりうることが推察された。

馬は早期胚死滅の発生率が高く、早期の妊娠診断と胚胞の発育ステージに応じた的確な妊娠診断が要求されるが、重挽馬の妊娠ステージにおける胚胞発育の形態的特徴の報告はない。そこで、第2章では、重挽馬における的確な早期妊娠診断の指標を確立するために、胚胞発育の形態的特徴を調査した。

北海道帯広市に飼養されている重挽馬雌馬、のべ129頭を試験に供した。試情馬による発情徴候を示し自然交配後、主席卵胞の排卵確認日を0日として、9～40日まで超音波診断装置を用いて、胚胞の確認と発育経過に伴う胚胞の形態変化を観察した。胚胞の長径と短径を測定し、その平均を胚胞径として記録した。

重挽馬の胚胞は、排卵後9～10日で5～5.5mmの円形（球状）の無エコー領域として、子宮角の横断面の中心に確認された。しかし、12日以前では胚胞が観察されない場合も多く、排卵日が特定されていない場合は、最終種付けから12日以降の妊娠診断が望ましいと考えられた。胚胞の多くは12日（12.4 \pm 0.7mm）～16日（26.1 \pm 3.4mm）は、円形（球状）の無エコー領域のカプセルと

して明らかに観察された。この時期、背側と腹側の境界では正反射（specular reflectionss）が高輝度エコー域として観察された。この期間、胚胞は子宮内を移動し、特に12～14日ではその移動性は活発であった。17～18日の胚胞はわずかの卵円形を呈し、19日（ $32 \pm 2.5\text{mm}$ ）以降は次第に三角形から不規則な形状で推移し、22～25日に胚胞の底側3分の1の領域に胚子（5～10mm）が確認された。19日以降は、胚胞の子宮内での移動は観察されなかった。排卵後18～28日の胚胞径は約35mmであり、その期間中、大きな変化は観察されなかった。重挽馬の胚胞の成長曲線は、S字状カーブを示した。胚胞径増加が停滞する交配後18日～28日における胚胞の大きさは30～40mmで、他の馬種より大きい傾向が観察され、この差は馬の種類による子宮形状の相違に起因することが推測された。重挽馬の定期的な妊娠診断を行うに当たり、胚胞の発育経過に伴う特徴を把握した上で妊娠診断をすることが重要である。重挽馬の理想的な妊娠診断の時期と回数は、初回は双胎妊娠の減胎処置が可能な15日前後、2回目は胚死滅率が低下し胚子心拍が確認できる30日前後の2回と考えられた。また、このことによって正常な胚胞の発育と子宮内膜嚢胞（シスト）との類症鑑別、双胎妊娠や早期胚死滅の診断を的確に行うことができ、限られた交配期間に的確な交配が可能になり、重挽馬の繁殖効率向上に結びつくことが推察された。

謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の執筆にあたり，終始御懇篤なるご指導およびご鞭撻，そして御校閲を賜りました帯広畜産大学教授 南保泰雄博士に心から拝謝いたします。

また，本論文を御審査していただきました，帯広畜産大学教授 松井基純博士，岩手大学教授 佐藤繁博士，東京農工大学教授 田中知己博士，岐阜大学教授 村瀬哲磨博士に深甚なる謝意を表します。

本研究の推敲および執筆にあたり，貴重なご指導ご助言を賜りました，石井獣医サポートサービス 石井三都夫博士，三宅繁殖サポート 三宅陽一博士，帯広畜産大学准教授 羽田真悟博士，十勝農業共済組合 木村優希博士，ホルモン測定に多大なるご支援いただきました東京農工大学名誉教授 田谷一善博士，帯広畜産大学教授 宮本明夫博士，そして，本研究に欠かすことのできない研究の場を快くご提供してくださりました，佐々木啓文氏，加来一氏，三井宏悦氏，最後に臨床試験のサポートにご協力いただいた十勝農業共済組合の獣医師の皆様に，この場を借りて厚く感謝申し上げます。

