

# 馬の選択的卵管通水法に関する研究

令和 5 年  
(2023 年)

帯広畜産大学大学院畜産学研究科

井上 裕士

Selective hysteroscopic hydrotubation  
in mares

2023

INOUE Yuji

Graduate School of  
Animal and Veterinary Sciences and  
Agriculture  
Obihiro University of  
Agriculture and Veterinary Medicine

# 目次

第 1 章 緒論.....	1
1-1 馬の生産性向上の意義と歴史.....	2
馬産業としての背景.....	2
受胎率の向上.....	2
1-2 受胎率向上のための診断, 治療方法の技術的進歩.....	3
超音波診断の普及.....	3
子宮鏡検査の発展.....	3
不妊の主要な原因としての子宮内膜炎.....	4
1-3 馬の卵管性不妊.....	5
原因不明の不妊症と卵管疾患.....	5
馬の卵管の解剖学的構造.....	6
卵管内での受精卵の形成と成長.....	6
卵管内のコラーゲン塊.....	6
卵管閉塞による不妊の診断と治療の歴史的経緯.....	7
1-4 人の医療での卵管通水法.....	9
1-5 今回の研究の目的.....	10
1-6 図表.....	11
第 2 章 内視鏡下選択的卵管通水法による卵管疎通の診断法の 確立.....	22
2-1 背景と目的.....	23
2-2 材料および方法.....	25
供試馬.....	25
卵管通水法の手順.....	25
腹水の採取.....	28
処置後の卵管の観察.....	28
2-3 結果.....	29

卵管子宮口へのカテーテル挿入の成功率.....	29
内視鏡による卵管の色素疎通の直接的な確認.....	30
腹水着色の確認.....	30
2-4 考察.....	31
2-5 図表.....	36
 第3章 原因不明の不妊症に対する内視鏡下選択的卵管通水法 による治療の臨床応用 .....	54
3-1 背景と目的.....	55
3-2 材料および方法 .....	59
治療対象馬の選抜 .....	59
供試馬のグループ分け .....	60
卵管通水法の実施時期 .....	60
卵管通水法の手順 .....	60
術後の処置と管理 .....	62
3-3 結果 .....	62
卵管子宮口へのカテーテル挿入の成功率.....	63
卵管通水処置後の受胎率 .....	63
受胎までの交配回数.....	63
左卵管のみ処置が可能であった症例 .....	63
双胎の発生率 .....	64
出産率 .....	64
3-4 考察.....	64
3-6 図表.....	69
 総括 .....	77
 謝辞 .....	79
 Summary .....	80

参考文献.....	83
-----------	----

## 第 1 章 緒論

## 1-1 馬の生産性向上の意義と歴史

### 馬産業としての背景

日本国内で生産される馬のほとんどは、将来競走馬になるべく生産、育成される高価な品種であるサラブレッド種である。このサラブレッド種は、産業動物でありながら主に富裕層に所有されるという特性を持ち、その市場は日本全体の景気動向に大きく左右される。ジャパNSTタッドブックインターナショナル軽種馬統計によると、国内のバブル経済がはじけた直後の 1992 年には血統登録された供用繁殖牝馬は 15,512 頭、産駒数は 10,212 頭であったが、地方競馬場の閉鎖等も手伝って需要が縮小した (Fig. 1-1)。近年まで生産頭数は減少傾向にあったが、市場価格はかならずしも低下傾向にあるわけではなく、この数年で競馬産業の活性化に伴い生産頭数も増加傾向にある (Fig 1-2)。その個体価値は依然として著しく高いこともあり、サラブレッド生産に携わる獣医師には、その生産性を高めるため最大限の技術的な研鑽が常々求められている。

### 受胎率の向上

サラブレッド種の受胎率は世界的に年々向上している。例えばイギリスおよびアイルランドでは、Weatherbys' statistical review 1977~2003 のデータによると、年間交配されたサラブレッド種牝馬は 14, 556 頭から 23, 136 頭に増加している一方、受胎率（再交配しなかった牝馬や死亡もしくは輸出された牝馬を除外する）は 77.5%から 89.3%に上昇している (Fig. 1-3)。管理が行き届いた牧場では、その受胎率は 90%を超え、生産率も 80%超であると報告されている[1]。世界一のサラブレッド生産国であるアメリカでの正確なデータは公表されていないが、ほぼ同様であると考えられる。国内においても、ジャパNSTタッドブックインターナショナル軽種馬統計における 1982 年から 2016 年までのデータによれば、受胎率（全交配頭数から不受胎であった

と報告された頭数を引いた割合)は 1984 年の最低値 78.4%から 2016 年の最高値 82.6%に上昇していることが示されている (Fig. 1-4)。

## 1-2 受胎率向上のための診断, 治療方法の技術的進歩

### 超音波診断の普及

国内外を問わず 1980 年代にはいると受胎率の飛躍的な向上が見られるが, これは主に超音波診断装置の普及により, 妊娠初期に正確な妊娠診断が可能となったことに起因していると考えられる。さらに, 通常の直腸検査時に超音波診断装置を用いることにより, 触診だけでは判別することができなかった子宮内膜の浮腫, 子宮内貯留液の状態や卵巣の状態等を客観的に描出することが可能となった (Fig. 1-5) [2, 3]。このことによって生殖器疾患の診断や交配的期の判定等の判断材料となり, そのことが結果として馬の生産効率を高めるうえで大きく寄与してきたことと推察する。

### 子宮鏡検査の発展

超音波診断装置に加え, 人用大腸ファイバースコープを用いた子宮内視鏡検査が可能になったことも子宮内膜における疾患の診断, 治療に大きく貢献している [4, 5, 6]。現在ではビデオエンドスコープが普及しており (Fig. 1-6), より鮮明に子宮内膜を観察することが可能であり, 超音波検査では判別することができなかった子宮内の状態を直接観察することが可能となり, 診断の一助となっている [7]。

卵管内で形成された受精卵は, 胎令 5~6 日で桑実胚となった時点で PGE を放出し, 卵管の運動を促進することにより子宮内に移動すると考えられている。その後, fixation が発現する胎令 16 日程度までは子宮内を遊走し, 子宮腺から分泌される子宮乳を吸収することにより成長する。一方, 子宮内膜下のリンパ管の閉塞により形成される子宮内膜シストは加齢とともに頻繁に発



現するが、その数が多い、またはシスト自体が大型である場合など、妊娠初期における胎胞の子宮内遊走の妨げとなり不妊や早期杯消失の原因と判断される場合には、ビデオエンドスコープ監視下での高周波焼烙器もしくはレーザー焼烙器での処置が可能である[8, 9]。

#### 不妊の主要な原因としての子宮内膜炎

近年における診断機器の著しい発達に加え、不妊の原因となる疾患に対する診断方法も進歩してきた。例えば、牝馬の不妊の最大の原因は子宮内膜炎であるとされているが [10, 11]，子宮内からの細菌検査の採材方法として、過去には長鉗子に挟んだ綿棒を用いて子宮頸管を通じて子宮内に挿入し、それを細菌培養および細胞診に供していたが、現在ではいくつかの種類の **Double Guarded Swab** が市販されるようになり (Fig. 1-7)，腔内でのコンタミネーションを避けると同時に、より精度の高い検査ができるようになった[12]。さらに先端をブラシ状になったスワブが開発され (Fig. 1-8)，子宮内膜のより深部のサンプルを採材することが可能となっている。一方、このような棒状の器具では、子宮頸管を通じて子宮内に挿入すると、サンプルは子宮体部の一部のみしか採取できないという欠点を有する。これを解消するために、少量の滅菌生理食塩水を子宮内に注入し、その灌流液を遠心分離し沈渣を得て鏡検および培養することにより、さらに精度が高い検査方法が開発された [12, 13, 14, 15]。

このような診断技術の発達に伴い、子宮内膜炎に対する治療方法も改善されてきている。以前、子宮内膜炎は子宮洗浄の実施、またはこれに加えて抗菌薬やヨード剤などの子宮内投与を行うことが主流であったが、いくつかの子宮内膜炎の原因菌がバイオフィルムを産生することが証明されて以来 [16]，アセチルシステイン [17, 18]，ジメチルスルフォキシド [19, 20]，EDTA-tris[21]，過酸化水素水 [22, 23] 等のバイオフィルム溶解剤が併用されるようになってきた。

近年、子宮内膜深部で休眠状態になって感染している細菌についても研究されている。Nielsen [24] は不妊馬 84 頭において、*Streptococcus equi subsp zooepidemicus* は子宮内膜上からスワブを用いて採取したサンプルでは 21 頭 (25%) で培養されたのに対し、子宮内膜のバイオプシーサンプルからは 61 頭 (73%) から培養されたと報告した。これに続いて同じグループの Petersen [25] は、fluorescence *in situ* hybridization (FISH 法) を用いて試験的に感染させた *Streptococcus equi subsp zooepidemicus* が子宮粘膜固有層の深部において休眠状態で存在することを示し、それが慢性子宮内膜炎の原因となり、過剰な粘液産生を誘起して不妊の原因となることを示唆している。このような潜在感染が診断もしくは疑われた場合には、休眠状態である細菌に対する特殊な培地となる溶液を子宮内に投与することにより活性化させたのちに、抗生物質等で死滅させる方法が提唱されている [26]。

### 1-3 馬の卵管性不妊

#### 原因不明の不妊症と卵管疾患

上述のように卵巣や子宮疾患の診断、治療の技術は年々進歩し、それに伴い受胎率も向上してきた。しかし、このような方法を駆使しても不妊の原因が解明されない症例にしばしば遭遇する。

不妊症の原因となる馬の卵管疾患として、卵管水腫 [27, 28], 卵管采の癒着 [29, 30]などが報告されている。しかし、これらの報告の中での卵管疾患に対し生前診断を行うことは困難であり、死後剖検によって解明されてきた。これは、後述のように馬の卵管子宮口が特殊な形状をしていて、卵管に対する診断的アプローチが困難であることに起因している。現時点では卵管疾患による不妊症の診断および治療法として、臨床的に応用が可能である方法は開発されていない。したがって、原因が解明されない不妊症の症例では、卵管の疾患はその原因となる可能性がある一因として考慮すべきである。

## 馬の卵管の解剖学的構造

馬の卵管は、卵巢間膜の延長にある卵管間膜に包まれた卵巢と子宮を結ぶ著しく迂曲した細管である (Fig. 1-9)。馬の卵管は 25～30cm の長さで、子宮の内腔から発達した平滑筋により小乳頭状に隆起している卵管子宮口 *Ostium uterinum tubae* をもって始まり、子宮壁を通過して直径 2～3mm の卵管峡部 *Isthmus tubae uteinae* として卵管間膜を走行する[31]。その太さは全管通じて同じではなく、腹腔側では直径 4～8mm の卵管膨大部 *Ampulla tubae uteinae* を形成し、さらに卵管漏斗 *Infundibulum tubae uterinae* となって卵管腹腔口 *Ostium abdominale tubae uterinae* で開口している[32]。

## 卵管内での受精卵の形成と成長

交配により子宮内に射精された精子は、卵管子宮口に達した後、そこから卵管内に進入し、卵管上皮細胞の絨毛と癒着する。その数は約 4 時間後にはピークとなり、卵巢から卵子が排卵されるまでに受精能を獲得し、排卵のタイミングと同時に卵管上皮を離脱する。これは卵胞液の作用によると推察されている。その後、受精部位である卵管膨大部と峡部の境界部に到達し、排卵された卵子を待ち受ける[33]。一方、卵巢で排卵された卵子は卵管腹腔口より卵管内に取り込まれ、精子と結合して受精卵を形成した後、約 5.5 日で桑実胚になった受精卵から PGE が分泌され、それが卵管絨毛の運動を誘起して受精卵が子宮内に進入する[34, 35, 36]。一方、未受精に終わった卵子は子宮内に入ることはなく、長期間卵管内に滞在する[34, 37, 38, 39, 40, 41, 42]。

## 卵管内のコラーゲン塊

馬の卵管内には高い確率でゼラチン塊が存在することが知られている[43, 44, 45, 46]。このゼラチン塊は I 型コラーゲンである原線維と線維芽細胞で構成されているが、排卵時に卵管内に進入した結合組織がそのまま留まり、少なくとも数日間コラーゲン形成が持続したことにより形成されたものと推察されている[47]。

このゼラチン塊の大きさは多くの場合卵管を閉塞するほどのものではないため、臨床的な意義は重要視されていなかった。しかし、Liu ら [48]は剖検により採取された卵管が完全にコラーゲン塊により内腔が閉塞している症例を報告し、また Lantz [47]は同様に、卵管が肉眼的にも膨満し、その部位が大型のコラーゲン塊により完全に閉塞している症例を報告している。両者はこのように卵管腔内を完全に閉塞するコラーゲン塊が存在する場合には、それが不妊の原因となる可能性を示唆している。このような卵管の閉塞は、特に老齢馬でみられる傾向があり、平均年齢は 18 歳であったと報告されているが[49]、その年齢層は 9～26 歳と広い範囲に及ぶ。

#### 卵管閉塞による不妊の診断と治療の歴史的経緯

経直腸的な卵管の触診および超音波検査、または肉眼的もしくは腹腔鏡を用いた視診で卵管の疎通性障害を診断することは、ほとんどの場合不可能である。そこで卵管内に色素等を通水することにより、その疎通性を診断する、あるいは卵管を閉塞しているコラーゲン塊を除去する方法が考案されてきた。

卵管子宮口が閉鎖しておらず、子宮腔から卵管腔へスムーズに移行するヒト[50, 51, 52, 53]やウシ[54, 55, 56, 57]と比較して、馬の卵管子宮口は子宮内腔の両側端で発達した平滑筋により小乳頭状に隆起し、その開口部は著しく狭い[58] (Fig. 1-10, 1-11)。また子宮側より 1/3 程度の卵管峡部では平滑筋層が発達していて、それが括約筋の役割をしており、その形状もらせん状となっている[59]。この特殊な構造により子宮内からの細菌の進入を妨げられているため、卵管炎などの卵管疾患に起因する不妊は、人では不妊症の原因の 20.4～40.0%を占めていることに比べ[60, 61]、馬では比較的少ないとされている[62, 63, 64, 65]。その一方で、この解剖学的構造ゆえに、子宮腔からの卵管への診断的あるいは治療的アプローチは困難であるとされた[59, 66, 67]。このため、卵管の疎通性を検査する方法は、主に卵管采側からアプローチする方法がとられてきた。

初期の報告では、卵巢表面にマーカーとなる物質を塗布し、子宮腔内より回収する方法が検討された。Allen ら[68]は、馬の両側の臍部より注射針を刺入し、生理食塩水に顆粒状のでんぷんを攪拌した溶液を 5ml ずつ卵巢表面に吹きかけ、その 24 時間後に外子宮口と膣の頭側部を 20ml の生理食塩水で洗浄し、その回収液中にでんぷん顆粒が含まれているか 2%ルゴール溶液と混和し鏡検することにより確認した。また、Ley ら[69]は超音波ガイドにより経膣的に注射針を卵巢付近まで刺入し、色調の異なる蛍光性のマイクロスフェア（直径 15 $\mu$ m, 100 万個）を 5ml の生理食塩水に混入して左右それぞれの卵巢に吹きかけ、その 24 時間後および 48 時間後に子宮洗浄を実施し、その灌流液中にマイクロスフェアの存在をフローサイトメトリー法により確認することで卵管の疎通性を検証することを試みた。これら 2 つの方法は、卵管の疎通性の診断的なツールにはなり得るが、卵管を閉塞している細胞塊を取り除く治療法としては適していないとされている[66]。

次に、卵管采からバルーンカテーテルを挿入し、卵管膨大部で固定した後、卵管内に通水する方法が考案された。Bennet ら[66]は対象となる牝馬を全身麻酔下で開腹し、目視化で卵管采にバルーンカテーテルを挿入したのち、5%ニューメチレンブルー溶液を用いて卵管を通じて子宮腔内に通水する方法を試みた。この方法をより非侵襲的に実施する目的で、Kollman ら [67]は患馬を立位のまま鎮静させ、経膣的および臍部からのアプローチによる腹腔鏡視下で卵管膨大部にカテーテルの装着を試みた後、卵管にメチレンブルー溶液を子宮腔内に向けて疎通させた。この処置後に子宮鏡検査を実施し、色素の存在を観察することにより卵管の疎通性を検査している。

以上のような卵管采から卵管子宮口へ通水する方法が採用されてきたが、その欠点として、直径がより太い卵管膨大部から卵管峡部もしくは平滑筋により閉じられている卵管子宮口に水压をかけるため、卵管が細胞塊等により完全に閉塞しているケースでは、卵管を通水し細胞塊を取り除くことは不可能で、強すぎる水压をかけると卵管が破裂することがある[66]。全身麻酔下で開

腹して実施する場合は、麻酔に伴うリスクが発生し、開腹手術自体が侵襲的である。腹腔鏡下で実施した場合には、色素の溶液が逆流し、腹腔内に流出することにより、一時的な腹膜炎を発症した症例が報告されている[67]。また、腹腔鏡手術の設備にはコストがかかり、開腹手術ほどではないが侵襲的であり、経験が必要とされる。

近年、腹腔鏡観察下で卵管にプロスタグランディン E2 を含有するゲルを塗布する方法が報告された[70, 71]。プロスタグランディン E2 は受精卵が 6～9 日令の桑実胚になった際に卵管内で分泌する物質であり、卵管の平滑筋を弛緩させる作用があり[72, 73]、これに伴い受精卵は卵管から子宮腔内へと移送される。この PGE2 の作用を利用して卵管内の細胞塊を子宮腔内へ排出させようとする試みがとられた。しかし、細胞塊の大きさによっては卵管膨大部から峡部を通じ、卵管子宮口を通して細胞塊が排出されるのは不可能な場合が予想され、この方法も腹腔鏡を用いるため、ある程度の侵襲性、コスト、術者の熟練度などが必要とされる。

卵管子宮口から卵管采側へ通水する方法は、唯一報告されている[74]。その報告では、患馬を全身麻酔下で開腹し、左右それぞれの子宮角先端を腹腔外に露呈させたのち、卵管子宮口に近い部位を切開し子宮腔内を露呈させ、その術部より目視化で卵管子宮口にカテーテルを装着し、卵管の通水を実施した。この方法は、卵管の解剖学的構造から考えると理にかなった方向に通水することが可能であるが、全身麻酔のリスクが伴う。また開腹および子宮切開しなければならない方法であり、侵襲性が強いため、臨床例に用いるには限定的である。

#### 1-4 人の医療での卵管通水法

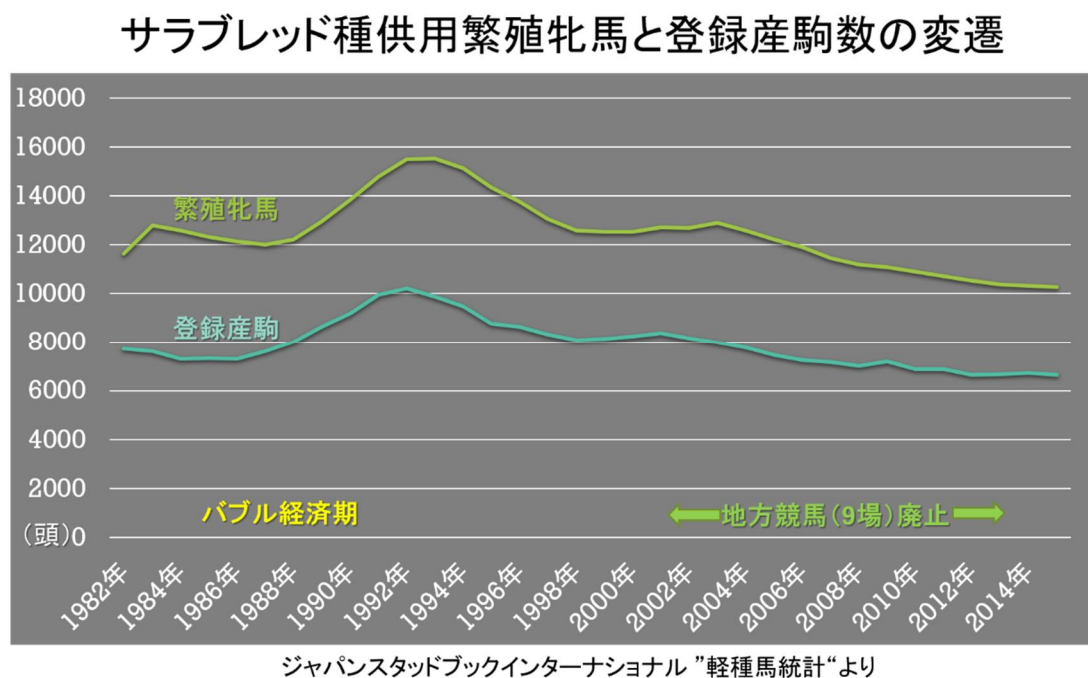
一方、人では卵管の疾患を診断および治療する方法として、子宮鏡観察下で卵管内に色素や造影剤を子宮内あるいは卵管内に直接注入し、卵管の疎通性を評価する方法が確立されている。生殖器の解剖学的構造は馬とは異なり、人の卵管子宮口は乳頭状に