文献

1. Allen, W.R., Gower, S., Wilsher, S. (2011). Fetal Membrane Differentiation, Implantation and Early Placentation, in: Equine Reproduction, 2nd edn (eds A. O. Mckinnon, E. L. Squires, W. E. Vaala, and D. D. Varner), Wiley Blackwell, Oxford, 2187-2199.
2. Aoki, T., Yamakawa, K., and Ishii, M. (2013). Factors affecting gestation length in heavy draft mares. *J. Equine Vet. Sci.* 33: 437–440.
3. Ball, B. A. (2011). Embryonic Loss. in: Equine Reproduction, 2nd edn (eds A. O. Mckinnon, E. L. Squires, W. E. Vaala, and D. D. Varner). Wiley Blackwell, Oxford, 2325-2338.
4. Barrier-Battut, I., LePoutre, N., Trocherie, E., Hecht, S., Grandchamp des Raux, A., Nicaise, J. L., Verin, X., Bertrand, J., Fieni, F., Hoier, R., Renault, A., Egron, L., Tainturier, D., Bruyas, J. F. (2001). Use of buserelin to induce ovulation in the cyclic mare. *Theriogenology* 55:1679-1695.
5. Bergfelt, D. R, Adams, G. P. (2011) Pregnancy. In: Equine Reproduction, 2nd edn (eds A. O. Mckinnon, E. L. Squires, W. E. Vaala, and D. D. Varner). Wiley Blackwell, Oxford, 2065-2079.

6. Bosh KA, Powell D, Neibergs JS, Shelton B, Zent W. (2009). Impact of reproductive efficiency over time and mare financial value on economic returns among thoroughbred mares in central Kentucky. *Equine Vet J* 41. 889-894.
7. Camillo, F., Pacini, M., Panzani. D., Vannozzi, I., Rota, AI., Aria, G, (2004). Clinical use of twice daily injections of buserelin acetate to induce ovulation in the mare. *Vet. Res. Commun.* 28: 169-172.
8. Cuervo-Arango, J., Newcombe, J. R. (2008). Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern in two consecutive cycles in the mare and how they are influenced by ovulation inductors. *Theriogenology* 69: 681-687.
9. Derar, R. I., Maeda, Y., Tunoda, N., Hoque, M. D. S., Osawa, T., Miyake, Y.(2002). The peripheral levels of luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), immunoreactive (ir-), inhibin, progesterone (P) and estradiol-17 β (E₂) at the time of controle of ovulation with gonadotropin releasing hormone (GnRH) agonist (Deslorelin) in pony mares. *J. Equine Sci.* 13: 83-87.

10. Evans, M. J., Gastal, E. L., Silva, L. A., Gastal, M. O., Kitson, N. E., Alexander, S. L., Irvine, C. H. G. (2006). Plasma LH concentrations after administration of human chorionic gonadotropin to estrus mares. *Anim. Reprod. Sci.* 94: 191-194.
11. Evans, M. J., Irvine, C. H. G. (1975). Serum concentration of FSH, LH, and progesterone during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 23: 193-200.
12. Farquhar, V. J., McCue, P.M., Carnevale, E. M., Squires, E. L. (2001). Interovulatory intervals of embryo donor mares administered deslorelin acetate to induce ovulation. *Theriogenology* 55: 362.
13. Gastal EL, Gastal MO, Bergfelt DR, Ginther OJ. (1997). Role of diameter difference among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. *Biol Reprod.* 57. 1320-1327.
14. Gastal, E. L., Silva, L. A., Gastal, M. O., Evans, M. J. (2006). Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 94: 186-190.

15. Gastal, M. O., Gastal, E. I., Ginther, O. J. (2006). Effect of hCG on characteristics of the wall of the developing preovulatory follicle evaluated by B-mode and color-doppler ultrasonography and interrelationships with systemic estradiol concentration in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 94: 195-198.
16. Ginther, O. J. (1998). Equine pregnancy: physical interactions between the uterus and conceptus. *Proceeding of the 44th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners.* 44. 73-104.
17. Ginther, O. J. (1999). Equine pregnancy: Eleven Months of Intrauterine Activity (Video). Equiservices Publishing. Cross Plains. Wisconsin.
18. Ginther, O. J. (1995). *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Horses.* Book 2. Cross Plains. WI. USA. 124-155.
19. Ginther, O. J., Wentworth. B. C. (1974). Effect of a synthetic gonadotropin-releasing hormone on plasma concentrations of luteinizing hormone in ponies. *Am. J. Vet. Res.* 35: 79-81.
20. Ginther, O. J., Pierson, R. A. (1984). Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. *Theriogenology* 21: 505-515.