突出しておらず平滑筋による開口部の緊縮がないため、子宮内に注入した気体または液体は子宮腔から卵管腔にスムーズに移行する。この解剖学的な構造から、卵管の疎通性を検査するには、卵管通気法や卵管通水法などがスクリーニング方法として挙げられるが、診断精度がより高く、卵管周囲の癒着も評価できる点から子宮卵管造影法 [76, 77, 78] が一般的に用いられている。この方法に加え、卵管の病変部位を特定する目的で、子宮内に注入された色素の卵管での疎通および腹腔内への漏出を、腹腔鏡を用いて確認する腹腔鏡下卵管通水法 [79] が報告されている。さらに近年において、数ミリ径のフレキシブルファイバースコープが開発されて以来、この子宮鏡観察下で外径 8～9 mm 程度のカテーテルを卵管子宮口に挿入し、生理食塩水や色素を注入し、その逆流の有無を観察することにより卵管の疎通性を確認する子宮鏡下選択的卵管通水法が確立されている [80, 81, 82]。

#### 1-5 今回の研究の目的

馬では子宮の内視鏡検査には人用の大腸ファイバースコープが用いられているが、本研究ではこのファイバースコープのワーキングチャンネルを通じて内視鏡観察下で卵管子宮口に挿入することが可能なカテーテルを作成した。第 1 章では、そのカテーテルが実際に卵管子宮口に挿入することが可能であるか検討した。またそのカテーテルを通じて色素を注入した場合、卵管を疎通し得ることを確認すると同時に、術後に腹水を採取し色素による着色を観察することにより、臨床的な卵管疎通性の確認が可能かどうか検証した。第 2 章では、不妊馬の臨床例から卵管の疎通性が疑われる症例を選抜し、実際に内視鏡下選択的卵管通水法を実施し、その後の受胎率を調査することにより、その方法が原因不明の不妊症の治療法としての有効性を検討した。第 3 章では、卵管通水法を用いて卵管内に極めて少数の精子を注入することによる人工授精法の可能性を模索した。

## 1-6 図表



**Fig. 1-1 サラブレッド種供用繁殖牝馬と登録産駒数の変遷**

バブル経済後の 1992 年に供用繁殖牝馬頭数およびその産駒数はそれぞれピークを迎えたが、2002 年ころから始まった地方競馬廃止に伴い徐々に減少傾向にある。



## サラブレッド種1歳馬 市場価格の推移

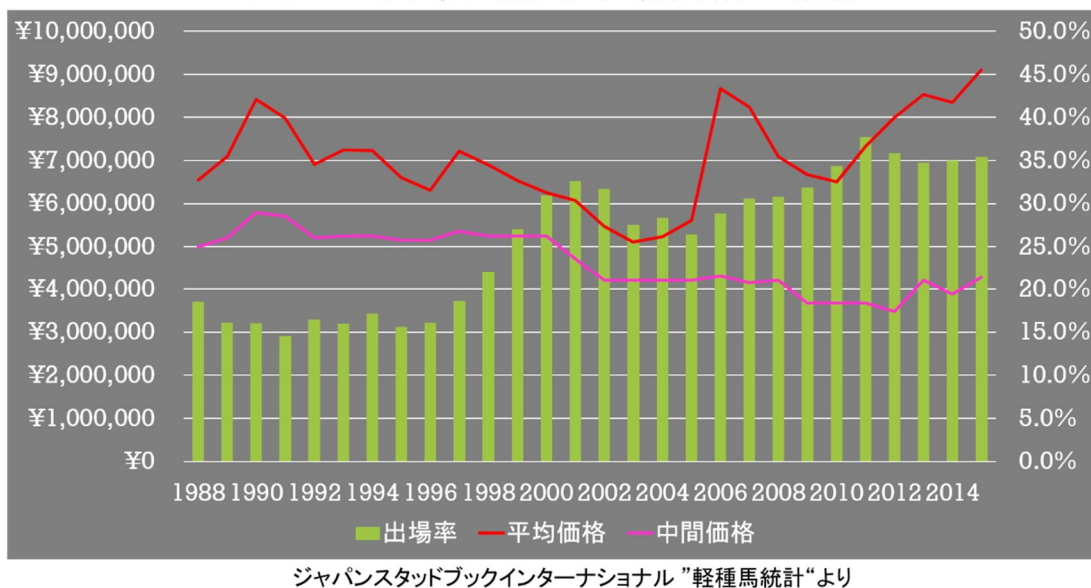


Fig. 1-2 サラブレッド種1歳馬の市場価格の推移

サラブレッド種1歳馬ではその生産頭数は年々減少傾向にあるが、市場の出場率増加に伴い平均価格は上昇傾向にある。

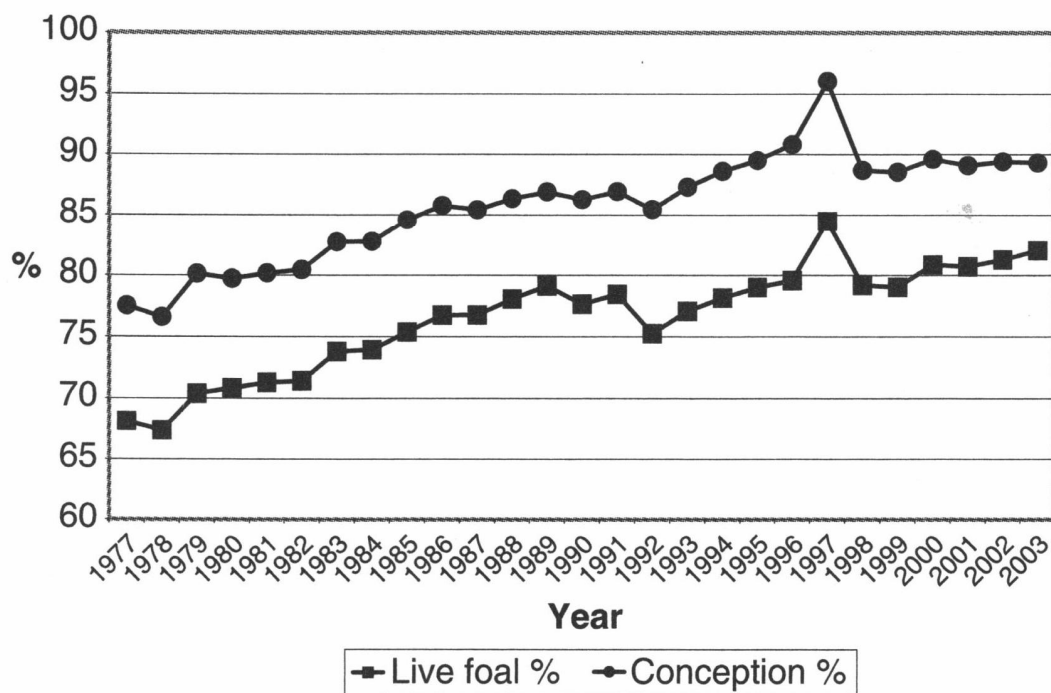


Fig. 1-3 イギリスにおけるサラブレッド種牝馬の受胎率の変遷  
(1977～2003 年)

1977 年と 2003 年のデータを比較すると、年間交配されたサラブレッド種牝馬は 14, 556 頭から 23, 136 頭に増加し、受胎率は 77.5%から 89.3%に上昇している。

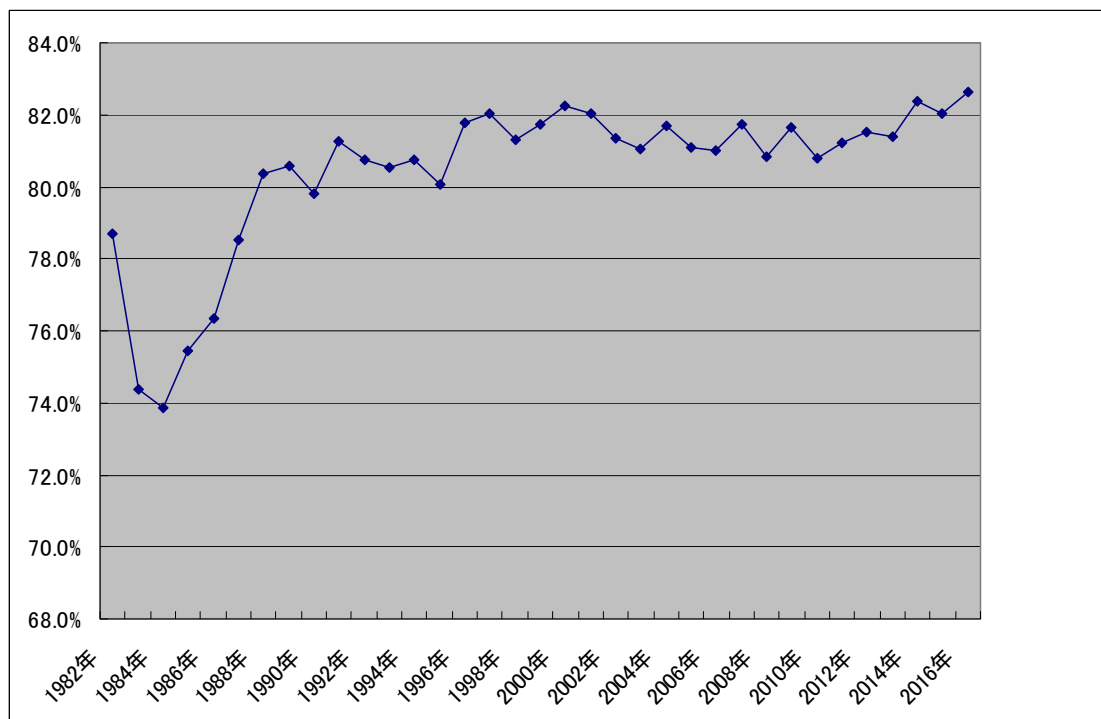


Fig. 1-4 日本国内におけるサラブレッド種牝馬の受胎率の変遷  
(1982～2016 年)

日本国内におけるサラブレッド種の受胎率は, 1984 年の最低値 73.9%から 2016 年の最高値 82.6%に上昇している。



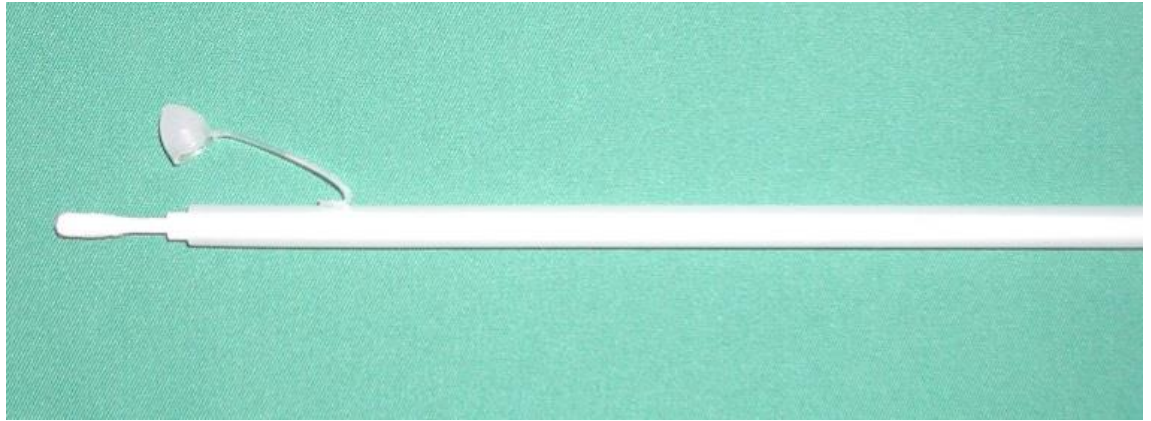
Fig. 1-5 エコー診断装置

近年、高性能な機能を有するエコー診断装置のポータブル化が進み、臨床現場で手軽に繊細な画像診断を実施することが可能となった。



Fig. 1-6 ビデオエンドスコープの一例（Olympus 社製 EVIS LUCERA ELITE）

主にモニター、ビデオプロセッサー、光源装置、内視鏡スコープで構成される。近年ではキセノンライト搭載により明るい視野が確保できるようになり、CCD カメラの性能が飛躍的に上がり画像はハイビジョン画質で出力される。



**Fig-1-7 Double Guarded Swab**

Kalayjian 社製の KI-3000 Guarded Culture Instruments。先端を子宮頸管を通じて子宮内に挿入後，内側の綿棒を押し出すと先端のキャップが開き，コンタミネーションを避けながら子宮粘液の採取が可能である。



**Fig-1-7 Brush Swab**

Minitube 社製の Uterus Culture Swab。2重構造のシースを有し，コンタミネーションを避けることができるとともに，ブラシ上の先端部を子宮内膜にこすりつけることにより，子宮内膜表面だけではなくより深部のサンプルを採取することが可能である。

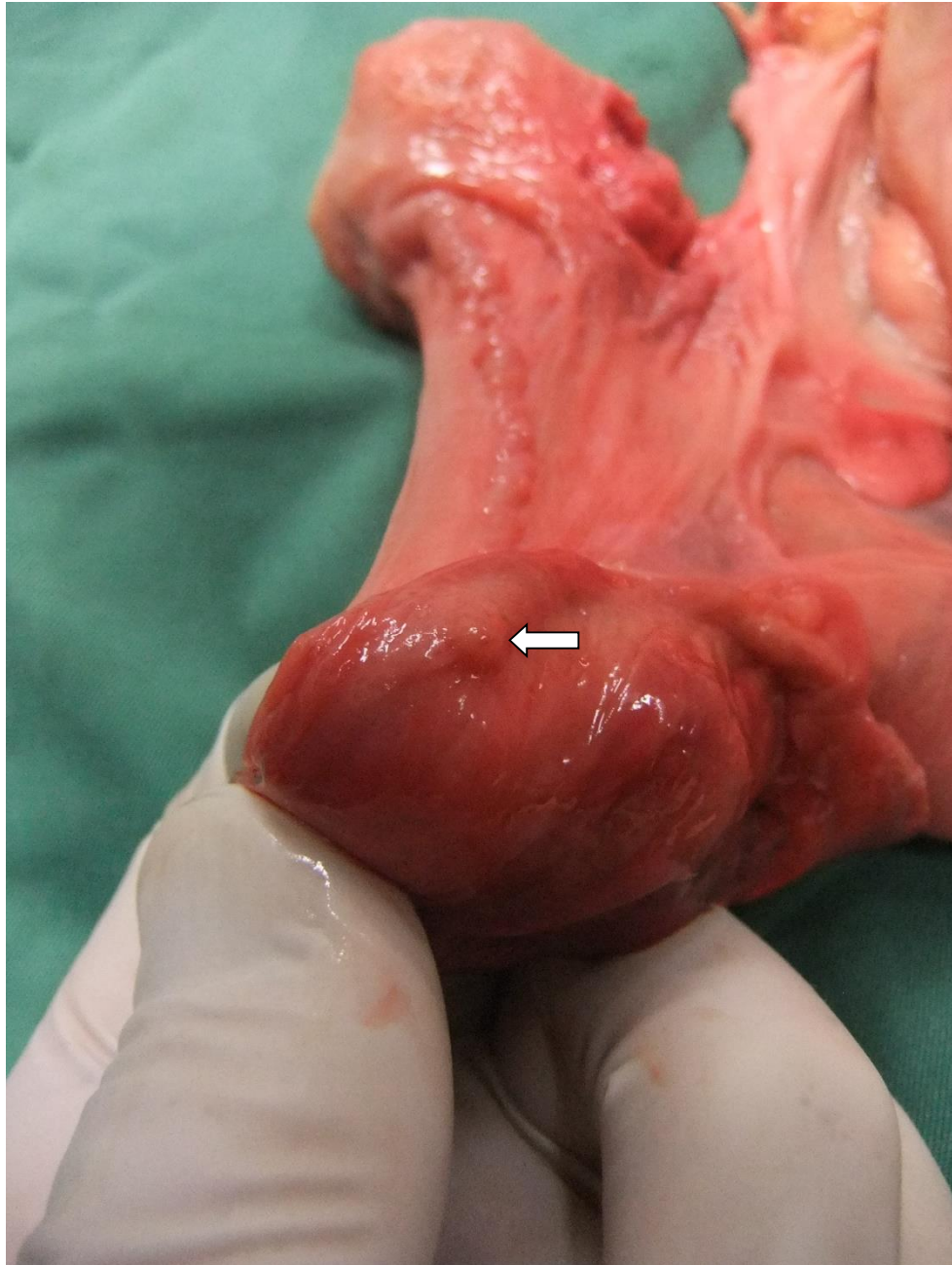




**Fig-1-9** 3歳馬の左卵管の解剖学的構造（腹側から撮影）

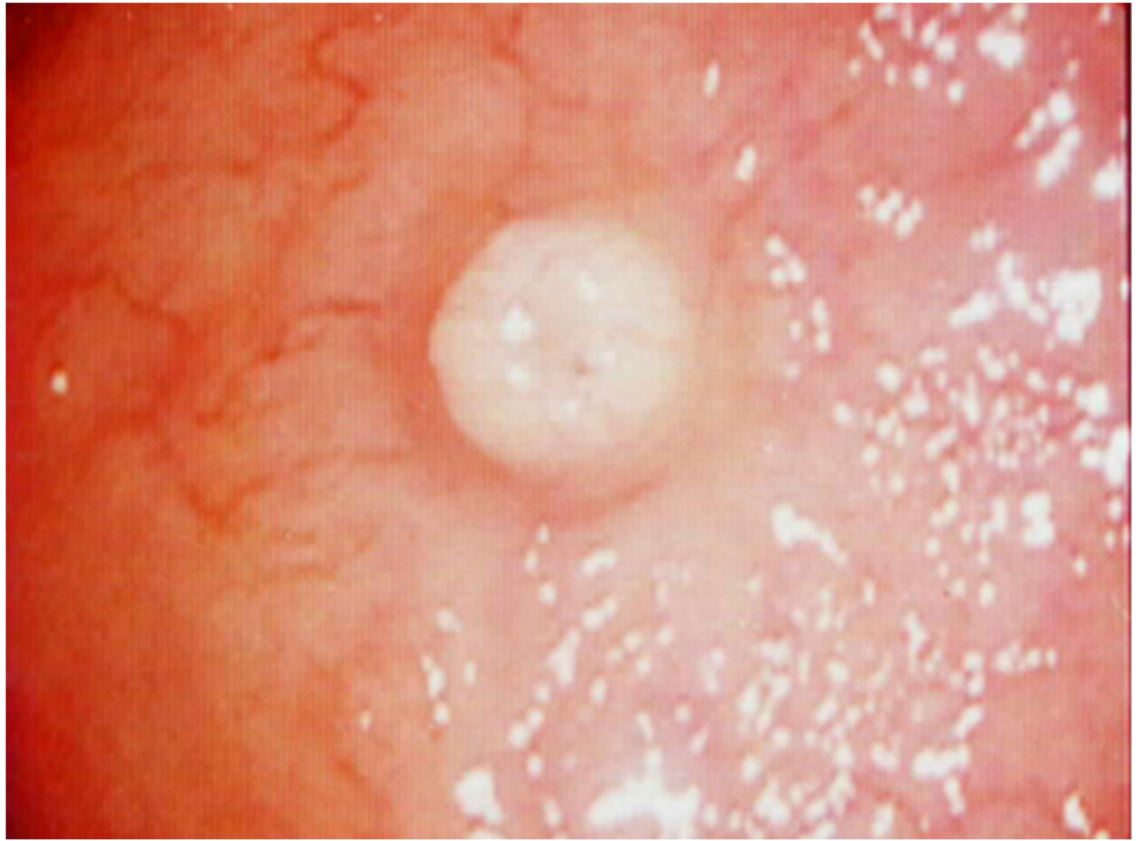
写真右の卵巣に接した卵管采から卵管膨大部となり，子宮広間膜辺縁に沿って蛇行しながら卵管峡部へと移行する。写真左の子宮各先端に卵管子宮口で接続している。





**Fig-1-10** 3歳馬の左卵管子宮口（矢印）

左子宮角を切開したのち卵管子宮口を露呈させて撮影。卵管子宮口では平滑筋が発達していて、その開口部は著しく狭い。



**Fig-1-11** 卵管子宮口（黄体期）のビデオエンドスコープによるクローズアップ画像

若干陥凹した開口部には平滑筋が発達していて閉鎖した状態であり，人と違い子宮内に造影剤等の液状物質を注入しても卵管内に流入することはない。

## 第 2 章 内視鏡下選択的卵管通水法による卵管疎 通の診断法の確立

## 2-1 背景と目的

馬では卵管子宮口が発達した平滑筋により開口部が絞扼されているという解剖学的特徴があるため、子宮内からの細菌の侵入はほとんど起こらないと考えられており、感染性卵管炎に起因する不妊症は人と比較して稀である。一方、馬の卵管膨大部・峡部接合部にゼラチン状の塊が多く割合で存在することが1970年代に報告されているが[43、44、45]、この細胞塊の多くは卵管の内径よりも著しく小さいため、精子の卵管内への進入や受精卵の子宮腔内への進入を妨げないことが示唆されている。しかし、Liu[48]は、細胞塊が卵管内腔全体を占有している症例があることを報告し、この卵管閉塞が不妊症の原因となる可能性がある」と結論付けた。

国内において人では、卵管の疎通性を診断する検査法として、子宮内に炭酸ガスを注入する描記式卵管通気法[86]、リピオドールと生理的食塩水の混合液[87]や気泡を混入させた生理食塩水[88]を用いた超音波卵管疎通性検査、子宮内もしくは子宮鏡観察下で卵管内に直接造影剤を注入する子宮卵管造影法[89、90]などが確立されてきた。これは子宮腔内から卵管にスムーズに移行する解剖学的な構造のため、子宮腔内に注入した液体や空気が経時的に卵管内に流入することを前提としている。一方、馬でも同様に子宮腔からの卵管へのアプローチが試みられたが、前述の卵管子宮口の解剖学的特徴のため、この方法では卵管の疎通性を診断することは困難であるとされていた[59、66、67]。

そのため、今日まで馬の卵管の疎通性を検査するために、卵管采側からアプローチし子宮腔内に疎通させる方法が試みられている。過去の報告では、まず澱粉顆粒やフェノスルホンフタレイン、または蛍光ミクロスフェアを卵巣の表面に直接または腹腔鏡観察下で噴霧して、子宮腔から回収する方法が報告された[68、69]。しかし、どちらの方法も侵襲的であると同時に技術的に困難であり、卵管の疎通性を確証するものではない。

次に、卵管閉塞の診断および治療方法として、全身麻酔下で開腹し目視化で[66]、もしくは立位のまま鎮静下で経膣的および臍部から腹腔鏡

を挿入し観察しながら[67]、卵管采からバルーンカテーテルを挿入し、卵管膨大部内で固定して卵管内に通水する方法が考案された。この両者の方法の欠点として、第一に直径が太い卵管膨大部から、より狭い卵管峡部もしくは平滑筋により閉じられている卵管子宮口に水圧をかけるため、卵管が細胞塊等により完全に閉塞しているケースでは、卵管を通水し細胞塊を取り除くことは不可能であると推察され、強すぎる水圧をかけると卵管が破裂する危険性があることが挙げられる[66]。また全身麻酔下で開腹して実施する場合は、麻酔に伴うリスクが発生し、そもそも開腹手術自体が侵襲的である。これに対し、全身麻酔のリスクを回避し立位腹腔鏡下で実施した場合でも、色素の溶液が逆流し腹腔内に流出することにより、一時的な腹膜炎を発症した症例が報告されている[67]。加えて、腹腔鏡手術の設備にはコストがかかり、開腹手術ほどではないが侵襲的であり、経験が必要とされる。

卵管子宮口から卵管采へ通水する方法は、一報のみ報告されている[74]。その研究では牝馬を全身麻酔下で開腹し、子宮角を露呈させたのち切開して、目視化で卵管子宮口にカテーテルを装着したとしている。この方法は開腹手術を要することに加え子宮を切開する必要があることから非常に侵襲的であり、また全身麻酔のリスクを伴うため、容易に実施できる方法ではない。

一方、ヒトの医療では卵管造影法により卵管の疎通性を確定できなかった症例に対し、診断と治療のために子宮鏡下選択的卵管通水法を実施している。これは外陰部から子宮頸管を通じて子宮内に内視鏡を挿入し、その観察下でカテーテルを卵管子宮口に装着し、色素または造影剤を卵管に直接注入する方法である[75、76、77、78]。Lei ら[75]は子宮卵管造影法により卵管性不妊症と診断された 50 症例に対し、卵管通水法による治療を試みたと報告している。方法として、子宮鏡観察下で卵管子宮口にプラスチックチューブを約 1 mm 挿入し、ハイドロコルチゾン 20 mg、ゲンタマイシン 160,000 単位およびプロカイン 80 mg を 20ml の蒸留水に溶解させた溶液を卵管内に直接注入した。その結果、20 症例で卵管の疎通性が改善され、うち 7 症例で後の妊娠が確認された。また、Miyazaki ら[77]は、卵管性不妊と診断した 106 症例に対し、軟性の子宮鏡を用いてその先端から 3 フレンチのテフロン性カテーテルを卵管子宮

口に挿入することにより卵管通水を実施したところ、58.5%において卵管通水が成功し、12.3%の症例で妊娠が確認されたとしている。

本研究では、馬における子宮鏡下選択的卵管通水法の可能性を検討することを目的とした。そのために、まず人用大腸ファイバースコープのワーキングチャンネルを通じて卵管子宮口に挿入することが可能なカテーテルを作成した。研究の具体的な目的として、そのカテーテルが実際に内視鏡観察下で卵管子宮口に挿入することが可能であるか検討した。またそのカテーテルを通じて色素を注入した場合、卵管を疎通し得るかどうかを処置後に直接卵管を剖検することにより、もしくは経膣的に挿入した内視鏡を用いて卵管周辺を観察することにより確認した。これに加えて、腹水を採取し色素による着色を確認することにより臨床的な卵管疎通試験が可能かどうか検証した。

## 2-2 材料および方法

### 供試馬

本研究は 2000 年から 2001 年において、4～22 歳のサラブレッド種の未経産馬 2 頭および経産馬 8 頭の空胎馬を用いて実施した

(Table 2-1)。これらはすべて前年度に正常分娩し、超音波診断や膣鏡検査等、一般的な生殖器検査を実施したスクリーニングで繁殖機能に異常が認められなかったものを用いた。本研究に際し、超音波診断装置により経直腸的に卵巣および子宮の状態を観察し性周期を判定したところ、10 頭中 3 頭は発情期、4 頭は黄体期、3 頭は発情休止期であった。

### 卵管通水法の手順

#### a. 卵管通水用カテーテルの作成

卵管通水カテーテルの作成には、外径 1.7mm、200cm のポリエチレン細管 (Hibiki® POLYETHYLENE TUBING size 5)、22G 4.45cm 留置針の外筒、ヒト血管造影用のガイドワイヤー

(TERUMO® RF-GA18263: 直径 0.46mm、長さ 220cm) を使用し

た (Fig. 2-1)。まず留置針の外筒をコネクター部との接合部で切断し、これをポリエチレン管に約 1 cm 挿入して接着剤で固定した (Fig. 2-2)。この中に、ガイドワイヤーをハンドル側より接合した留置針の外筒に向けて挿入した (Fig. 2-3)。通常、人の血管造影の際にはガイドワイヤーは、湾曲した柔軟性のある側の先端を回転させることにより、血管の分岐部で刺入する方向を選択して深部に押し進めていくが、本研究では卵管子宮口に挿入するにはその先端部は柔軟性が高すぎたため、硬度の高いもう一側のハンドルの側を留置針の外套に向けて装着した。このように作成した卵管通水用カテーテルは、術前にエチレンオキシサイトガスにより滅菌して使用した (Fig. 2-4)。

#### b. 供試馬の術前処置

供試馬は柵場保定し、塩酸キシラジン 350mg および酒石酸ブトルフアノール 5mg を混合して静注することにより鎮静し、必要に応じてこの鎮静剤を追加投与した。尾部をロープで上方に固定したのち、尾根部をバンデージで包交した。直腸より糞便を取り除いた状態で超音波診断装置 (ALOKA 社 SSD500) を用いて卵巣および子宮の状態を観察し、性周期のステージを判定した。その後、外陰部周辺を水洗したのちヨード剤および消毒用アルコールを用いて外科的に消毒した。次に滅菌手袋を装着し潤滑剤を塗布した後、外陰部より尿道カテーテルを挿入し膀胱内の尿を排出させた。

#### c. 内視鏡の子宮内挿入

今回実施した選択的卵管通水法は 3 人のオペレーターにより実施した (Fig. 2-5)。オペレーター 1 は内視鏡を牝馬の子宮内へ挿入し、オペレーター 2 は内視鏡のダイヤルを操作してカテーテルの方向を卵管子宮口へ合わせ、オペレーター 3 はカテーテルの内視鏡から突出させ卵管内に留置する役割を担った。オペレーター 1 は手指を外科的に消毒した後、滅菌した直腸検査用手袋およびその上に重ねて手術用手袋を片手に装着し、手指の先端に滅菌ゼリーを塗布した。その状態で事前に内視鏡消毒器 (Olympus® EW-10) により消毒した 160cm のヒト用大腸ビデオスコープ内視鏡 (Olympus® CF230L) を外陰部より

腔内に挿入した。このビデオスコープはビデオプロセッサ

(Olympus® CLV-U20) および光源 (Olympus® CV200) に接続して使用した。オペレーター1は、まず内視鏡の先端を人差し指および中指を用いて、子宮頸管を通過させたのち子宮腔内に導入した。オペレーター2はオペレーター1と協調して内視鏡のダイヤルを操作し、内視鏡の先端をろ過した空気で子宮を膨らませながら子宮体部を通過させ、子宮角分岐部に到達したのち左子宮角基部に誘導した。さらに左子宮角を膨張させながら注意深く内視鏡を子宮角先端まで誘導し、乳頭状に突出している卵管子宮口を観察した。内視鏡の先端部を卵管子宮口に接近させ、CCDカメラのクローズアップ画像により卵管子宮口の開口部の位置と向きを注意深く確認した (Fig. 2-6)。

#### d. 卵管子宮口へのカテーテルの挿入と卵管通水

選択的卵管通水のために作成したカテーテルを内視鏡のワーキングチャンネル内に挿入し、内視鏡先端から約 2 cm 突出させて卵管子宮口へ誘導した。その際に、予めカテーテル内に装着したガイドワイヤーを留置針外套の先端から 1~2 mm ほど突出させておき、卵管子宮口に挿入しやすいようにした (Fig. 2-7)。オペレーター1および2の注意深い内視鏡操作と共に、オペレーター3は卵管子宮口の開口している方向がカテーテルの突出する方向とほぼ一致している場合には、そのままの状態で卵管子宮口へのカテーテル挿入を試み、カテーテル先端が卵管子宮口内へ挿入されたのを確認した (Fig. 2-8)。両者の方向が一致しない場合には、カテーテル先端からガイドワイヤーを卵管子宮口に引っ掛けるようにした状態で、オペレーター1による内視鏡の操作によりカテーテルを湾曲させて挿入角度を卵管子宮口の向きと一致させるように調節した。卵管は卵管子宮口から卵管峡部に向けてすぐに蛇行しているため、カテーテル先端は約 2~3 mm 程度のみ挿入が可能であった。カテーテルの挿入が疑わしい場合には、内視鏡の操作によりカテーテルの方向を変えても挿入された先端の位置が卵管子宮口内から動かないことを確認した。次にガイドワイヤーをカテーテルの先端が卵管子宮口から外れないように注意深く抜去した後に (Fig. 2-9)、逆端に刺入しておいた 20G 注射針にシリンジを装着



し、インジゴカルミン溶液® (4 mg/ml) 5ml を約 1 分程度かけてゆっくりと卵管内に注入した (Fig. 2-10)。一方の卵管への色素注入が完了した後、一時的に内視鏡を子宮体部まで牽引し、使用したカテーテルをワーキングチャンネルより抜去した。滅菌したもう一つの卵管通水用カテーテルを新たにワーキングチャンネルに挿入し、内視鏡を右子宮角先端まで誘導したのち、右卵管に対し左卵管と同じ処置を実施した。卵管子宮口へのカテーテル挿入が不可能であった場合には、インジゴカルミン溶液® 5ml を卵管子宮口に噴きかけ、のちに卵管子宮口への挿入が成功した群と結果を比較した。

### 腹水の採取

全ての供試馬において、処置の 30 分前および 30 分後に超音波ガイド下で腹水採取を試みた。腹水採取に先立って超音波診断装置により腹水が貯留している部位を判定したが、多くの場合は胸骨剣状突起より約 10 cm 尾側の腹部正中線上であった。この周辺部位を剃毛し、外科的に消毒した後、刺入部位に塩酸リドカイン 3 ml を皮下に浸潤させた。腹水採取には 16G 留置針を用い、腸管を損傷することないように慎重に腹腔内に刺入し、腹水を約 3ml 以上採取するよう試みた。2 頭では腹水採取が困難であったが、この場合には刺入した留置針を通じて乳酸化リンゲル液 1 L を腹腔内注入した後、15 分後に再度腹水採取を試みた。採取した腹水は、1,000 g で 10 分間遠心分離し、まず肉眼的に色調を観察した。今回の研究で使用したインジゴカルミン溶液の色調の吸光度は、波長が 612nm において最大値を示した[18,19,20]ため、処置の前後に腹水採取が可能であった例では、採取された腹水の色調を客観的に評価する目的で、吸光光度計を用いて波長が 500、550、600、650、および 700nm における吸光度をそれぞれ測定し、処置前後の腹水の値を比較した。

### 処置後の卵管の観察

すべての供試馬において、処置後に腹水採取を実施した後、卵管子

宮口より注入したインジゴカルミン溶液の卵管内での残留を内視鏡を用いて直接的に確認した。まず供試馬を再度塩酸キシラジン 350mg および酒石酸ブトルファノール 5mg を混合して静注することにより鎮静したのち、尾椎間硬膜外麻酔を実施した。尾椎間硬膜外麻酔の部位は、第 1-2 尾椎間とし、その周辺を剃毛し外科的に消毒した後、20G 70mm カテラン針を正中線上で第 1-2 尾椎棘突起のちょうど中間のポイントにおいて約 45 度の角度で注意深く刺入した。麻酔薬には塩酸キシラジン 10mg を生理食塩水と混合し全量 10ml とした希釈液を用いた。カテラン針に少量の麻酔薬を一滴垂らし、それが脊髓腔内の陰圧により吸引されることを観察することにより、針先が硬膜外に到達したことを確認したのち、約 2 分程度時間をかけてゆっくりと硬膜外腔に注入した。注入完了後、麻酔薬が脊髓腔内を頭側に流れることによる後駆麻痺を避けるため、尾部を下方に約 15 分固定した後、陰唇を鑷子で挟むなどの痛覚刺激を加えることにより麻酔の効果を判定した。痛覚の消失を確認してから、膣鏡を膣内に挿入した状態で、膣底を外子宮口より約 5 cm 尾側で 7 時方向の部位において、膣粘膜を約 7 cm 切開した。腹腔内の腸管を損傷しないように切開部位を鈍性に剥離しながら腹腔内まで切開し、その部位より手指を外科的に消毒したオペレーターが卵管通水で使用したものとは別の消毒したビデオスコープ（Olympus® PCF200）を腹腔内に挿入し、手動的にスコープを誘導することにより卵管および卵巢周辺を観察した。色素の卵管通過を判定した後、切開部位よりアンピシリンナトリウム 6 g を腹腔内に注入し、No.0 PDS®を用いて創面を単結紮により縫合した。

## 2-3 結果

### 卵管子宮口へのカテーテル挿入の成功率

処置を実施した 10 頭中 7 頭において、両側の卵管子宮口におけるカテーテルの挿入が成功した。残り 3 頭中 1 頭（Mare J）では右側のみ

に可能であったが、この馬の場合には発情期に処置を実施したため、内視鏡から供給される空気が弛緩した子宮頸管から漏出し、左卵管子宮口に挿入する際に視野を十分に確保できなかったことが原因であった。他の 2 頭（Mare C および F）では子宮の過度の膨満により、両側の卵管子宮口の向きが内視鏡先端部の最大限の操作にもかかわらず視野の中心から大きくはずれたため、カテーテルの挿入が不可能であった。したがって、全体で卵管子宮口へのカテーテル挿入は 10 頭 20 卵管中 15 卵管において可能であった。

#### 内視鏡による卵管の色素疎通の直接的な確認

卵管子宮口へのカテーテル挿入が可能であった 15 卵管全ての症例において、膣壁の切開部位から腹腔内へ挿入した内視鏡により、卵管膨大部、卵管采、卵巣およびその周辺組織にインジゴカルミン液の青い色素が観察された（Fig. 2-11）。一方、卵管峡部での色素疎通の判定は困難であった（Fig. 2-12）。これに対し、カテーテル挿入が不可能であり、卵管子宮口へ色素を噴きかけた 5 卵管では、内視鏡の直接的な観察下で色素の疎通は確認されなかった（Fig. 2-13）。

#### 腹水着色の確認

処置後の腹水は 6 頭（Mare A、C、F、G、H および I）で 3ml 以上、1 頭（Mare J）より数滴採取され、残り 3 頭（Mare B、D および E）では採取が困難であった。この 3 頭のうち Mare D および E では乳酸化リンゲル液 1 L を腹腔内に灌流した後に、再度腹水採取を試みたところ、Mare D では約 2ml 採取され、Mare E では不可能であった。Mare B においては乳酸化リンゲル液の灌流は実施しなかった。

腹水採取が可能であった計 8 頭（Mare A、C、D、F、G、H、I および J）中、両側の卵管へのインジゴカルミン液の注入が成功した 3 頭（Mare A、D および G）に加え、右側の卵管のみ注入が成功した Mare J の計 4 頭において肉眼的に腹水の染色が確認され（Fig. 2-14）、吸光光度の測定においても 600nm 前後で明瞭なピークが示された（Fig. 2-15）。Mare H および I では色素の肉眼的な識別は困難であり、吸光光度では Mare H で僅かなピークが示され、Mare I では明瞭

なピークは観察されなかった。両側の卵管子宮口にインジゴカルミン液を噴きかけた 2 頭 (Mare C および F) では腹水の着色は肉眼的に確認されず、吸光光度の測定は実施しなかった。