21. Ginther, O. J., Utt, M. D., Bergfelt, D. R., Beg, M. A. (2006). Controlling interrelationships of progesterone/LH in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 95(1): 144-150.
22. Grimmett, J. B., Perkins, N. R. (2001). Human chorionic gonadotropin (hCG): the effect of dose on ovulation and pregnancy rate in thoroughbred mares experiencing their first ovulation of the breeding season. *New Zealand. Vet. J.* 49: 88-93.
23. 早坂昇治 (1996). 馬たちの33;時代を彩った馬の文化:緑書房:9-14. 218-237. 293-303.
24. Hamada, T., Watanabe, G., Kokuho, T., Taya, K., Sasamoto, S., Hasegawa, Y., Miyamoto, K., Igarashi, M. (1989). Radioimmunoassay of inhibin in various mammals. *J. Endocrinology.* 122: 697-704.
25. Harrison, L. A., Squires, E. L., McKinnon, A. O. (1991). Comparison of buserelin and luproston for induction of ovulation in cycling mares. *Equine. Vet. Sci.* 11: 163-166.
26. Hays, KE., Pierson, RA., Scraba, ST., Ginther, OJ. (1985). Effect of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. *Theriogenology* 24. 465-477.

27. 北海道馬産史編集委員会 (1983). 蹄跡. Pp. 737-764. デーリィマン社, 札幌.
28. 北海道馬産史編集委員会 (1983). 蹄跡. Pp. 131-158. デーリィマン社, 札幌.
29. 北海道馬産史編集委員会 (1983). 蹄跡. Pp. 269-315. デーリィマン社, 札幌,
30. 石井三都夫 (2003). 重挽馬における分娩後の繁殖成績低下の要因とその予防および対策に関する研究, 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 (学位論文) ,7-8.
31. 岩崎徹 (2012). 戦後における北海道馬産の歴史 (上) . 経済と経営. 43-1. 83-85.
32. 岩崎徹 (2013). 戦後における北海道馬産の歴史 (下) . 経済と経営. 43-2. 221-225.
33. Johnson, AL . (1986). Pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone advances ovulation in cycling mares. Biol Reprod. 35: 1123-1130.
34. 柏村文朗 (1998). 仏国の農用馬資源について ; 平成 9 年度挽用馬生産振興方策検討後援資料, 北海道, 挽用馬生産振興対策協議会 : 24-25.
35. Kaneko, M., Miyake, Y., Kaneda, Y., Watanabe, G., Taya, K. (1995). Induction of estrus and promotion of fertility by prostaglandin F₂α administration in mares. J. Equine Sci. 6: 7-14.

36. 公益社団法人・日本馬事協会 (2017). 平成 28 年度馬関係資料. Pp. 37, 44, 71.
農林水産省, 東京.
37. 古林栄一 (2008). 北海道の馬と競馬の歴史,北海道の馬文化と馬の知識. Pp.
8-18. 特定非営利活動法人・とち馬文化を支える会, 帯広.
38. 楠瀬良 (1996). 馬の医学書, 日本中央競馬会競争研究所 : 3-14.
39. McCue, P. M., Farquhar, V. J., Carnvale, E. M., Squires, E. L. (2002).
Removal of deslorelin (OvuplantTM) implant 48 hours after administration
results in normal interovulatory intervals in mares. Theriogenology 58: 865-
870.
40. Meineke, B., Gips, H., Meinecke, T. S. (1987). Progestagen androgen and
oestrogen levels in plasma and ovarian follicular fluid during the oestrus
cycle of the mare. Anim. Reprod. Sci. 12: 255-265.
41. Meyers, P. J., Bowman, T., Blodgett, G., Conboy, H. S., Gimenez, T., Reid,
M, P., Taylor, B. C., Thayer, J., Jochle, W., Trigg, T. E. (1997). Use of
the GnRH analogue, deslorelin acetate, in a slow-release implant to
accelerate ovulation in oestrus mares. Vet. Rec. 140: 249-252.
42. Merkt, H., Gunzel, AR. (1979). A survey of early pregnancy losses in
west German thoroughbred mares. Equine. Vet. J. 11. 256-258.

43. Michel, T. H., Rossdale, P. D., Cash, R. S. (1986). Efficacy of human chorionic gonadotrophin and gonadotropin releasing hormone for hastening ovulation in throughbred mares. *Equine. Vet. J.* 18: 438-442.
44. 三宅勝, 佐藤邦忠 (1992). 農用馬生産の手引き. 20-25.
45. Miyakoshi, D., Ikeda, H., Maeda, M., Shibata, R., Siki, M., Ito, K., Sonoda, K., Nanbo, Y. (2014). Efficacy of human chorionic gonadotropin for inducing ovulation in thoroughbred mares relative to follicle diameter and uterine edema pattern. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 67: 183-187.
46. Miyakoshi, D., Shikichi, M., Ito, K., Iwata, K., Okai, K., Sato, F., Nanbo, Y., (2012). Factors influencing the frequency of pregnancy loss among thoroughbred mares in hidaka, Japan. *J. Equine Vet. Sci.* 32: 552-557.
47. Nagamine, N., Nanbo, Y., Nagata, S., Nagaoka, K., Tsunoda, N., Taniyama, H., Tanaka, Y., Tohei, A., Watanabe, G., Taya, K. (1998). Inhibin secretion in the mare: Localization of inhibin alpha, betaA, and betaB subunits in the ovary. *Biol Reprod.* 59: 1392-1398.
48. 南保泰雄 (2016). 馬の繁殖管理-馬を専門としない獣医師のための馬繁殖検査. *臨床獣医* Vol. 34. No. 3. 緑書房 p17-21.

49. Nett TM, Pickett BW, Squires EL. (1979). Effect of equimate (ICI-81008) on levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and progesterone during the estrous cycle of the mare. *J Anim Sci.* 48: 69-75.
50. Newcombe, J. R. (1995). Incidence of multiple ovulation and multiple pregnancy in mares. *Vet Rec.* 137: 121-123.
51. 日本馬事協会 (1995). 日本馬事協会農用馬生産関係資料.
52. 納敏, 一條茂, 竹田孝夫, 渡部賢明, 徳本勝弘, 高橋英二 (1989). 重種の子馬白筋症に関する臨床並びに臨床病理学的所見. *日獣会誌* ; 45 : 927-929.
53. Oxender, W. D., Noden, P. A., Pratt, M. C. (1997). Serum luteinizing hormone, Estrus, and ovulation in mares following treatment with prostaglandin F_{2α} and gonadotropin-releasing hormone. *Am. J. Vet. Res.* 38: 649-653.
54. Perkins, N. R., Grimmett, J. G. (2001). Pregnancy and twinning rates in thoroughbred mares following the administration of human chorionic gonadotropin (hCG). *New Zealand. Vet. J.* 49: 94-100.
55. Pierson, R. A., Ginther, O. J. (1985). Ultrasonic evaluation of the preovulatory follicle in the mare. *Theriogenology* 24: 359-368.

56. Pope, A. M., Campbell, D. L., Davidson, J. P. (1979). Endometrial histology and post-partummares treated with progesterone and synthetic GnRH (AY-24,031). J. Reprod. Fertil. Suppl. 27: 587-591.
57. Roser, J. F., Kiefer, B. L., Evans, J. W., Neepley, D. P., Pacheco, D. A. (1979). The development to human chorionic gonadotropin following its repeated injection in the cyclic mare. J. Reprod. Fertil. Suppl. 27: 173-179.
58. Samper, J. C., Pycock, J. F., Mckinnon, A. O. (2007). Current Therapy in Equine Reproduction. Co Saunders WB, Philadelphia.
59. Samper, J. C. (1997). Ultrasonographic appearance and the pattern of uterine edema to time ovulation in mares. Proc. Am. Ass. Equine. Practnrs. 43: 189-191.
60. 島村努, 石井三都夫, 内村昌彦, 実川豪志, 高山裕章, 小澤みどり (1997). 一農家で発生した重種馬新生子馬の白筋症の2例. 北獣会誌 ; 41 : 33-35.
61. Sullivan, J. J., Parker, W. G., Larson, L. L. (1973). Duration of estrus and ovulation time in nonlactating mares given human chorionic gonadotropin during three successive estrous periods. J. Am. Vet. Med. Assoc. 162: 895-898.