## 2-4 考察

今回の研究では、供試馬 10 頭 20 卵管中 15 卵管で内視鏡を用いて卵管子宮口にカテーテルを留置することに成功したが、この方法は卵管の疎通性を研究するうえで斬新な方法であるといえる。過去の報告[59, 66, 67]では、内視鏡を用いて子宮側から卵管へカテーテルを留置することは困難であるとされてきた。これは馬の卵管子宮口が発達した平滑筋により極端に狭いことと、卵管子宮口へカテーテルを挿入するための内視鏡の操作には熟練した操作技術が必要であることに起因している。しかし今回の研究では、まずカテーテルの先端に 22G 留置針の外套を用いると同時にガイドワイヤーを併用することにより、比較的高い確率で卵管子宮口へのカテーテル挿入が可能であった。内視鏡観察下においてカテーテル挿入が困難であると考えられている大きな要因の一つとして、著者の経験から多くの症例では、卵管子宮口への挿入時にその開口部と内視鏡の角度を合わせることの難易度が高いことが挙げられる。子宮内に内視鏡を挿入する際には、内視鏡先端からろ過した空気を噴出して子宮を膨満させることにより視野を確保するが、今回使用した人用大腸ビデオスコープは硬性鏡とは異なり、それ自体が柔軟であり常に子宮内膜に沿わせるように子宮角先端まで誘導し、内視鏡の先端部約 10 cm の操作によりカテーテルの挿入角度を調節し得る。未経産馬もしくは経産馬でも黄体期の場合には、子宮角の内径が狭く子宮内膜に沿った内視鏡の先端部の角度を卵管子宮口に合わせることは比較的容易であるが、子宮が過度に膨満した場合には、内

視鏡の角度が可動域外となるので卵管子宮口へのカテーテル挿入が不可能となる (Fig. 2-16)。これに対し内視鏡を子宮角先端に向けて押し進める際に、最小限の空気で視野を確保することにより卵管子宮口のほぼ正面に到達できる場合が多い (Fig. 2-17)。したがってカテーテル挿入の成功率を向上させるためには、内視鏡をできるだけ少量の空気で子宮を膨らませて子宮角先端まで誘導するべきであると考え。

本研究では 2 頭において発情期に処置を実施したが、子宮頸管から空気が漏出し内視鏡の視野が確保できなかったため、その 2 頭中 3 卵管でカテーテル挿入が不可能であった。この結果から、本研究における手技は子宮頸管が過度に弛緩していない黄体期または発情休止期に実施するべきであると考え。

今回はインジゴカルミン液が卵管を疎通したことを直接的に確認するために、大腸ファイバースコープを腹腔内に挿入したが、近年腹腔鏡による診断技術が馬でも取り入れられている[66、67、70]。使用可能であれば無菌的な操作が可能である点から腹腔鏡を用いたほうがより理想的であるといえるが、機材が高価であることや熟練した手技が必要とされることなどのデメリットもある。

卵管子宮口にカテーテル挿入が可能であった全例において、内視鏡による直接的な観察でインジゴカルミン液の卵管疎通が確認されたことから、卵管疎通が重度に阻害されていない症例では、液状物は卵管を通過し、卵巢の周囲組織まで到達することが判明した。

今回の報告で用いた技法は、卵管の疎通性を妨げる細胞塊の有無を診断するために用いることができる可能性がある。完全に卵管腔が閉塞していない場合には、液状物が細胞塊を迂回して腹腔内に漏出することも推察されるが、卵管の疎通性がどの程度障害された場合に精子または卵子の卵管内通過に影響があるかは不明である。将来的には、受胎性の高い牝馬および低受胎性の牝馬両者にて、液状物の卵管疎通性と細胞塊の大きさ、および受胎能との関係が調査されることを期待する。

過去に報告された研究のほとんどでは[66, 67, 68, 69, 74, 83]、卵管通水は卵管采から卵管子宮口の方へ実施されてきた。しかし、そのような方法を用いた場合、卵管峡部の直径は卵管膨大部と比べ著しく

小さいため、細胞塊が比較的大きな場合には卵管内の細胞塊を取り除くことはより困難であると考えられる。一方、今回実施した方法では、卵管峡部から膨大部を経て卵管采側に向けて通水を行うので、細胞塊はより取り除きやすく、卵管疎通障害の治療方法としてより有効であると推察される。

今回の症例のすべてにおいて、卵管通水を試みた際にインジゴカルミン液の子宮腔内への逆流が観察された。この現象の主な原因は、カテーテル挿入方向の調整が不十分で先端開口部が卵管子宮口の内壁に接触していることや、子宮腔を膨満させることにより卵管峡部が卵管子宮口に近い尾側部位である程度屈曲することなどに起因していると推察される。いずれの原因にせよ、今回卵管子宮口にカテーテルが挿入された全ての症例において、通水した色素は卵管を疎通していたが、今回の方法を細胞塊による卵管閉塞の治療法として用いる場合、卵管内に存在するすべての細胞塊を除去できるだけの十分な水圧がかけられるか定かではない。今後の研究により確証していく必要があると考える。

近年、腹腔鏡観察下で色素または蛍光性ビーズを用いて卵管の疎通性を研究されてきた。Köllmann ら[67] は卵管采から卵管膨大部にアプローチしてカテーテルを留置し、滅菌したメチレンブルー溶液を 11 例中 7 例で疎通させ、そのうち 5 例では術後に内視鏡で子宮内に色素を確認したと報告している。また同様に、Arnold ら[83] は 16 頭の黄体期の牝馬において、腹腔鏡観察下で卵管采より卵管膨大部にカテーテルを留置し、色調の異なる蛍光性ビーズを左右それぞれの卵管に疎通させることを試みた。結果として、32 卵管中 31 卵管でビーズの注入に成功し、16 頭中 6 頭において 24 および 48 時間後に実施した子宮洗浄の灌流液中にビーズの発色が確認された。また供試馬の剖検後、15 卵管でビーズの疎通を阻害する細胞塊による卵管の閉塞が確認されたと報告している。しかし、供試馬の繁殖履歴は報告されておらず、実際にそれらの細胞塊が卵管の正常な機能を阻害していたかは不明である。これら 2 つの研究に対し、今回の研究では卵管子宮口にカテーテル挿入が可能であり色素通水を試みることができた 15 卵管全てにおいて、膣壁から挿入した内視鏡により直接的に色素が卵管疎通してい

たことを確認できたことは意義深い。卵管自体の壁は比較的厚く、卵管峡部は卵管膨大部と比較して極端に狭い。このため、卵管に色素を通水し、腹腔内に挿入した腹腔鏡もしくは内視鏡で観察した場合、卵管膨大部では色素の残留が判定できるが、卵管峡部ではそれを確認することは困難である。腹腔鏡を用いて卵管膨大部にカテーテルを挿入した場合でも、色素注入後に卵管峡部を観察したとしても、卵管峡部を色素が通過したかどうか腹腔鏡観察下で判定することは困難であったと推察する。今回の研究では、卵管峡部での色素の疎通を判定することは困難であったが、その遠位に位置する卵管膨大部、卵管采および卵巣周辺組織での色素着色が確認されたことから、色素は卵管を疎通したと判定することができた。このことは卵管子宮口から色素通水を実施することが、逆方向のアプローチと比較して卵管疎通を直接的に判定するという点において、より優れた方法であると考ええる。

今回の研究において、供試馬 10 頭中 3 頭より腹水を採取することが不可能であり、このうち 2 頭では乳酸化リンゲル液 1 L を腹腔内に灌流し再度腹水採取を試みた。結果として 1 頭では腹水の採取に成功し、もう 1 頭では不可能であったことから、腹水の量が少ない場合、乳酸化リンゲル液等で腹腔内を灌流することにより、卵管の色素疎通を確認するための腹水採取が可能になりえると考ええる。しかし、灌流液の量が少ないと腹水採取が困難となり、逆に多すぎると卵管疎通した色素の濃度が薄まり判定が困難となる。今回の研究では、卵管への色素通水の処置後に腹水の量が少なかった場合、色素の疎通を確認する目的でどれくらいの量の乳酸化リンゲル液を腹腔内に灌流するべきか明確にはできなかった。また、卵管疎通に成功した 8 頭中 4 頭では、腹水の色素による着色が肉眼的または吸光光度測定により確認されなかった。これらの場合、注入時の卵管子宮口での逆流により腹腔内に漏出した色素の量が少なかったことに起因していると考ええる。このことに加え、処置の前後に腹水が数滴しか採取できなかった 1 頭では、吸光光度が処置後より処置前の方が高い値を示したことから、少量の腹水では吸光光度測定により色素の疎通を判断するのは困難であると考えられる。今後の課題として、卵管に疎通させるインジゴカルミン液の量、腹水が採取されない場合に灌流する乳酸化リンゲル液の

量、さらに卵管の色素疎通から腹水採取までの時間等について研究されるべきである。

本研究では、左右両卵管に同じ色素の疎通を試みたため、腹水中に確認された色素がどちらの卵管の疎通を示すのか判別できなかった。左右の卵管の疎通性を区分して判別するためには、異なった吸光光度を有する 2 種類の色素を同時に使用する、もしくは一方の卵管に通水した色素が一度完全に腹腔内で吸収されるのを待ってから他方の卵管に対し再度色素通水を実施するべきである。将来的に卵管を疎通した色素と腹水の着色の関連がより正確に把握することができれば、今回用いた方法は卵管疎通を判定するうえで、侵襲性が最低限である臨床的な診断方法の選択肢の一つになり得ると考える。



## 2-5 図表

mare	年齢	性周期	卵管子宮口へのカテーテル挿入		内視鏡下での色素通過の確認		腹水染色の確認		
			左	右	左	右	腹水採取	肉眼的	分光光度計
A	4	発情休止期	○	○	○	○	○	○	○
B	12	発情休止期	○	○	○	○	×	-	-
C	16	発情期	×	×	×	×	○	×	-
D	5	発情期	○	○	○	○	○	○	○
E	10	黄体期	○	○	○	○	×	-	-
F	17	黄体期	×	×	×	×	○	×	-
G	8	黄体期	○	○	○	○	○	○	○
H	13	黄体期	○	○	○	○	○	×	○
I	12	発情休止期	○	○	○	○	○	×	×
J	22	発情期	×	○	×	○	○	○	○

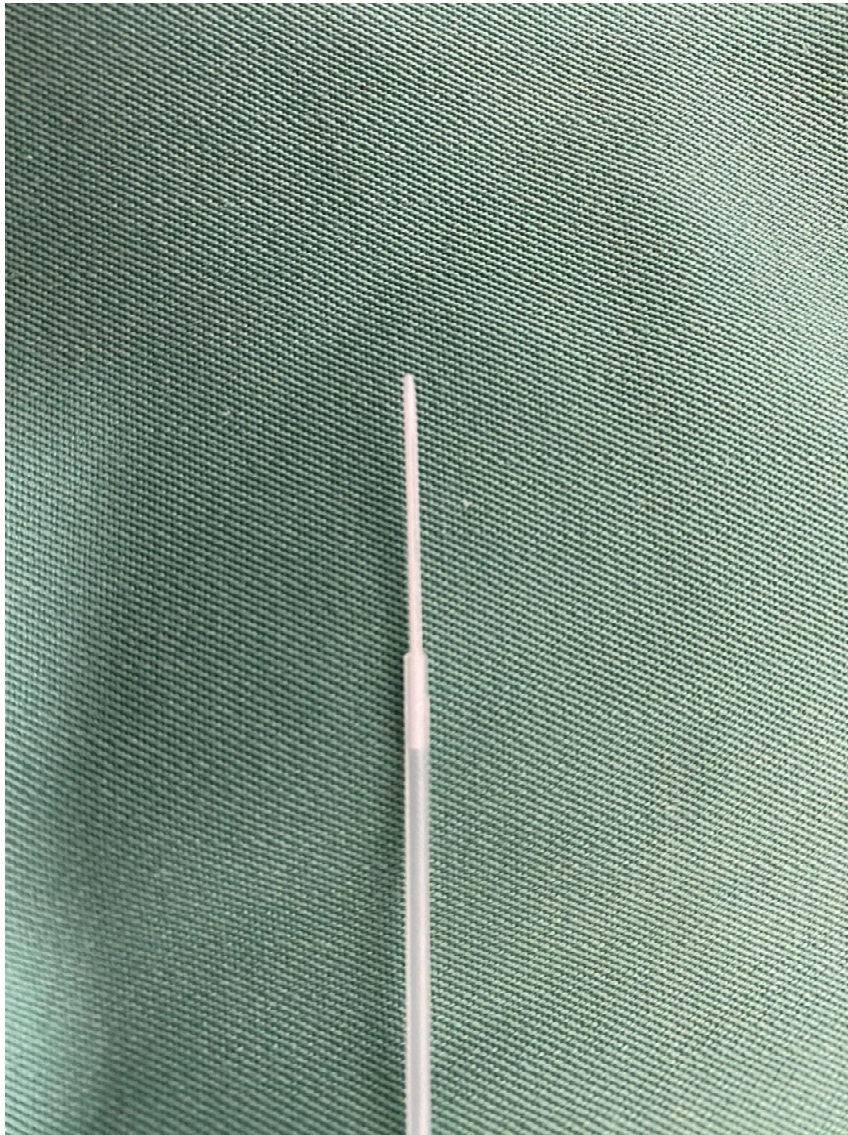
Table 2-1

今回の研究で供用した実験馬 10 頭の年齢と性周期、および卵管子宮口へのカテーテル挿入の可否と色素の卵管疎通の確認。



Fig. 2-1

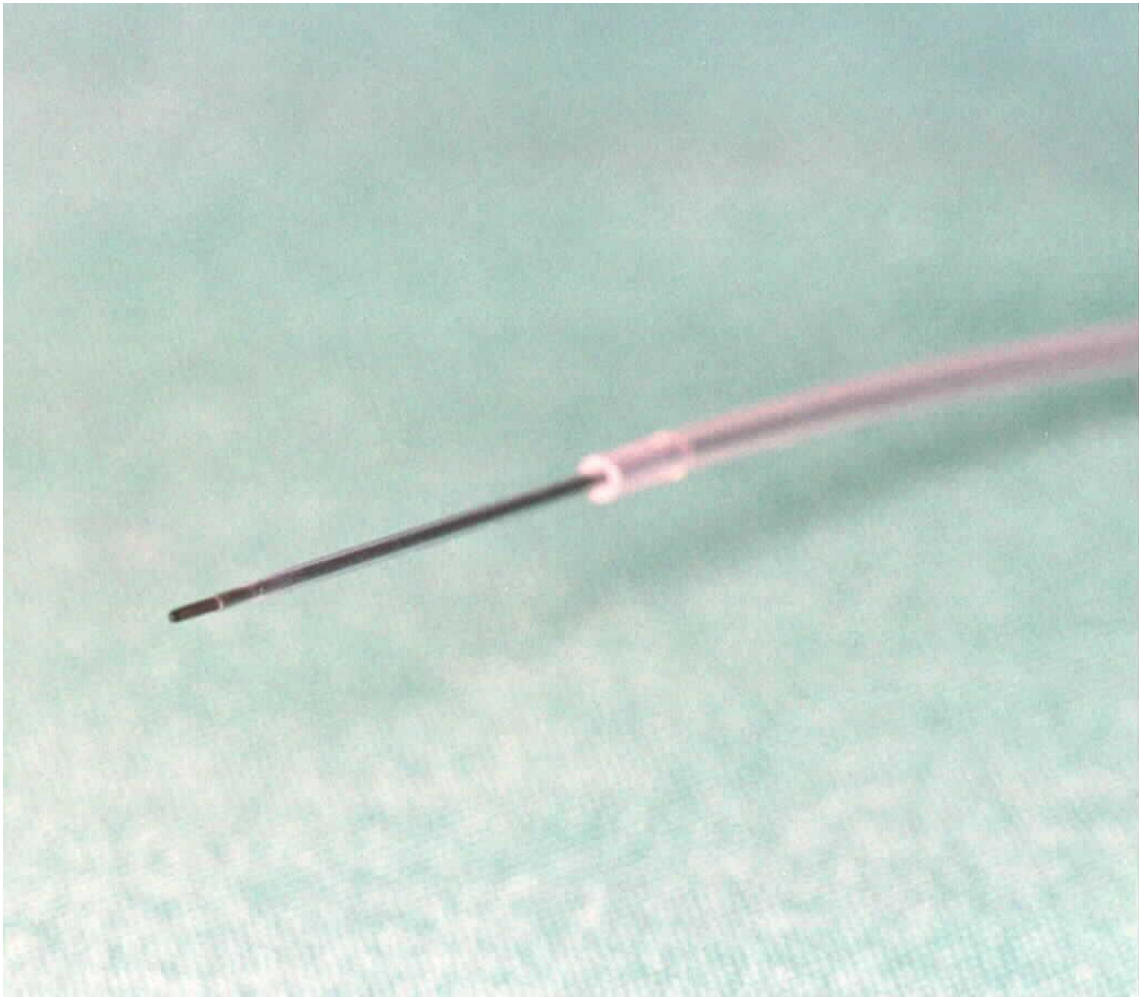
本研究で卵管通水用に使用したカテーテル作成のための機材。外径 1.7mm、200cm のポリエチレン細管（Hibiki® POLYETHYLENE TUBING size 5）、22G 4.45cm 留置針（TERUMO サーフロフラッシュ 22G）、ヒト血管造影用のガイドワイヤー（TERUMO® RF-GA18263: 直径 0.46mm、長さ 220cm）。インジゴカルミン色素の注入には 10ml もしくは 5ml シリンジに 20G 1.5 インチの注射針を接続して用いた。



**Fig. 2-2**

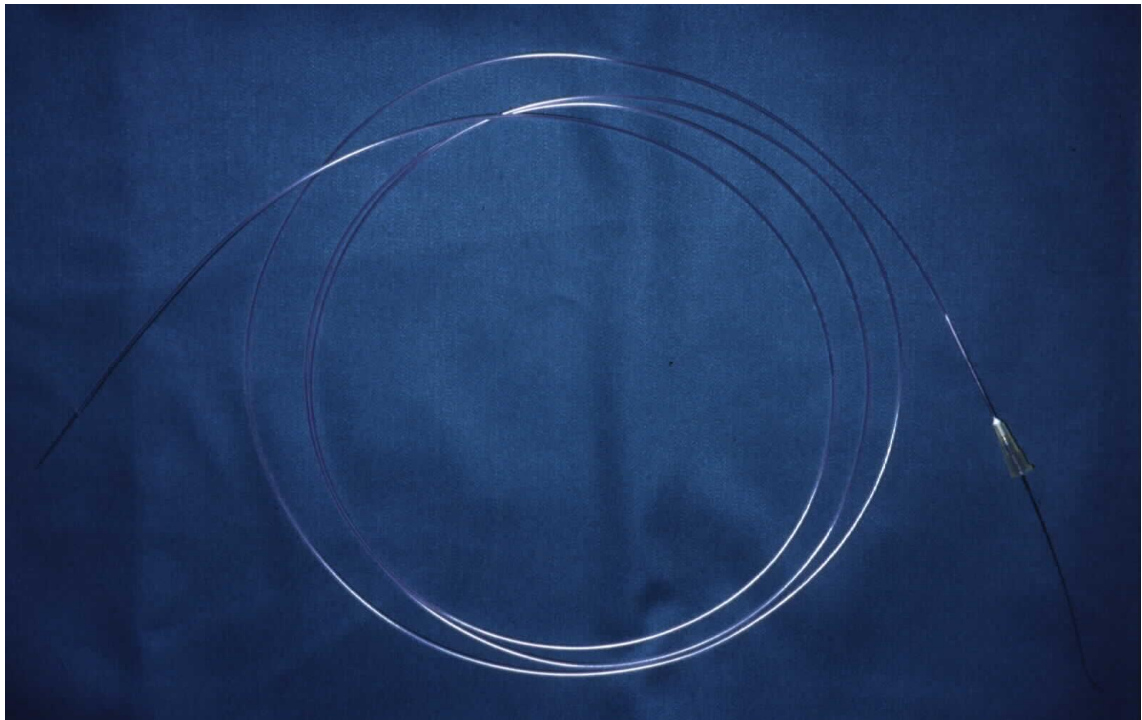
卵管通水のために作成したカテーテル。まず、ポリエチレン細管を長さ 200 cm で切断した。22G 留置針の外套はシリンジとのコネクター部で切断し、その部位をポリエチレン細管の一端に約 1 cm 挿入して接着剤を用いて固定した。