62. 十勝獣医師会有志一同 (2010). 十勝の馬産と診療小史. Pp. 1-24. 十勝獣医師会有志, 帯広.
63. Tunoda, N., Akita, H., Tagami, M., Ogata, S., Oosaki, K., Ikeda, M., Hara, K., Satou, K., Kwaguchi, M., Iwama, K. (1989). Effect of synthetic gonadotropin releasing hormone on ovulation and fertility in mares. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 42 : 477-479.
64. Voss, J. L., Sullivan, J. J., Pickkett, B. W., Parker, W. G., Burwash, L. D., Larson, L. L. (1975). The effect of hCG on duration of oestrus, ovulation time and fertility in mares. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 23: 297-301.
65. Watoson, E. D., Thomassen, R., Nikolakopoulos, E. (2003). Association of uterine edema with follicle waves around the onset of the breeding season in pony mares. *Theriogenology* 59: 1181-1187.
66. Yang, YJ., Cho, GJ. (2007). Factors concerning early embryonic death in thoroughbred mares in South Korea. *J. Vet. Med. Sci.* 69. 787-792.

学位論文要旨

馬は長日性の季節繁殖動物で、一繁殖季節中の交配回数が限られ、発情持続時間は 6.8 ± 2.3 日と他の家畜に比べて長く、交配適期の的確な判断と早期の確実な妊娠診断が要求される。軽種馬とは使役目的が異なり、肉用馬としての一面を持つ重挽馬は経済的で効率的な繁殖管理技術が要求される。しかし、その生産効率は軽種馬に比べ低く推移している現状がある。軽種馬に関する繁殖生理の研究が進められている一方で、北海道十勝・道東地方で生産が盛んな、重挽馬の繁殖生理に関する研究報告は見当たらない。本研究では重挽馬の交配適期の診断根拠と、排卵の同期化、早期の的確な妊娠診断の指標を明らかにし、重挽馬の繁殖特性に関する臨床獣医学的な知見を得ることを目的とした。

第1章では重挽馬の交配適期の指標を明らかにすることを目的に、発情期の主席卵胞と子宮の形態的推移を超音波画像検査にて観察し、排卵時期の診断根拠を明らかにし、経済的な排卵同期化と内分泌動態について調査した。サラブレッド種では主席卵胞の直径が 40mm 以下でも 81.3% と高率に排卵するが、観察した重挽馬、のべ150頭の排卵24時間以内の卵胞の直径は 53.8 ± 5.4 mm であり、排卵する月による差は認められず、重挽馬の排卵前の卵胞の直径は約 50mm 以上と推察された。排卵前 24~6 時間では球形から円錐形、また洋梨状へと卵胞の形態的变化が認められ、6 時間以内では卵胞壁の高輝度な二重構造

が観察された。子宮の浮腫像は排卵 4～3 日前にピークを迎え、減少または消失して排卵が確認された。交配適期は子宮の浮腫像が明瞭な時期ではなく、45mm 以上の主席卵胞を有し、子宮の浮腫像が不明瞭な時であると推察された。一般的に馬の排卵誘起には、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) が用いられている。hCG は経済的で高い排卵効果の反面、血中半減期が長く複数排卵による双胎妊娠のリスクや、抗体産生による反応性の低下が指摘されている。そこで、hCG に代わって、GnRH 類似体ブセレリンの交配適期における単回投与の排卵効果と内分泌動態の検討を行った。ブセレリンの至適投与量を $40 \mu\text{g}$ とし、交配適期に投与したところ、LH, FSH の一過性の上昇が誘起され 48 時間以内に排卵が確認された。ブセレリン $40 \mu\text{g}$ 単回投与が、受胎性を高める排卵同期化法として有用であることが推察された。さらに、排卵の同期化により交配回数を減らすことは交配誘導性子宮内膜炎のリスクを低減し、重働馬の効率的、衛生的な繁殖管理技術になりうると推察された。