**Fig. 2-3**

卵管通水用カテーテル先端部の拡大写真。カテーテルを卵管子宮港に挿入する際に硬度を保つため、人の血管造影用ガイドワイヤーを装着した。通常血管造影に使用する際には屈曲した柔軟性のある側の先端を用いて誘導していくが、馬の卵管子宮口に挿入するためには、より硬度の高いハンドル側を留置針の外套に向けて装着した。



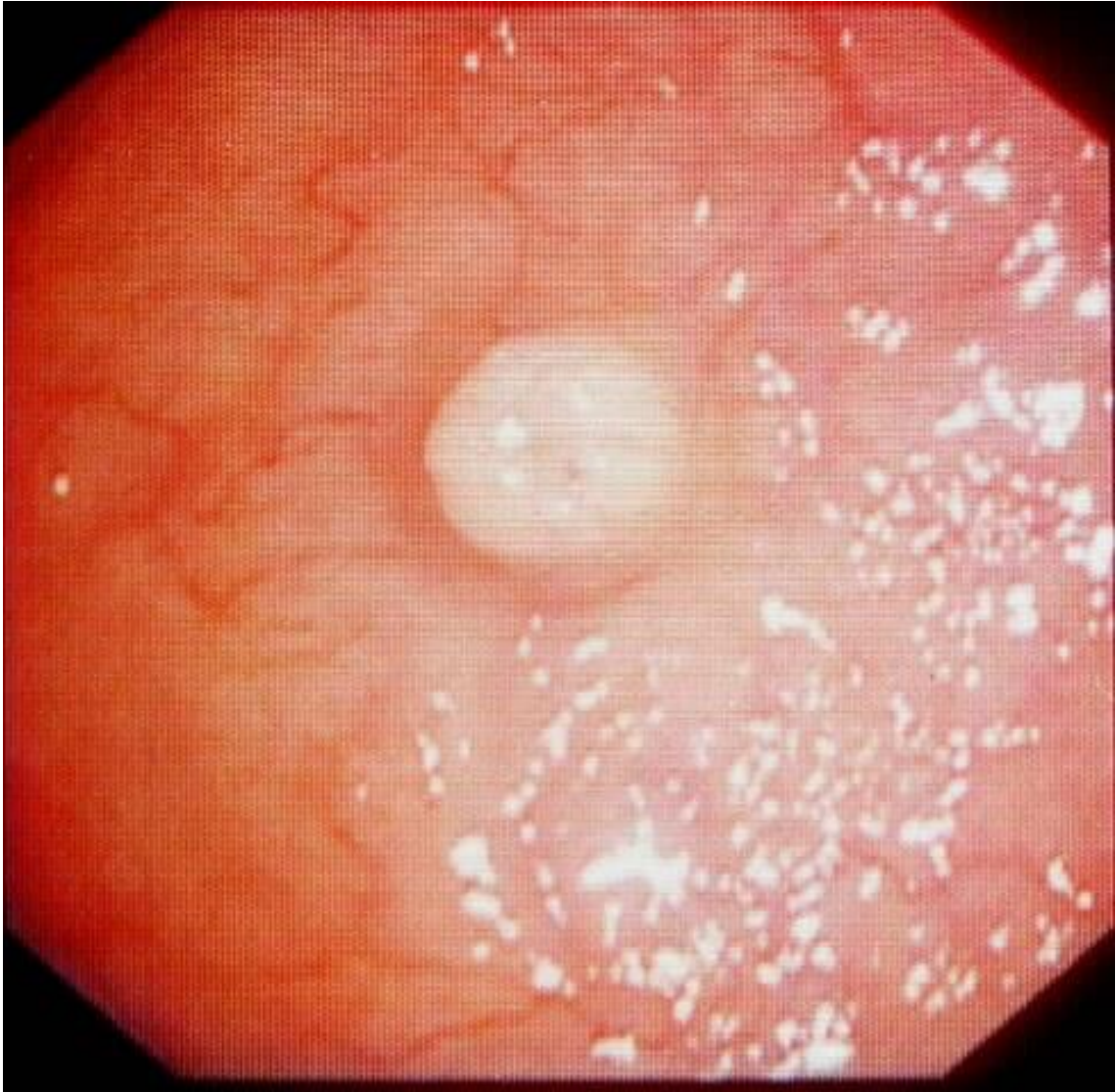
**Fig. 2-4**

卵管通水のために作成したカテーテルの全体像。卵管通水処置を実施する前にエチレンオキサイトガスを用いて滅菌した。



Fig. 2-5

選択的卵管通水法の3人のオペレーターによる実施風景。オペレーター1は外陰部より内視鏡を挿入し、オペレーター2は内視鏡の操作ダイヤルにより内視鏡先端の進行方向および卵管子宮口への角度を調節した。オペレーター3は卵管通水用カテーテルの操作を担当した。



**Fig. 2-6**

卵管子宮口（黄体期）のクローズアップ画像。内視鏡が子宮角先端に達した後に、卵管子宮口に接近させてその開口部と向きを注意深く観察した。





Fig. 2-7

カテーテルを卵管子宮口に挿入する直前の内視鏡画像（黄体期）。内視鏡先端からあらかじめ装着したカテーテルを数cm突出させ、その中のガイドワイヤーを数ミリ出した状態にしておいた。





Fig. 2-8

カテーテル挿入時の内視鏡画像（黄体期）。内視鏡を注意深く操作し、ガイドワイヤーを先行させカテーテルを卵管子宮口へ数ミリ挿入した。

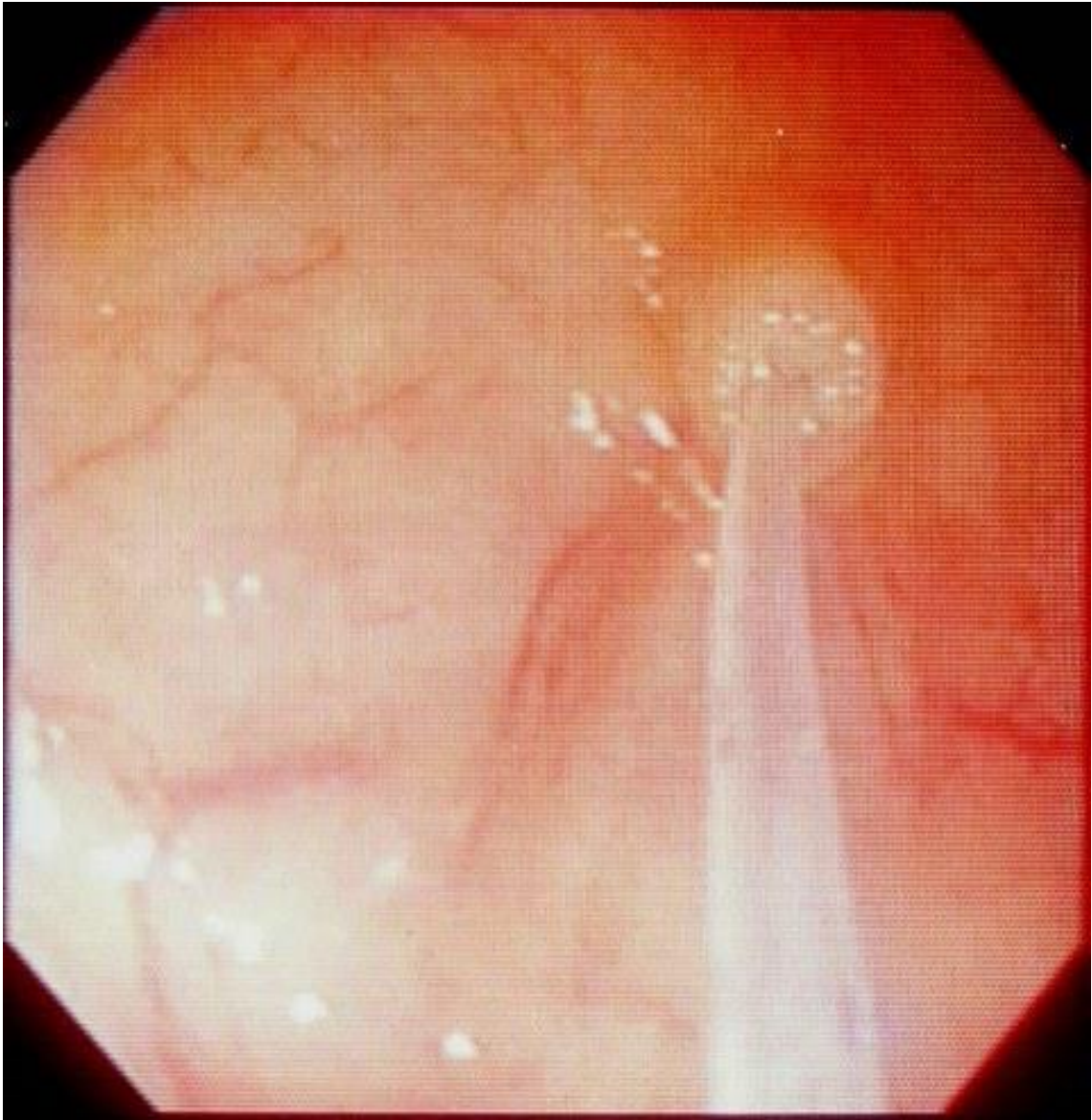


Fig. 2-9

カテーテル抜去後の内視鏡画像（黄体期）。カテーテルの外筒を極力動かさないようにガイドワイヤーを抜去した。





**Fig. 2-10**

卵管内へのインジゴカルミン液注入時の内視鏡画像。カテーテルの逆端よりインジゴカルミン溶液を約1分かけてゆっくりと卵管内へ注入した。

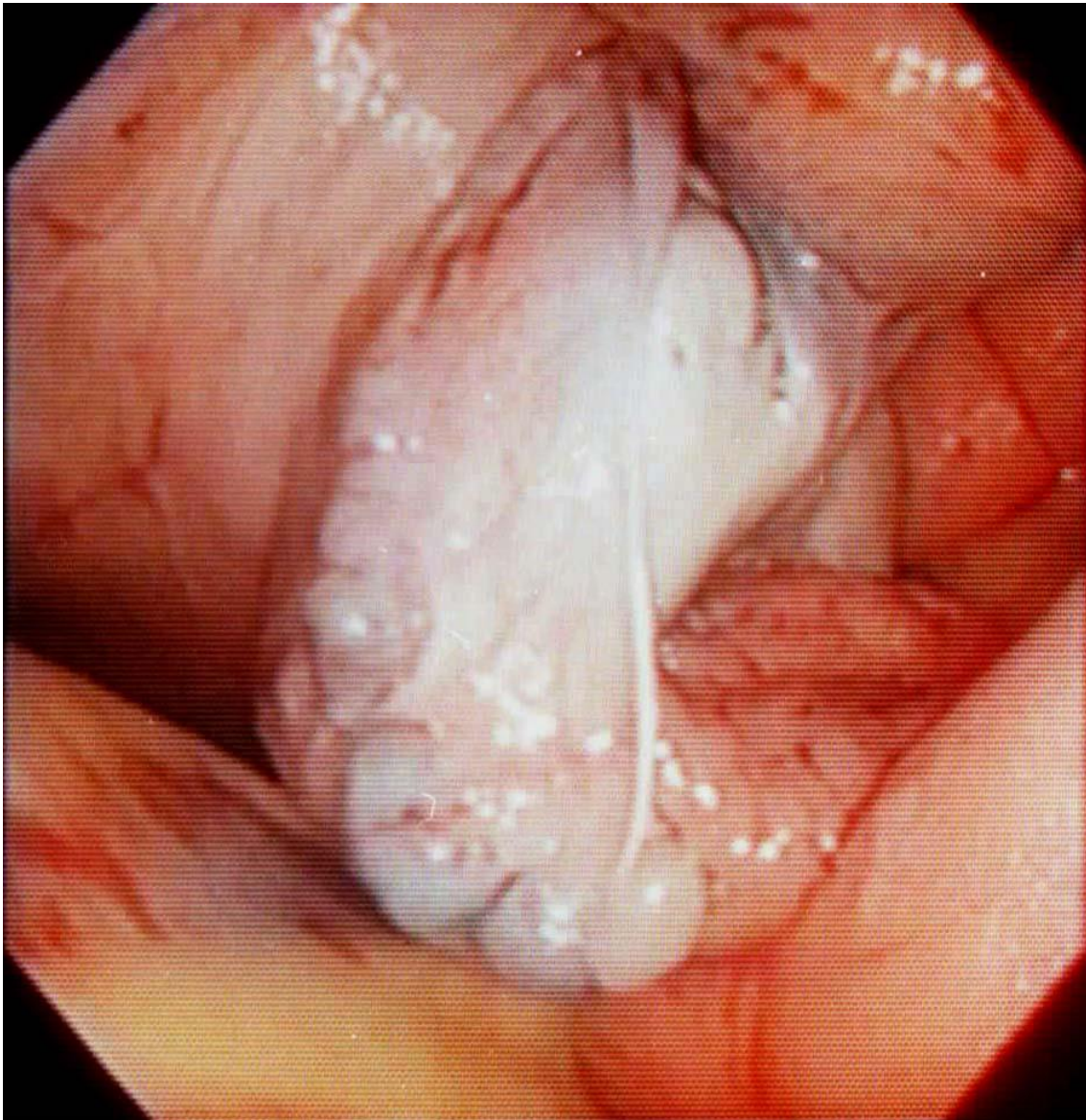


Fig. 2-11

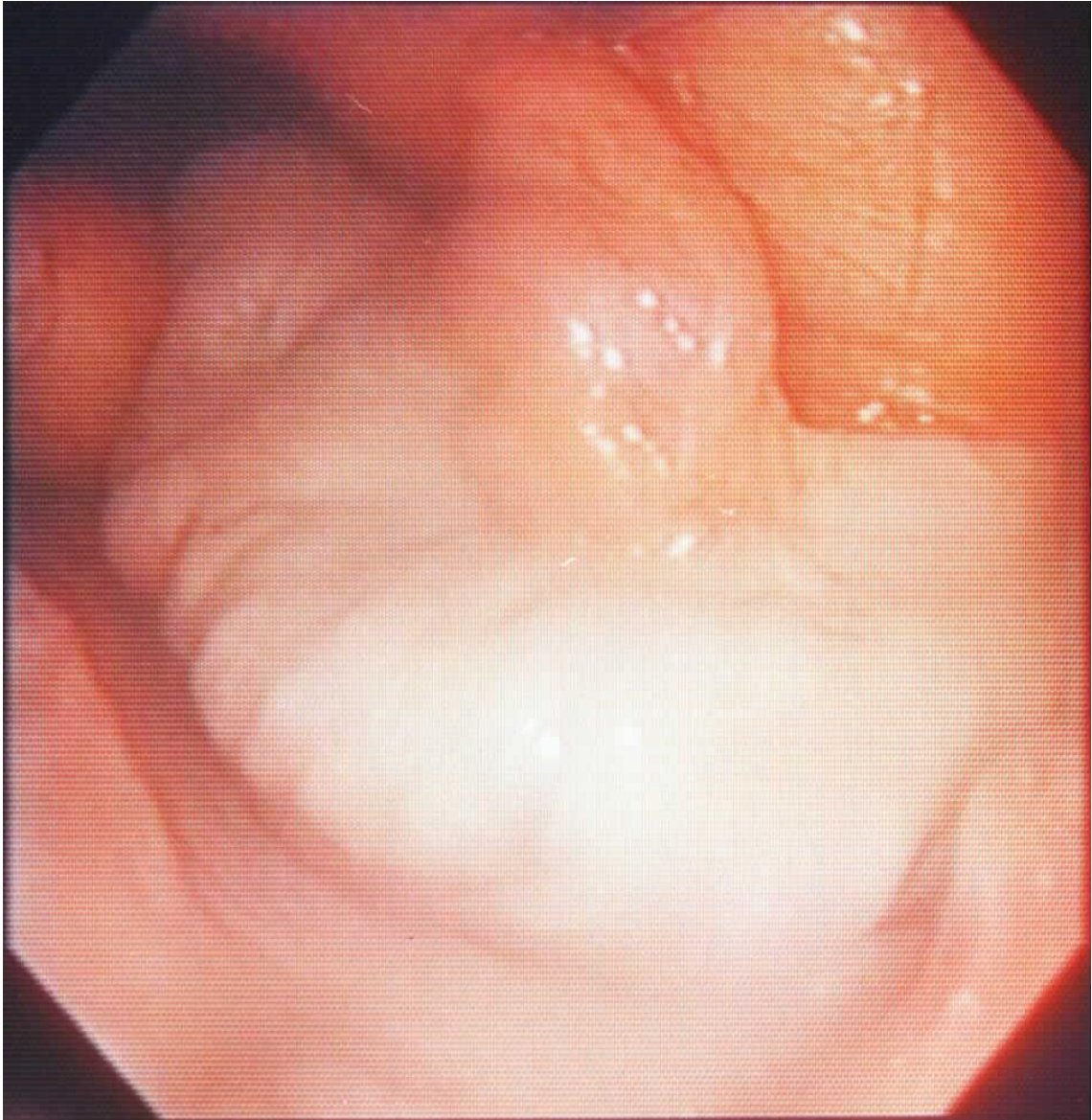
卵管への色素注入処置を実施した後の左卵管膨大部の内視鏡画像。卵管膨大部では卵管壁を通じてインジゴカルミンの紺色の色調が確認される。





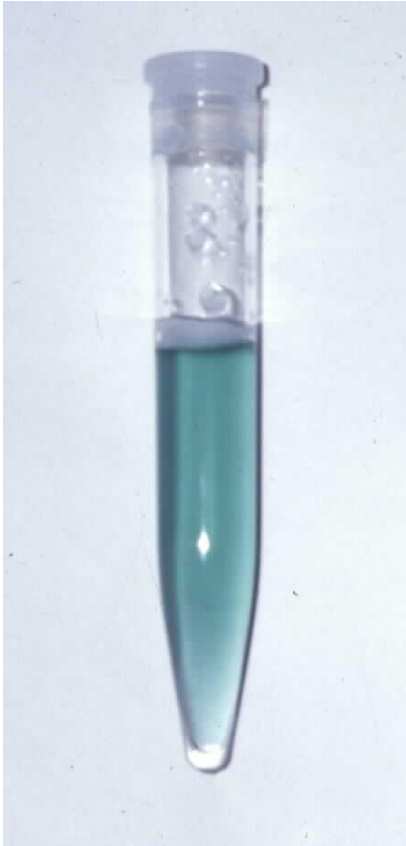
Fig. 2-12

卵管への色素注入処置を実施した後の左卵管狭部の内視鏡画像。卵管膨大部と比較すると管腔が狭いため外部色素の色調が反映されず、疎通が確認できない。



**Fig. 2-13**

卵管へのカテーテル挿入が不可能であり、卵管子宮口へインジゴカルミン溶液を噴きかけた症例の左卵管膨大部の内視鏡画像 (Mare C)。Fig. 2-9 と比較すると乳白色であり、インジゴカルミン色素に着色していない。



**Fig. 2-14**

インジゴカルミン溶液の卵管内通水処置を実施した 30 分後に採取した腹水 (Mare A)。紺色のインジゴカルミン色素による着色が確認できる。

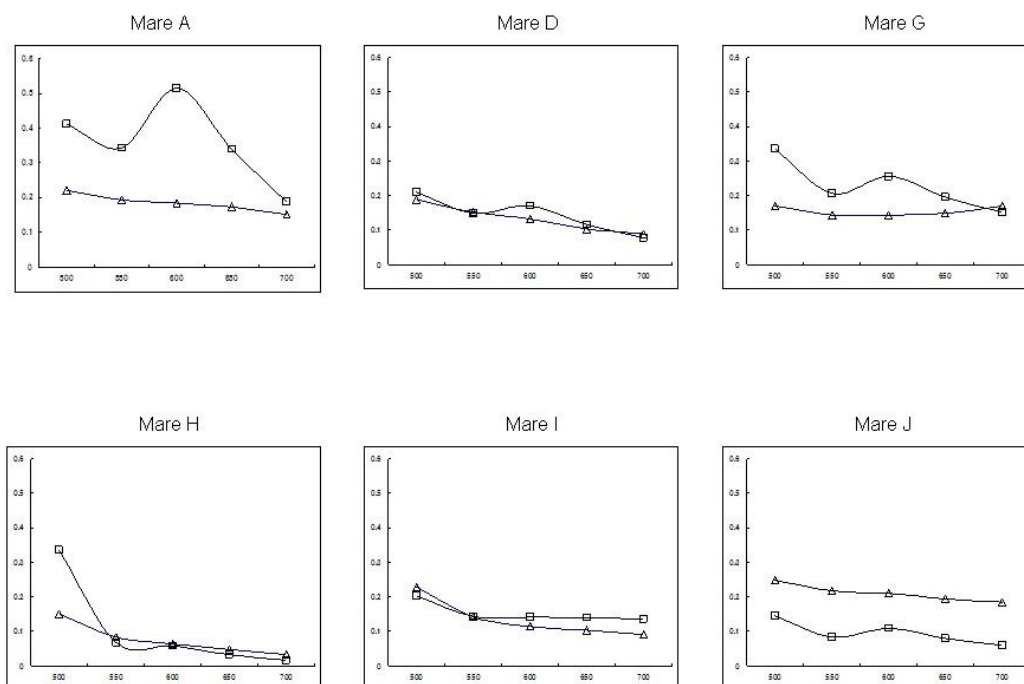


Fig. 2-15

腹水の色調を吸光光度計により解析したグラフ。横軸は波長、縦軸は吸光度を示し、 $\Delta$ は色素の卵管通水処置前、 $\square$ は処置後を表す。Mare A, D, G および J では、肉眼所見と一致してインジゴカルミン色素の吸光度がピークを示す 610 nm 付近で吸光度の顕著な上昇が観察され、肉眼的には色調が確認されなかった 2 頭中、Mare H では僅かな上昇が認められたが、Mare I では確認されなかった。



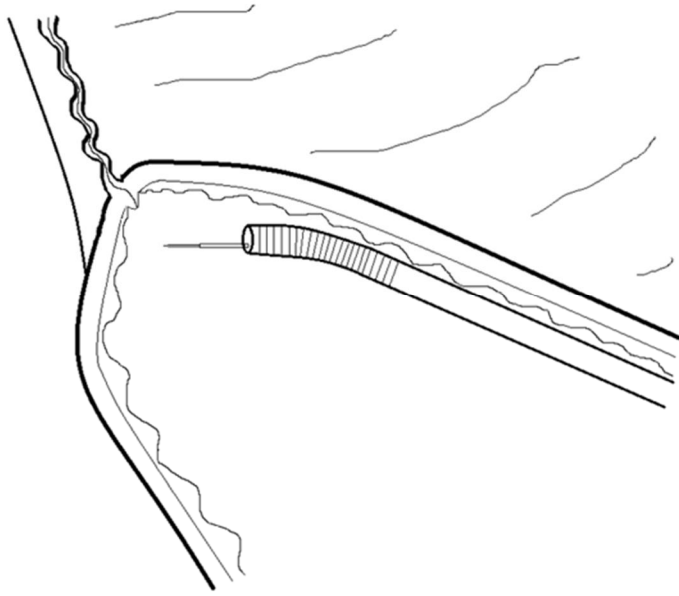


Fig. 2-16

子宮内への内視鏡挿入時の模式図（子宮が空気により過度に膨満した場合）。内視鏡のダイヤルで操作できるのは先端部のみであり、子宮内壁に沿って子宮角先端部に挿入されるため、子宮が膨満した状態では卵管子宮口へのカテーテルの挿入角度を合わせることが困難である。

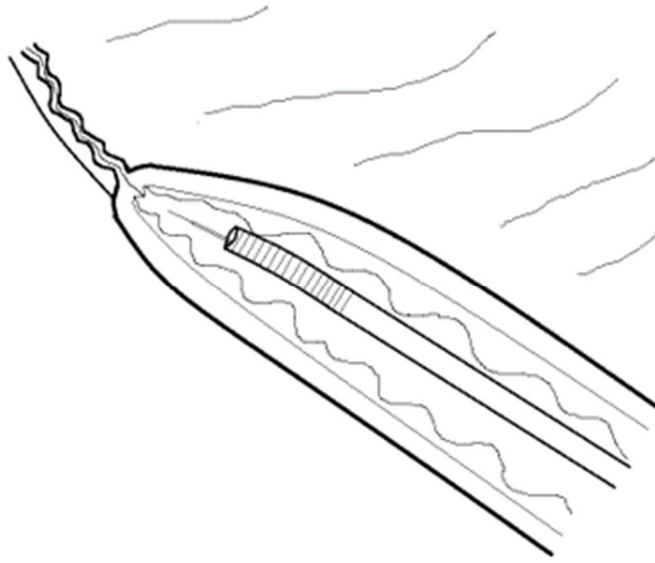


Fig. 2-17

子宮内への内視鏡挿入時の模式図（子宮を最小限の空気送入により気張させた場合）。子宮内壁に沿って進行させた内視鏡は卵管子宮口へのカテーテル挿入の際に角度を合わせやすい。

### 第3章 原因不明の不妊症に対する内視鏡下選択 的卵管通水法による治療の臨床応用

### 3-1 背景と目的

子宮と卵管は卵管子宮口により接続している。この卵管子宮口は、精子が卵管に進入する際の唯一の入口であり、また逆に卵管内で桑実胚となった受精卵にとって子宮内へ進入する唯一の開口部でもある。ヒト[50, 51, 52, 53]やウシ[54, 55, 56, 57]では子宮腔内から卵管への解剖学的な移行は、卵管子宮口が閉鎖していることもなく比較的スムーズであり、卵管への診断的および治療のための子宮内からのアプローチは比較的容易である。ヒトでは不妊症の原因となる感染性卵管疾患、例えば卵管炎のような疾患の発症頻度が比較的高いが、これは卵管子宮口の解剖学的な構造により細菌が卵管内に容易に進入することに起因していると考えられている。これに対し、馬では卵管子宮口の開口部が発達した平滑筋により緊縮している特徴的な解剖学的構造を有する。このため感染性の卵管疾患に起因する不妊例は、比較的稀であるとされている一方、子宮内から卵管にアプローチする方法は制約される。

馬の卵管内には、剖検後の所見からゼラチン塊が内在している例が多いことが知られている[43, 44, 45, 46]。しかし、このゼラチン塊のほとんどは、交配後卵管子宮口から卵管内に進入する精子の通過、あるいはその後に形成される受精卵の卵管通過を妨げるほどの大きさに至っていないため、臨床上受胎に対する影響を考慮した場合には重要視されていない。しかし、のちに剖検により採取された卵管が完全にゼラチン塊により内腔が閉塞している症例が報告されたことにより[47, 48]、潜在的な卵管性不妊の症例が存在することが示唆された。

このような不妊の原因となるゼラチン塊の存在は、著しく大きな場合を除いて、経直腸的な卵管の触診および超音波検査、または肉眼的もしくは腹腔鏡を用いた視診で卵管の疎通性障害を診断することは限定的である。

臨床的には、現時点では超音波検査、細菌検査、細胞診、子宮内膜バイオプシーなどの診断方法を用いて子宮疾患を否定する、これに加えて性ホルモン測定などで内分泌機能に異常がないことを確かめたうえで、消去法により卵管疾患を疑う診断プロセスとなる。

馬の卵管子宮口は発達した平滑筋により小乳頭状に隆起し、その開口部は著しく狭いため[58]、卵管子宮口が閉鎖しておらず子宮腔から卵管腔へスムーズに移行するヒトやウシと比較して、卵管子宮口から卵管への診断的、あるいは治療的なアプローチが困難である。このため、卵管の疎通障害を治療する方法は、主に腹腔に開口する卵管采側から実施されてきた。

初期の報告[68]では、馬の両側の臍部より注射針を刺入し、生理食塩水に顆粒状のでんぷんを攪拌した溶液を 5ml ずつ卵巣表面に吹きかけ、その 24 時間後に外子宮口と膣の頭側部を 20ml の生理食塩水で洗浄し、その回収液中にでんぷん顆粒が含まれているか 2%ルゴール溶液と混和し鏡検することにより確認した。また、超音波ガイドにより経膣的に注射針を卵巣付近まで刺入し、色調の異なる蛍光性のマイクロスフェア（直径 15 $\mu$ m, 100 万個）を 5ml の生理食塩水に混入して左右それぞれの卵巣に吹きかけ、その 24 時間後および 48 時間後に子宮洗浄を実施し、その灌流液中にマイクロスフェアの存在をフローサイトメトリー法により確認することで卵管の疎通性を検証することを試みた報告がある[69]。これら 2 つの方法は、卵管の疎通性の診断的なツールにはなり得るが、卵管を閉塞している細胞塊を取り除く治療法としては適していないとされている[66]。

次に、卵管采からバルーンカテーテルを挿入し、卵管膨大部で固定した後、卵管内に通水する方法が考案された。Bennet [66]は 2~4 シーズンの原因不明な不妊歴を有する牝馬 31 頭に対し、全身麻酔下で開腹、目視化で卵管采から膨大部にバルーンカテーテルを挿入固定したのち、5%ニューメチレンブルー溶液 20ml を用いて卵管を通じて子宮腔内に通水する方法を試みた。このうち 3 頭は病変が確認されず、13 頭および 6 頭でそれぞれ両側および片側の卵管疎通障害が見られ、9 頭で卵管采に病変があったが卵管の疎通性は良好であったとしている。また、この処置を実施した 31 頭中 17 頭が術後 1 回目の発情周期で受胎したと報告している。この方法をより非侵襲的に実施する目的で、実験馬を立位のまま鎮静させ、まず 8 頭で経膣的に腹腔鏡を腹腔内に挿入し、鏡視下で卵管膨大部にカテーテルの装着を試みた報告がある[67]。多くの馬で卵管采を観察することは可能であったが（左側：7/8 頭、右側：6/8 頭）、

全てにおいてカテーテルを装着することは不可能であった。次に 11 頭を用いて臍部よりアプローチを試み、7 頭でカテーテル装着に成功した。この成功例ではメチレンブルー溶液 20ml を用いて、子宮腔内に向けて卵管内を疎通させた。この処置の 15 分後に子宮鏡検査を実施し、5 頭でメチレンブルー色素の存在を観察したと報告している。

以上のような卵管采から卵管子宮口へ通水する方法が採用されてきたが、その欠点として、直径がより太い卵管膨大部から卵管峡部もしくは平滑筋により閉じられている卵管子宮口に水压をかけるため、卵管が細胞塊等により完全に閉塞しているケースでは、卵管を通水し細胞塊を取り除くことは不可能で、強すぎる水压をかけると卵管が破裂することがある[66]。また、Bennet が実施したような全身麻酔下で開腹する場合は、麻酔に伴うリスクが発生し、開腹手術自体が侵襲的である。一方、腹腔鏡下で実施した場合には、色素の溶液が逆流し、腹腔内に流出することにより、一時的な腹膜炎を発症した症例が報告されている[67]。これに加えて、腹腔鏡手術の設備にはコストがかかり、開腹手術ほどではないが侵襲的であり、術式を正確に遂行するには経験が必要とされる。

近年、腹腔鏡観察下で卵管にプロスタグランディン E2 を含有するゲルを塗布する方法が報告されている。プロスタグランディン E2 は受精卵が 6～9 日令の桑実胚になった際に卵管内で分泌する物質であり、卵管の平滑筋を弛緩させ縦軸方向への収縮を促す作用を有し [72, 73]、この分泌に伴い受精卵は卵管から子宮腔内へと移送される。この PGE2 の作用を利用して卵管内の細胞塊を子宮腔内へ排出させようとする試みがとられた。Allen ら[70]は、原因不明な不妊馬 15 頭に対し、立位で腹腔鏡を臍部より挿入し、鏡視下で両側の卵管に PGE2 0.2mg を混和したトリアセチンジェル 0.5ml を塗布した。その結果、処置を実施した繁殖シーズン中に 12 頭、翌シーズン中に 2 頭受胎したと報告している。また Ortis らの報告によると[71]、原因不明の不妊馬 28 頭を用い同様の処置を実施したところ、術後に受精卵移植のドナーとして供用した 20 頭中 17 頭で受精卵が採取され、8 頭中 7 頭が受胎したとしている。

この方法では PGE2 の作用により卵管自体の運動性と収縮性がコントロールされると推察されるため、卵管膨大部にカテーテルを挿入する方法よりは安全に実施できると考えられる。一方、細胞塊を取り除くため

に加圧されるわけではないので、細胞塊の大きさによっては卵管膨大部から峡部を通じ、卵管子宮口を通して細胞塊が排出されるのは困難な症例が予想される。また、この方法も腹腔鏡を用いるため、ある程度の侵襲性は避けられず、コストは高く、術者の熟練度などが必要とされる。最近、PGE2と同様に卵管への作用を期待して卵管子宮口に PGE1 溶解液を噴霧することにより、のちの交配で 22 頭中 17 頭において受胎能が回復したと報告されている[84]。この報告例では卵管子宮口に PGE1 を噴霧するだけで卵管自体の収縮性や運動性が影響されるかは疑問であり、妊孕性を向上させた作用機序は不明である。

卵管子宮口から卵管采側へ通水する方法は、唯一観血的な方法として報告されている[74]。その報告では、3 年以上原因不明の不妊である 8 頭に対し、全身麻酔下で開腹し、左右それぞれの子宮角先端を腹腔外に露呈させた。その後、卵管子宮口に近い子宮角先端部を切開し子宮腔内を露呈させ、その術部より目視化で卵管子宮口にカテーテルの装着を試み、卵管の通水を実施した。その結果、5 頭でカテーテル装着した後の通水により細胞塊を取り除くことに成功し、このうち 3 頭が受胎した。残り 3 頭中 1 頭では卵管子宮口が癒着し開口部が確認されず、2 頭では通水には成功したが細胞塊は排出されなかったとされている。この方法は、卵管の解剖学的構造から考えると細胞塊を排出させやすい方向に通水することが可能であり、栓塞している細胞塊の除去を肉眼的に確認できるメリットがある。一方、全身麻酔のリスクが伴い、開腹および子宮を切開しなければならない侵襲性が非常に強い方法であるため、臨床例に用いるには限定的である。

人では卵管の疾患を診断および治療する方法として、子宮鏡観察下でカテーテルを卵管内に装着し通水する選択的卵管通水法が確立されている[75, 76, 77, 78]。人の卵管子宮口は解剖学的構造が馬とは異なり、乳頭状に突出しておらず平滑筋による開口部の緊縮がないため、子宮内に注入した気体または液体は子宮腔から卵管腔にスムーズに移行する。この構造から、卵管の疎通性を検査するには、卵管通気法や卵管通水法などがスクリーニング方法として挙げられるが、診断精度がより高く、卵管周囲の癒着も評価できる点から子宮卵管造影法 [79, 80, 81]が一般的に用いられている。この方法に加え、卵管の病変部位を特定する目的

で、子宮内に注入された色素の卵管での疎通および腹腔内への漏出を、腹腔鏡を用いて確認する腹腔鏡下卵管通水法 [82]が報告されている。さらに近年において、数ミリ径のフレキシブルファイバースコープが開発されて以来、この子宮鏡観察下で外径 8～9 mm程度のカテーテルを卵管子宮口に挿入し、生理食塩水や色素を注入し、その逆流の有無を観察することにより卵管の疎通性を確認する子宮鏡下選択的卵管通水法が確立されている[53, 75, 85]。

第二章では、人用大腸ファイバースコープのワーキングチャンネルを通じて卵管子宮口に挿入することが可能なカテーテルを作成し、そのカテーテルを用いて内視鏡観察下で卵管子宮口から卵管疎通を実施することが高い確率で可能であることが確認された。第三章ではこの技術を応用し、既存の診断方法では異常所見が認められない不妊馬において、多くの剖検所見で認められる卵管内のゼラチン塊による卵管閉塞に起因して不妊症が発症していると仮定し、その細胞塊を卵管子宮口からの生理食塩水による通水で腹腔内に押しやることで卵管の再疎通を試みた。その処置後の受胎率を調べることで、その卵管通水法が妊孕性の改善に有効であるか検討した。

### 3-2 材料および方法

#### 治療対象馬の選抜

本研究は 2001 年から 2016 年において、28 頭の空胎馬（3～20 歳のサラブレッド種の未経産馬 12 頭および経産馬 15 頭、これらに加えて未経産の重種馬 1 頭）を臨床例から選抜して実施した（Table 1 および 2）。これらの牝馬は 1～6 頭（平均  $2.2 \pm 1.4$  頭）の妊孕性の正常な種牡馬を、2～20 回（性周期で平均  $6.5 \pm 4.5$  周期）交配しても受胎しなかった症例であった。また、すべての牝馬で生殖器に解剖学的な異常所見はみられず、交配前後に子宮内に不妊の原因となり得ると判断される貯留液は認められなかった。さらに、子宮内膜スワブを用いた細胞診および細菌検査では、感染性子宮内膜炎を示す所見は認められなかった。無作為に抽出した 4 頭において子宮内膜バイオプシーを実施したが、標本の子宮内膜組織所見はすべて正常であった。すべての牝馬において、卵管



通水処置前に子宮洗浄，子宮内への抗生物質投与等の試験的治療を実施されていたが，受胎には至らなかった。

#### 供試馬のグループ分け

本研究に供試した 28 頭を，今回不妊治療として用いた卵管通水法の効果をより明確にする目的で，4 発情周期もしくはそれ以上の周期における交配で受胎しなかった群（Group 1：未経産馬 7 頭および経産馬 9 頭）（Table 1）と，2 もしくは 3 発情周期における交配で受胎しなかった群（Group 2：未経産馬 6 頭および経産馬 6 頭）（Table 2）に二分した。

#### 卵管通水法の実施時期

本研究における卵管通水は，25 頭では発情期に，3 頭では黄体期に実施した。発情期に実施した 25 頭では，交配前  $3.2 \pm 2.3$  日（中央値 2 日）に行った。

#### 卵管通水法の手順

内視鏡観察下での両側の卵管通水は，第一章で記載した方法と同様の手順で実施した。

##### a. 供試馬の術前処置

供試馬は柵場保定し，塩酸デトミジン 5mg および酒石酸ブロールファンール 5mg を混合して静注することにより鎮静し，必要に応じてこの鎮静剤を追加投与した。尻尾をロープで挙上固定した後，尾根部をバンデージで包交し，外陰部を外科的に消毒した。陰門形成術（Caslick's operation）が実施されていた場合には，塩酸リドカインを陰門皮下に注入し切開した。その後，膀胱内に尿道カテーテルを挿入し，術中にできるだけ尿が残存していない状態にした後に術式を実施した。

##### b. 卵管通水用カテーテルの作成

卵管通水カテーテルの作成には第一章の実験で用いたものと同じ機材を使用した（外径 1.7mm, 200cm のポリエチレン細管（Hibiki®

POLYETHYLENE TUBING size 5) , 22G 4.45cm 留置針の外筒, ヒト血管造影用のガイドワイヤー (TERUMO® RF-GA18263: 直径 0.46mm, 長さ 220cm)。まず留置針の外筒をコネクター部との接合部で切断し, これをポリエチレン管に約 1 cm 挿入して接着剤で固定した。この中に, ガイドワイヤーをハンドル側より接合した留置針の外筒に向けて挿入した。作成した卵管通水用カテーテルは, 術前にエチレンオキシドガスを用いて滅菌した (Fig. 3-1)。