第 2 章では、重働馬の妊娠ステージにおける胚胞発育の形態的特徴を明らかにし、的確な早期妊娠診断の指標を確立するために、胚胞の発育経過における形態的特徴を調査した。排卵確認日を 0 日として 9～40 日まで、超音波画像検査による胚胞の確認をおこなった。発育経過に伴う胚胞の形態変化と、胚胞の異なる 2 径の平均を胚胞径として計測した。重働馬の胚胞は、排卵後 9～10

日で5～5.5mmの円形(球状)の無エコー領域として、子宮角の横断面の中心に確認された。胚胞の多くは12(12.4±0.7mm)～16日(26.1±3.4mm)に、円形(球状)の無エコー領域のカプセルとして観察された。この時期、背側と腹側の境界では正反射(specular reflections)が高輝度エコー域として観察された。この間、胚胞は子宮内を移動し、特に12～14日での移動性は活発であった。17～18日の胚胞はわずかに卵円形を呈し、19日(32±2.5mm)以降は次第に三角形から不規則な形状で推移し、22～25日には胚胞の底側3分の1に胚子(5～10mm)を確認することができた。排卵後18～28日の胚胞は約35mm前後で不規則な形態で推移し、この期間の胚胞径に大きな変化は観察されなかった。重挽馬の胚胞の成長曲線はS字状カーブを示し、胚胞径増加が停滞する際の大きさは30～40mmで他の馬種より大きい傾向が観察された。この差は馬の種類による子宮形状の相違に起因することが推測された。重挽馬の定期的な妊娠診断を行うに当たり、胚胞の発育経過に伴う特徴を把握した上で妊娠診断することが重要である。超音波画像検査による重挽馬の理想的な妊娠診断の時期と回数として、初回は双胎妊娠の減胎処置が可能な15日前後、2回目は胚死滅率が低下し、胚子心拍が確認できる30日前後の2回行うことが推奨された。

以上のことから、重挽馬の交配適期は約45mm以上の主席卵胞を有し、子宮の浮腫像が不明瞭な時とし、ブセレリン40 μ g単回投与は排卵誘起に有用であ

ると考えられた。また、胚胞の発育経過による形態的特徴を根拠に的確に妊娠診断をすることによって、正常な胚胞の発育と子宮内膜嚢胞（シスト）との類症鑑別、双胎妊娠や早期胚死滅の診断を的確に行うことによって、限られた交配期間に効率よく受胎させ、肉用馬としての一面がある重挽馬の生産性向上に結びつくと推察された。

Abstract

Studies on Establishment of Objective Diagnostic Criteria for Ovaries and Uterus Using Ultrasonographic Examinations of Heavy Draft Mares

Horses are a seasonally polyestrous species with a limited breeding season, the estrus duration is 6.8 ± 2.3 days, which is longer than that of other livestock animals, and accurate prediction of the mating season and early and reliable pregnancy detection are required. Heavy draft horses, which are also meat breeds, are used for purposes different from those of light breed horses, and economical and efficient reproductive management technologies are required for these horses. However, their production efficiency has been lower than that of light breed horses. Although reproductive physiology in light breed horses has been extensively studied, no reports can be found on the reproductive physiology of heavy draft horses, which are actively bred in Tokachi and the eastern regions of Hokkaido. This study aimed to clarify the diagnostic criteria for optimal time of the mating, clinical indices for ovulation synchronization, and early and accurate pregnancy detection. Present dissertation shows clinical veterinary findings concerning the reproductive characteristics of heavy draft horses.