#### c. 内視鏡の子宮内挿入

今回実施した選択的卵管通水法は 3 人のオペレーターにより実施した。オペレーター1 は手指を外科的に消毒した後, 滅菌した直腸検査用手袋およびその上に重ねて手術用手袋を片手に装着した。その状態で事前に内視鏡消毒器 (Olympus® EW-10 もしくはカイゲン® クリーントップ MW-S) により消毒した 130cm のヒト用大腸ビデオスコープ内視鏡 (Olympus® CF140I) を外陰部より膣内に挿入した。このビデオスコープはビデオプロセッサー (Olympus® CLV-U20 もしくは CV-E) および光源に接続して使用した。オペレーター2 はオペレーター1 と協調してダイヤルにより内視鏡の挿入方向を操作した。オペレーター1 の手指で内視鏡を子宮頸管を通じて子宮内に挿入した後, 先端からろ過した空気を送気して子宮を膨らませながら子宮体部を通過させ, 左右子宮角分岐部を確認した (Fig. 3-2)。その後, まず内視鏡を左子宮角に誘導し, なるべく少量の空気ですべて子宮を膨満させることにより視野を確保しながら左卵管子宮口に到達させ, その形状を詳細に観察した (Fig. 3-3)。発情期では子宮内を子宮頸管が弛緩し, 子宮自体も緊縮していないことから, 子宮内を膨らませて視野を確保するのが困難であるため, 子宮内膜が開いてきた方向, すなわち子宮角先端へ向けて積極的に内視鏡を押し進めた。内視鏡が子宮角先端に到達した後, 卵管子宮口の位置とその開口方向を確認したのち, 内視鏡のワーキングチャンネルを通じて作成したカテーテルを内視鏡の先端から卵管子宮口へ誘導した (Fig. 3-4)。

#### e. 卵管子宮口への卵管通水用カテーテルの挿入と卵管の通水

オペレーター3は、卵管通水用カテーテルの先端よりガイドワイヤーを2mm程度露呈させ、オペレーター1および2の注意深い内視鏡操作と共に卵管子宮口内へカテーテル先端を約2～3mm挿入した（Fig. 3-5）。オペレーター2が内視鏡先端を僅かに動かすことで、カテーテルの先端が卵管子宮口の一点からずれることがなく、確実に卵管子宮口内に挿入され固定されていることを確認した後、ガイドワイヤーを抜去し、生理食塩水10mlをゆっくりと卵管内に注入した（Fig. 3-6）。そののち一時的に内視鏡を子宮体部まで牽引し、使用したカテーテルをワーキングチャンネルより抜去した。滅菌された別の卵管通水用カテーテルを新たにワーキングチャンネルに挿入し、内視鏡を右子宮角先端まで誘導したのち、左卵管と同様に生理食塩水10mlを右卵管内に通水した。

#### 術後の処置と管理

卵管通水の処置後、内視鏡を子宮内より抜去してから医原性の感染を回避するため、すべての馬においてアンピシリンナトリウム3gを生理食塩水50mlと混和し、薬液注入用ピペットを用いて子宮内に注入した。また必要に応じて、再度塩酸リドカインを陰門に浸潤させ、外陰形成術を実施した。発情期に実施した25頭では、子宮平滑筋の収縮を促すことにより、子宮内に貯留した空気を除去する目的でオキシトシン20IUを静注した。黄体期に実施した3頭では、術後に黄体を退行させ子宮頸管を弛緩させると同時に子宮平滑筋の収縮を促すために、プロスタグランディンF2 $\alpha$ の類縁物質であるクロプロステノール250 $\mu$ gを筋注し、処置後に回帰した発情期より交配に臨んだ。

すべての牝馬に対し1発情期に1回のみ交配し、交配後48時間位以内に超音波診断装置を用いた直腸検査により排卵を確認した。また受胎の確認は交配後15日で超音波診断装置を用いて実施した。その際に双胎もしくは三胎を受胎していた場合には、用手破碎術を実施し単胎として妊娠を継続させた。

### 3-3 結果

### 卵管子宮口へのカテーテル挿入の成功率

処置を実施した 28 頭中 22 頭（78.6%）において、両側の卵管子宮口へのカテーテルの挿入が成功した。残り 6 頭（21.4%）では左側の卵管子宮口のみ挿入が可能であった。カテーテルが挿入できた計 50 卵管に生理食塩水 10ml の注入を試みたところ、すべての症例において卵管子宮口から多少の生理食塩水の漏出は見られたものの、内視鏡観察下で推察したところ、少なくとも半量以上は通水された。卵管子宮口へのカテーテル挿入が不可能であった 6 頭中 3 頭では、内視鏡の最大限の操作にもかかわらずカテーテル挿入方向を卵管子宮口の開口方向に一致させることが出来なかったためであった。残り 3 頭中 2 頭では卵管子宮口の開口部が明瞭に観察されなかったことに起因し、他の 1 頭では術中に卵管子宮口周辺に明瞭な浮腫が観察され、卵管内膜下に生理食塩水が注入されたと推察されたため、処置を中断した。

### 卵管通水処置後の受胎率

今回の研究で用いた計 28 頭中 26 頭が卵管通水の処置後に受胎した。このうち未経産馬では 13 頭中 12 頭、経産馬では 15 頭中 14 頭が受胎した。Group 1 および 2 を比較すると、Group 1 では 16 頭中 15 頭、Group 2 では 12 頭中 11 頭が受胎した。

### 受胎までの交配回数

受胎した牝馬 26 頭における処置後の受胎確認までの交配回数は 1 回から 4 回であった。その内訳は Group1（15 頭）および Group 2（11 頭）で、それぞれ 1 回：5 および 7 頭、2 回：8 および 4 頭、3 回：3 および 0 頭、4 回：0 および 1 頭で、受胎確認までの平均交配回数はそれぞれ  $1.6 \pm 0.9$  および  $1.9 \pm 1.1$  回であった。今回の研究で受胎しなかった 2 頭は、処置を実施した時期が繁殖シーズンの終盤だったこともあり、畜主の意向で交配回数は 1 回のみであった。

### 左卵管のみ処置が可能であった症例

左卵管のみの通水が可能であった 6 頭中では、処置後 1 回目の発情周期での排卵が左卵巢、右卵巢および両側で確認されたものが、それぞれ

4 頭, 1 頭, 1 頭であった。このうち左卵巢で排卵したもの 1 頭と両側で排卵したもの 1 頭が, その周期中の交配で単胎を受胎した。処置後 1 回目の交配で受胎しなかった残り 4 頭では, 全てにおいて 2 回目の周期中に左卵巢での排卵が確認され, このうち 3 頭が受胎した。受胎しなかった残り 1 頭では, 3 回目の発情周期中に左卵巢での排卵が観察され, その周期中の交配で受胎した。

#### 双胎の発生率

妊娠した 26 頭で, 受胎した周期中に左右両側の卵巢での二排卵が観察されたものが 6 頭認められ, このうち 5 頭は双胎を受胎した。また別の 1 頭では, 卵管通水処置後から初めの交配後に左右卵巢でそれぞれ 2 排卵および 1 排卵が確認され, 三胎を受胎した。したがって, 交配した周期中に左右両側の卵巢において 2 もしくは 3 排卵が確認された 7 頭中 6 頭で多胎妊娠が観察された。これら 6 頭では, 胎令 15 日に一方の胎胞に用手破砕術を実施し単胎として妊娠を継続させた。

#### 出産率

処置後の妊娠馬 26 頭中 25 頭は翌年正常分娩した。残り 1 頭は 20 歳令であり, 交配後 6 か月までは妊娠が継続されているのが確認されたが, 9 か月時に子宮動脈破裂により死亡した。

### 3-4 考察

本研究の結果から, 卵管子宮口にカテーテルを挿入し, 生理食塩水を通水する卵管通水法は, 卵管閉塞が疑われる不妊馬に対し受胎率を著しく向上させることができることが判明した。

本研究の症例は, オーナーが所有する繁殖牝馬を用いた臨床例であり, 過去の卵管の疎通障害を疑った症例に対する治療方法に関する報告と同様に, コントロールグループを設定することはできず, 卵管通水の効果を客観的に評価することは困難であった。しかし, 卵管通水処置後に交配回数が 2 回以内で受胎したものが 82.1%, 4 回以内で 92.9%だったことから推察すると, 今回用いた牝馬の繁殖経歴を考慮した場合, 処置

後には原因不明の不妊馬は高い確率で受胎したと考える。

今回用いた牝馬の不妊の原因が卵管閉塞であるとは断定できない。しかし、現時点で馬の卵管の疎通性を客観的に評価することは困難であるため、卵管閉塞による不妊症の可能性を考慮する場合、考えうる不妊の原因をすべて排除したうえでの消去法に頼らざるを得ない。今回の卵管疎通を実施する前には、すべての牝馬で不妊の原因を追究するために考えうる検査および試験的治療を実施したが、どの結果もその不妊の原因が説明できるものではなかった。診断が困難な感染性の子宮内膜炎も報告されているが[11, 16, 24, 25]、卵管通水後の高い受胎率から考えると、今回用いた症例の不妊の原因は卵管閉塞に起因していた可能性が高いと推測される。

細胞塊により閉塞した卵管の可能性のある治療方法として、Bennet [66] は患馬を開腹し目視化で、Kollman ら[67] は腹腔鏡観察下で卵管際にカテーテルを挿入して通水を実施している。また、Allen ら[70] とOrtis ら[71] は腹腔鏡下で卵管に PGE2 を塗布することにより卵管を弛緩させると同時に卵管絨毛の運動を活性化させることにより、細胞塊を子宮内へ排出させることを試み、その処置後に高い受胎率（それぞれ 15 頭中 14 頭および 8 頭中 7 頭）が得られたと報告している。しかし、卵管膨大部の直径は峡部よりも著しく大きく、細胞塊の多くは卵管膨大部と卵管峡部の境界部に存在することが知られていることから、これら受精卵の移動する方向として順方向に細胞塊の排出を試みる **normograde therapy** は、特に細胞塊が大きい場合には、その除去は困難であると推測される。このことに加え、腹腔鏡手術には高価な専門的機器と熟練した手技が要求されることも一般的な普及を阻害している要因の一つであると考えられる。これに対し、卵管子宮口から卵管采側へ細胞塊の排出を促す **retrograde therapy** は、比較的大きな細胞塊でも腹腔側への排出が期待できるというメリットがある。過去に唯一 **retrograde therapy** として報告されているのは、全身麻酔下で子宮角先端を切開し、直接子宮卵管口にカテーテルを挿入する方法 [74] である。この報告の中では、術後に 5 頭中 3 頭が受胎したとされているが、この手法自体が著しく侵襲的であり、全身麻酔のリスクを伴う。これら過去に報告された卵管内の細胞塊除去のための手法と比較して、今回用いた方法はメリットを有す

る retrograde therapy であり、かつ馬体への侵襲性も著しく低い。

今回の研究で、発情期に実施した牝馬は 25 頭であったが、このうち 20 頭では両側の卵管子宮口にカテーテルの挿入が可能であり、5 頭では左側のみ挿入が可能であった。第一章では、卵管通水は黄体期もしくは卵巢休止期に実施するべきであると結論付けたが、今回の研究においても発情期では内膜の浮腫が強くなり内視鏡の視野を妨げ、これに加えて子宮の運動が亢進し卵管子宮口へのカテーテル挿入が困難になることが再確認された。

全 28 頭で 6 頭において右卵管にカテーテルが挿入できなかったが、このうち 3 頭では内視鏡の操作範囲から外れた位置に卵管子宮口が観察されたことに起因した。筆者は過去の報告の中で、子宮内が過剰に膨満するとカテーテルを挿入することが困難になると示唆したが、今回の症例はすべて左卵管から卵管通水を実施したため、右卵管にカテーテルを挿入する際にはすでに子宮全体が空気で膨満し、これが原因で右卵管でのカテーテル挿入が困難になったと考えられる。この場合には、左側の処置が終了した後、一度子宮内の空気を抜去しあらためて右側の処置を実施することが有効かもしれない。残り 3 頭中 2 頭では、右卵管子宮口が内視鏡観察時にその開口部が不明瞭であったため、カテーテル挿入が不可能であった。この 2 頭が不妊となった原因が、卵管子宮口開口部の解剖学的構造に起因したかは内視鏡像のみで確定診断することは困難であった。しかし、術前の交配回数は多く、左卵巢で形成された卵胞が排卵した性周期が複数回あったことが確認されている。したがって、これらの症例では右卵管子宮口の解剖学的な異常もしくは卵管閉塞に加え、左卵管は細胞塊により閉塞していた可能性がある。他の 1 例では卵管子宮口にカテーテルは誘導できたものの、生理食塩水が卵管子宮口周辺の粘膜下に注入されたと推察され、処置を中止せざるを得なかった。今回使用したガイドワイヤーの先端は鈍性であり、卵管内膜の穿孔は起こらないと推察していたが、卵管通水法を実施するにあたり、カテーテルの挿入には細心の注意が必要であると考ええる。

今回、卵管内に生理食塩水を通水している最中に子宮や馬自体が動いたことが原因で、カテーテルが卵管子宮口から外れた、あるいは卵管内での抵抗により生理食塩水の逆流が起こり、子宮腔内へ漏出したために

予定していた 10ml がすべて注入できなかった症例が見られたが、それらの症例においても処置中に内視鏡での観察下で推察したところ、半量以上は通水できたと考えられた。筆者の経験では、解剖後に取り出した卵管に直接色素を注入した場合、1ml 以下で卵管子宮口から卵管采まで通水できたことから考えると、卵管疎通には比較的少ない量で十分であると考えられる。

本研究では、受胎した 26 頭中 16 頭で、処置後 2 回以上の交配で受胎した。卵管内に存在する細胞塊の大きさや形状は様々であり、肉眼的に大型の細胞塊による卵管の膨隆が観察される症例も報告されている[47, 48]。今回の研究では、卵管内に細胞塊が存在したこと自体や、仮に存在した場合その大きさは計り知ることはできなかった。不妊が卵管内に存在した細胞塊に起因していたとすると、それが卵管通水により取り除かれたのちに受けた卵管のダメージの程度は不明であるが、その機能的回復にある程度の時間が必要であった症例も含まれていたと推測され、そのために処置後複数回の交配が必要であったと考える。本研究で卵管通水後に受胎しなかった 2 頭においても、上述のような理由であと数回交配する機会が与えられたら受胎していた可能性があると考ええる。

左卵管のみ通水が可能であった 6 頭では、全て左卵巢の排卵時に受胎した。このことは今回用いた卵管通水法により、卵管の疎通性が回復し不妊の原因が解消されたことを示唆している。

馬では排卵が複数観察された例で双胎が発現する確率はおおよそ 50% であると報告されている[91]が、今回の研究では処置後 7 頭中 6 頭と高い確率で認められた。これは、卵管内の一時的な疎通障害が通常でも潜在的に起こっていて、複数排卵した際に卵管内に卵子や精子、もしくは受精卵が卵管内でトラップされていることを裏付けているかもしれない。卵管疎通によりその原因が排除され、多胎妊娠が起こりやすくなった可能性があると考えられる。

今回の研究から、原因不明の不妊馬において卵管通水法を実施すると、術後の受胎率を著しく向上させることが可能であることが判明した。しかしながら現時点で不妊の原因となる卵管閉塞を的確に診断する方法は確立されていないため、卵巢や子宮における不妊の原因となる疾患もしくは状態をすべて考慮し、その可能性を否定した上で卵管通水



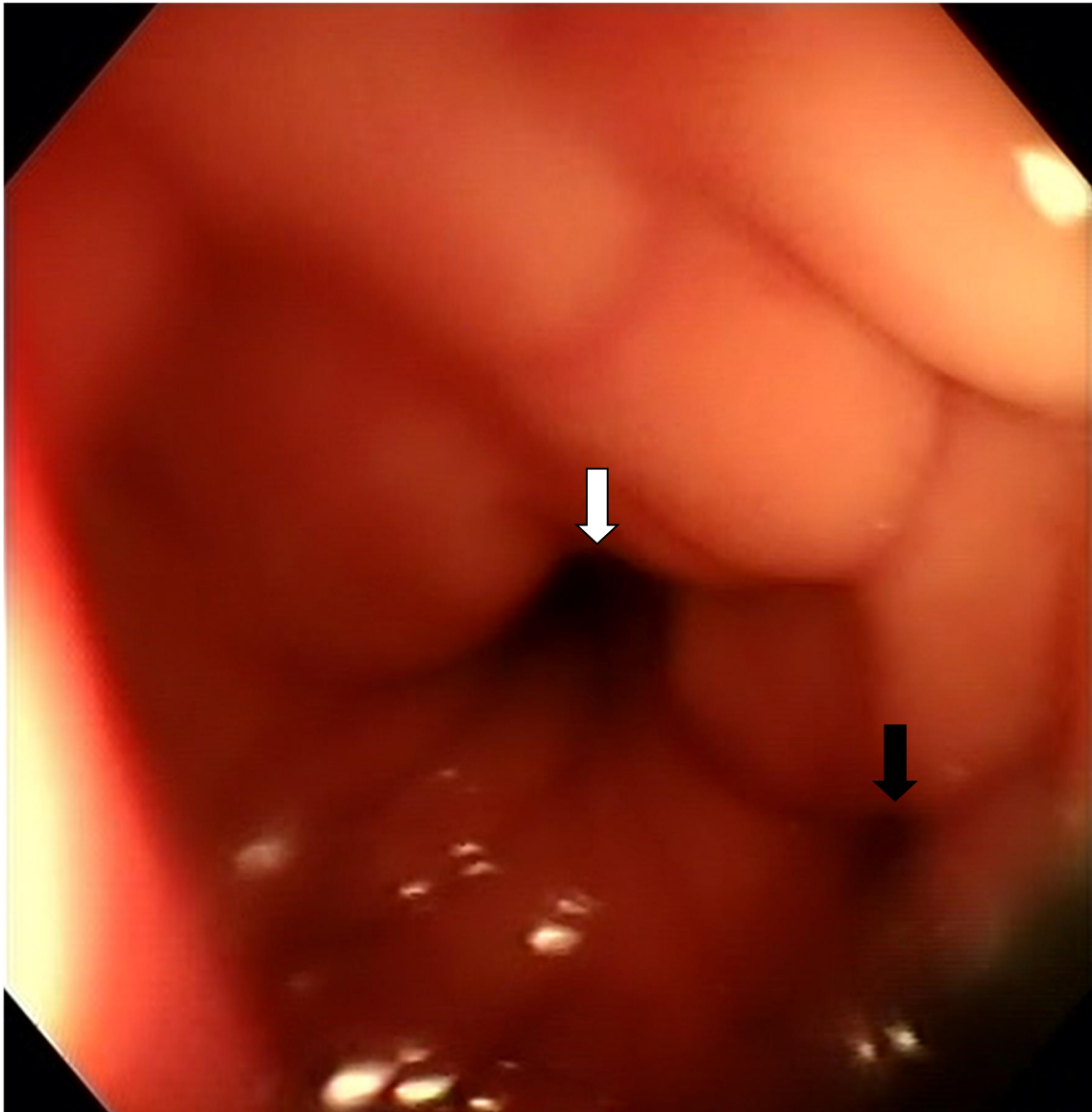
を実施することが重要であるとする。

### 3-6 図表



**Fig. 3-1**

卵管通水用カテーテルの作成（3）：作成した卵管通水用カテーテルは，術前にエチレンオキサイトガスを用いて滅菌した。卵管通水には 12ml シリンジに 20G 1.5 インチの注射針を装着し，生理食塩水を 10ml 注入して用いた。



**Fig. 3-2**

発情期における子宮角分岐部の内視鏡像（白い矢印：左子宮角入口，黒い矢印：右子宮角入口）。黄体期や卵巣休止期に比べると子宮内膜の浮腫が著しい。多くの場合，子宮頸管が弛緩していて子宮内を空気で膨満させることはほぼ不可能なこともあり，左子宮角より積極的に内視鏡先端より送気しながら子宮角先端へ進めていく。