In Chapter 1, to determine the index of the optimal mating period in heavy draft horses, morphological changes of the dominant follicle and uterus in the estrus period

were observed using ultrasonography. The diagnostic criteria for ovulation were determined, and economic ovulation synchronization and endocrinological dynamics were investigated. In thoroughbred species, even dominant follicles with a diameter of 40 mm below ovulate at a high rate of 81.3%. In contrast, the diameter of follicles observed within 24 h before ovulation from total 150 horses was 53.8 ± 5.4 mm without significant differences in size depending on the month of ovulation, and the diameter of pre-ovulation follicles in heavy draft horses was estimated to be approximately more than 50 mm. Follicles underwent a morphological change from spherical to conical or pear-shaped in 24–6 h before ovulation, and the double-layered structure of the follicular wall was observed within 6 h before ovulation. The edema image of the uterus peaked 4–3 days before ovulation, and then decreased or disappeared, and ovulation was confirmed. The optimal mating period of heavy draft horses was estimated to be a period in which the follicle diameter is approximately more than 45 mm and the uterus edema image is unclear, rather than a period with a clear uterus edema image. Generally, human chorionic gonadotropin (hCG) is used to induce ovulation in horses. Although hCG is economical and has potent ovulation effect, it has a long half-life in blood and has been reported to have a risk for bigeminal pregnancy owing to multiple ovulation and decreased reactivity caused by antibody

production. Therefore, the ovulation effect and endocrinological dynamics were examined in horses that received a single dose of the GnRH analogue buserelin, instead of hCG, in the optimal mating period in heavy draft horses. When buserelin was administered at the optimal dose of 40 µg in the identified optimal mating period, transient increases of LH and FSH were induced and ovulation was confirmed within 48 h after the treatment. Single administration of 40 µg buserelin was considered to be useful for ovulation synchronization, it makes it possible to reduce the risk for copulating-induced endometritis, and can be an efficient and sanitary breeding management technique for heavy draft horses.

In Chapter 2, to clarify morphological characteristics of embryonic vesicle growth in heavy draft horses in the gestational stage and to establish an index for accurate and early pregnancy detection, the change in the shape embryonic vesicles was investigated. Embryonic vesicles were monitored by ultrasonography from day 9 to day 40 (day 0 being the day of confirmation of ovulation). Changes in the shape and diameter (measured as the mean of two different diameters) of embryonic vesicles over the developmental process were measured. Embryonic vesicles were confirmed as a 5–5.5-mm spherical echo-free region at the center of a cross-sectional surface of the uterine horn observed 9–10 days after ovulation. The majority of embryonic vesicles

were observed as capsules in the spherical echo-free region from day 12 (12.4 ± 0.7 mm) to day 16 (26.1 ± 3.4 mm). During this period, specular reflections were observed as a hyperechoic region on the dorsal boundary. Embryonic vesicles migrated within the uterus during this period; their motility was particularly remarkable on days 12–14. The shape was slightly oval on days 17–18, then gradually changed from triangle to an irregular shape, and finally an embryo (5–10 mm) could be confirmed in the bottom third of the embryonic vesicle on days 22–25. Embryonic vesicles on post-ovulation days 18–28 remained in an irregular shape of approximately 35 mm size, and no changes in the embryonic vesicle diameter were observed during this period. The growth of heavy draft horse embryonic vesicles was represented by an S-shaped curve with a plateauing diameter of 30–40 mm, which is larger than that observed in any other breed of horses. This difference was attributable to the uterine shape differences depending on the breed of horses. To conduct regular pregnancy evaluation of heavy draft horses, it is important to understand the characteristics of embryonic vesicles over the developmental process. Pregnancy evaluation of a heavy draft horse should ideally be performed twice, first evaluation around day 15, at which selective reduction of bigeminal pregnancy is possible, and the second around day 30, at which the embryonal mortality is decreased and embryonic heart beats can be detected.

These results suggest that the optimal mating season of heavy draft horses is when there is a dominant follicle of approximately more than 45 mm in size and the uterus edema image is unclear, and a single administration of buserelin 40 µg in this period is useful for induction of ovulation without individual difference. In addition, discrimination between normal embryonic vesicle growth and an endometrial cyst and accurate diagnosis of bigeminal pregnancy and early embryonic death through accurate pregnancy evaluation on the basis of morphological characteristics of embryonic vesicles over the developmental course facilitate efficient conception in a limited mating period and result in improved productivity of heavy draft horses, which are also used as meat horses.