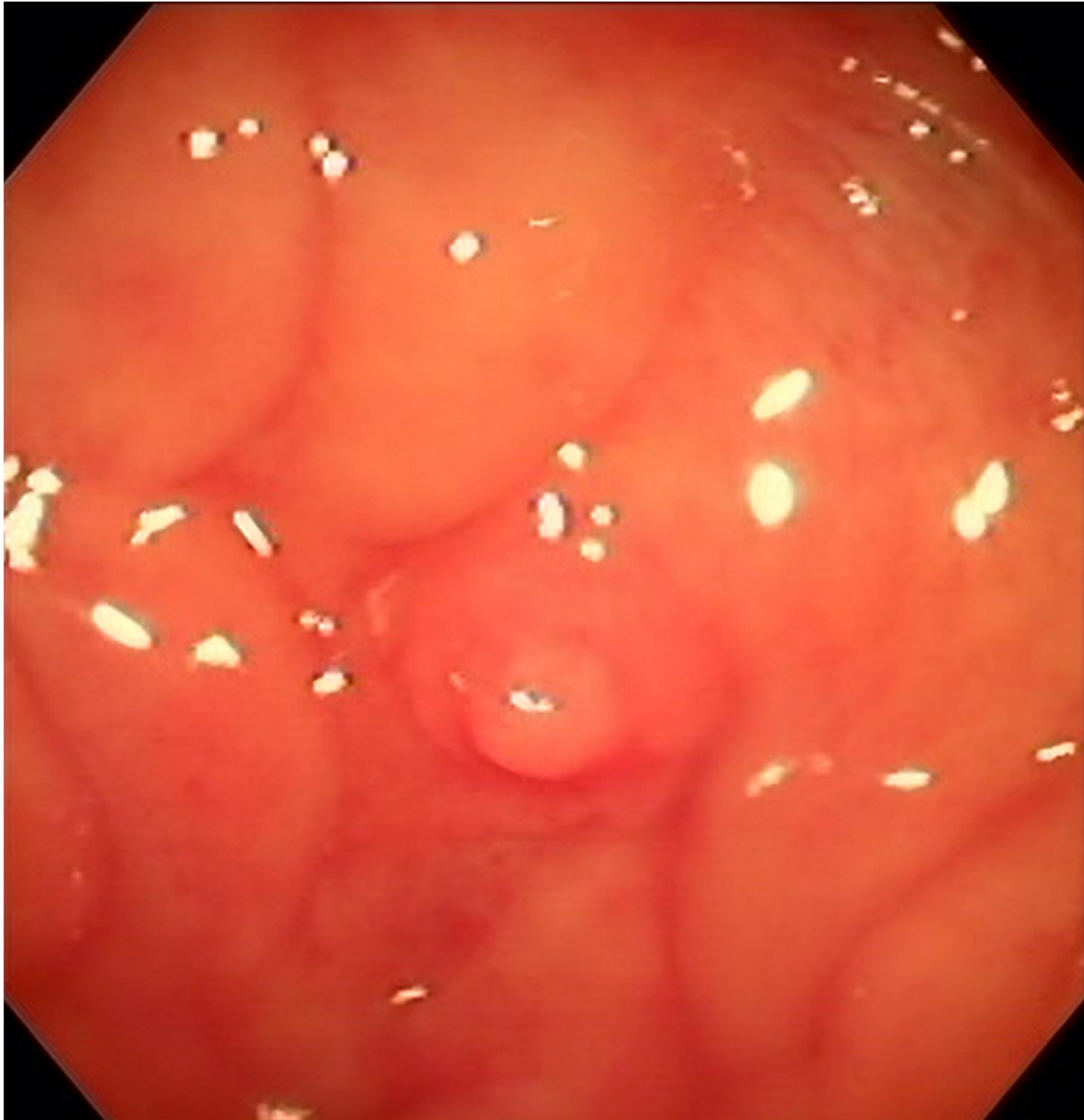
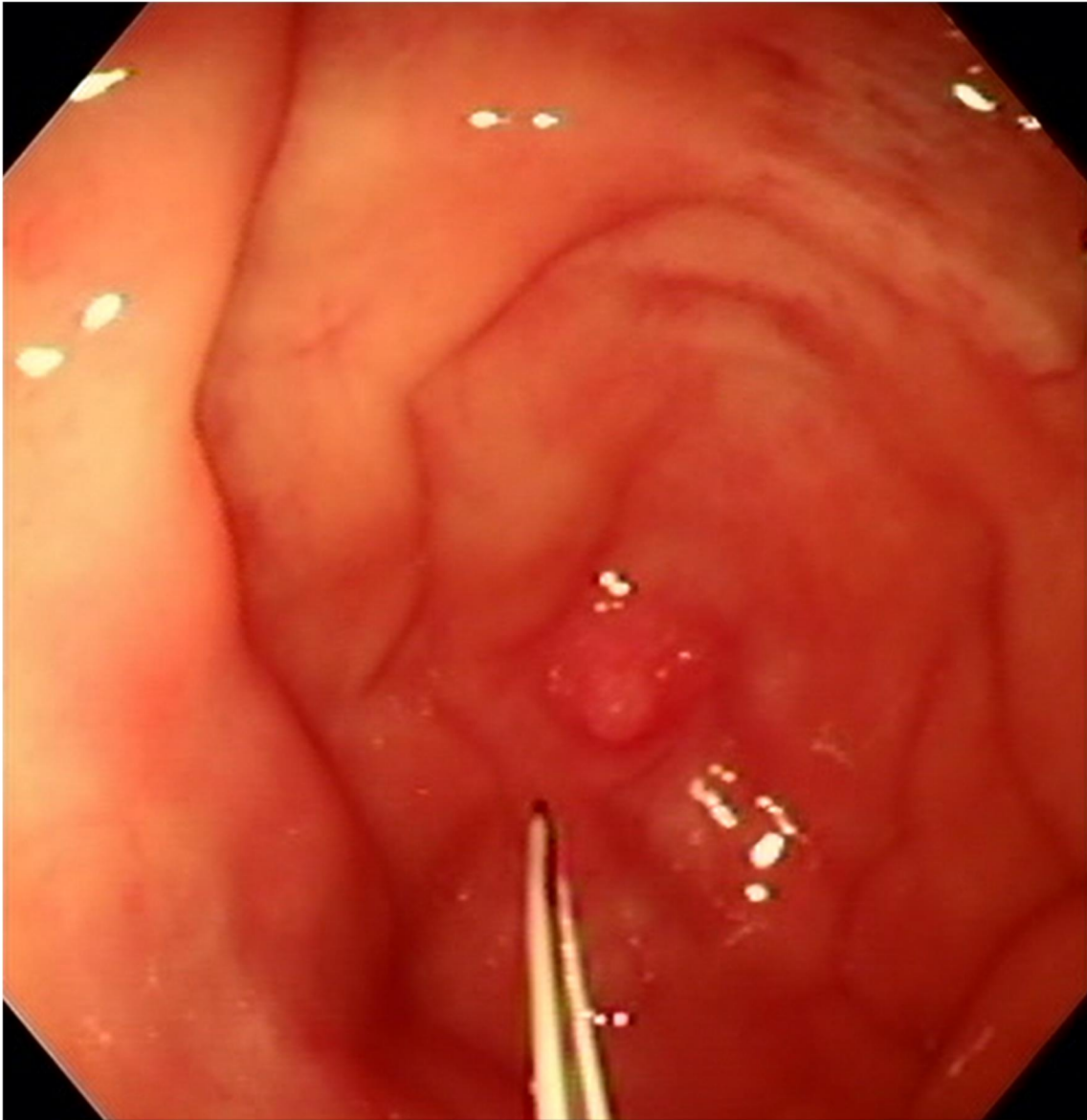


Fig. 3-3

発情期における卵管子宮口の内視鏡像。黄体期に比べると浮腫が著しく，開口部も不鮮明である。





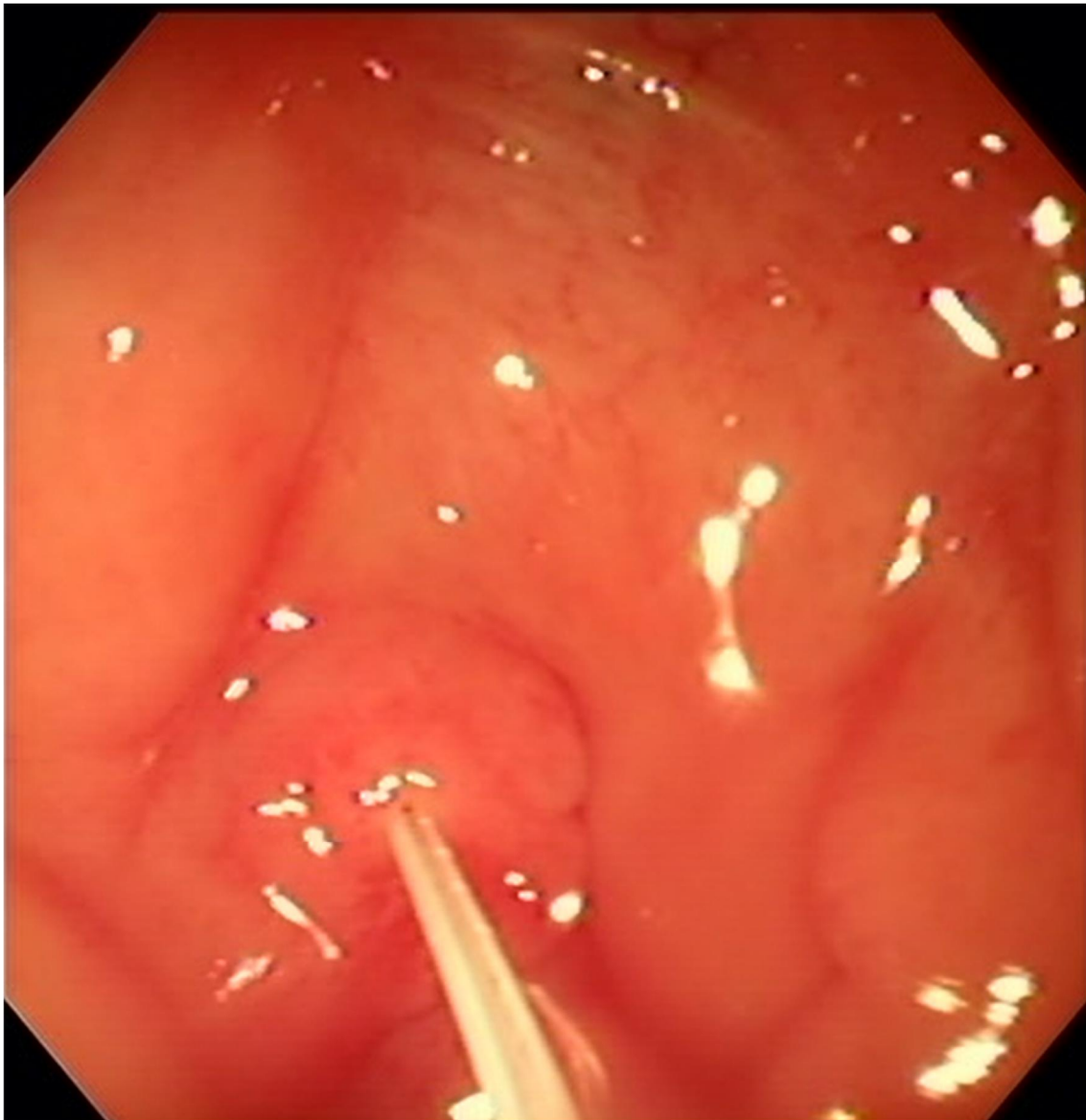
**Fig. 3-4**

卵管子宮口へのカテーテル挿入（1）：卵管子宮口の開口部を確認した後，卵管通水用カテーテルの先端を内視鏡のワーキングチャンネルから突出させた。



Fig. 3-5

卵管子宮口へのカテーテル挿入（2）：3人のオペレーターの注意深い協調により，カテーテル先端を卵管子宮口の開口部に接触させ，約2～3mm挿入した。



**Fig. 3-6**

卵管子宮口へのカテーテル挿入（3）：カテーテルが卵管子宮口へ確実に挿入されたことを確認した後，ガイドワイヤーを抜去して 12ml シリンジに用意しておいた生理食塩水 10ml を卵管内に注入した。

No.	年齢	分娩履歴	品種	処置前		性周期ステージ	卵管子宮口への カテーテル挿入		処置後	
				空胎年数	性周期数		左	右	妊娠	性周期数
1	16	経産	TB	1	7	発情期	○	○	受胎	2
2	5	未経産	TB	1	7	発情期	○	×	受胎	2
3	8	経産	TB	2	8	黄体期	○	○	受胎	1
4	14	経産	TB	2	12	発情期	○	○	受胎(双胎)	2
5	9	経産	TB	1	8	発情期	○	○	受胎	1
6	8	経産	TB	2	11	発情期	○	○	受胎(双胎)	1
7	5	未経産	TB	0	5	発情期	○	○	不受胎	1
8	7	未経産	TB	1	7	発情期	○	○	受胎	2
9	20	経産	TB	3	11	発情期	○	×	受胎	2
10	12	経産	TB	2	11	黄体期	○	×	受胎	2
11	12	経産	TB	2	9	発情期	○	○	受胎	2
12	9	未経産	DH	3	15	発情期	○	×	受胎	3
13	16	経産	TB	1	9	発情期	○	○	受胎	3
14	8	未経産	TB	4	20	黄体期	○	○	受胎	3
15	8	未経産	TB	1	6	発情期	○	○	受胎	2
16	4	未経産	TB	0	4	発情期	○	○	受胎	1
mean ± SD		10.0±4.5		1.6±1.1	9.4±4.0					1.9±0.7

Table 3-1

Group 1：卵管通水法の実施前に 4 発情周期もしくはそれ以上の周期における交配で受胎しなかった群（未経産馬 7 頭および経産馬 9 頭）。それぞれの年齢、品種、空胎期間および性周期数、卵管通水を実施した際の性周期、左右卵管子宮口へのカテーテル挿入の成功（○）もしくは失敗（×）、処置後の受胎と受胎までに要した性周期数。（TB：サラブレッド種、DH：ペルシュロン種）



No.	年齢	分娩履歴	品種	処置前		性周期ステージ	卵管子宮口への カテーテル挿入		処置後	
				空胎年数	性周期数		左	右	妊娠	性周期数
1	10	経産	TB	0	3	発情期	○	×	受胎	1
2	8	経産	TB	0	3	発情期	○	○	受胎	2
3	9	経産	TB	1	3	発情期	○	○	受胎	4
4	5	未経産	TB	0	2	発情期	○	○	受胎	1
5	6	未経産	TB	1	3	発情期	○	○	受胎(三胎)	1
6	5	未経産	TB	1	3	発情期	○	○	受胎(双胎)	2
7	12	経産	TB	0	3	発情期	○	○	受胎(双胎)	2
8	3	未経産	TB	0	2	発情期	○	×	受胎	1
9	7	経産	TB	0	3	発情期	○	○	受胎(双胎)	1
10	15	経産	TB	1	3	発情期	○	○	不受胎	1
11	4	未経産	TB	0	2	発情期	○	○	受胎	1
12	7	未経産	TB	0	2	発情期	○	○	受胎	2
mean ± SD		7.6±3.5		0.3±0.5	2.7±0.5					1.6±0.9

Table 3-2

Group 2：卵管通水法の実施前に 2～3 発情周期における交配で受胎しなかった群（未経産馬 7 頭および経産馬 9 頭）。それぞれの年齢，品種，空胎期間および性周期数，卵管通水を実施した際の性周期，左右卵管子宮口へのカテーテル挿入の成功（○）もしくは失敗（×），処置後の受胎とそれに要した性周期数（TB：サラブレッド種）。

## 総括

サラブレッド種は個々の経済的価値が高いため、生産性を向上させることは意義深い。生殖器疾患の診断および治療技術が年々進歩するに従い受胎率も向上してきたが、依然として原因不明の不妊症に遭遇する。

馬の卵巢や子宮に関しては比較的アプローチが容易であり、その部位が原因となる不妊症に対する診断や治療方法は改善されてきた。卵管の剖検所見ではコラーゲン塊が内在している症例が多く、その大きさによっては卵管の疎通性を障害し不妊の原因となり得ることが示唆されている。しかし、卵管性不妊に対する臨床的な診断、治療方法は確立されていない。これは馬の卵管子宮口は解剖学的に乳頭状に突出していて、発達した平滑筋により開口部が緊縮しているため、子宮腔から卵管内へのアプローチが困難であることに起因している。

一方、人の婦人科医療では子宮鏡観察下で卵管にカテーテルを留置し、卵管の疎通性を診断するための選択的卵管通水法が確立されている。

本研究の第2章では、大腸ファイバースコープによる観察下で子宮腔内から卵管子宮口に挿入可能なカテーテルを作成し、馬において内視鏡観察下で選択的卵管通水法が可能であるか検討した。その結果、作成したカテーテルは高い確率で卵管子宮口に挿入することが可能であり、そのカテーテルを通じて卵管内に色素を注入すると卵管やその周辺組織が着色したこと、また卵管采より漏出した色素により腹水が着色した症例があったことから、馬の卵管の疎通性を評価し得ることが判明した。

第3章では、第1章で確立した卵管通水法を用いて、既存の診断方法では異常所見が認められない不妊馬において、多くの剖検所見で認められる卵管内のゼラチン塊による卵管閉塞に起因して不妊症が発症していると仮定し、その細胞塊を卵管子宮口からの生理食塩水による通水で腹腔内に押しやることで卵管の再疎通を試みた。その処置後の受胎率

を調べることで、その卵管通水法が妊孕性の改善に有効であるか検討した。その結果、内視鏡観察下で卵管子宮口にカテーテルを挿入し、生理食塩水を通水する卵管通水法は、卵管閉塞が疑われる不妊馬に対し受胎率を著しく向上させることができることが判明した。

本研究で開発された選択的卵管通水法は斬新であり、子宮腔内から卵管に非侵襲的に通水することが可能となったことから、今までほぼ不可能であった卵管性不妊を有する症例に対し、臨床的にその診断や治療に寄与できる方法を確立し得ることが示された。将来的には、卵管授精の確立や卵管機能の研究等を進展させる一助となり、馬の生産率向上に大きく貢献できることが示唆された。

## 謝辞

本論文の執筆にあたり，多大なるご指導及びご鞭撻そして御校閲を賜りました帯広畜産大学教授 南保泰雄先生に深く感謝し，厚く御礼申し上げます。また，本論文を審査していただいた帯広畜産大学教授 松井基純先生ならびに准教授 滄木孝弘先生，羽田慎吾先生に深謝いたします。筆者が日高軽種馬農業協同組合に在籍中、本研究を実施するにあたりご助言いただいたエクワインメディカルセンター所長 故大和康夫先生に感謝申し上げるとともに、本研究を手伝って下さった当時の同僚に陳謝いたします。本研究の実施に当たり過去の研究を紹介して下さったアメリカ合衆国ケンタッキー州 Hagyard Equine Hospital の Dr. Michael A. Spirito、また American Association of Equine Practitioners の年次大会での発表や学術論文作成に多大なるご助言をいただいた Rood and Riddle Equine Hospital の故 Dr. Michelle M. LeBlanc ならびにカリフォルニア大学 Davis 校 Dr. Irwin K. M. Liu に深く感謝申し上げます。

## Summary

Because of the high individual economic value of Thoroughbred horses, it is significant to improve their productivity. Although the fertility rate has been improved as the technology for diagnosing and treating reproductive diseases was progressed year by year, infertility of unknown causes is still encountered.

The ovaries and uterus of mares are relatively easy to approach, therefore, the diagnosis methods, especially ultrasonography, and treatment for infertility caused by the ovaries and uterus have been improved in recent years. On the other hand, clinical diagnosis and therapeutic methods for tubal infertility have not yet been established. This is because the uterotubal junction has a papilla-like structure and is constricted by well-developed smooth muscle in mares, making it anatomically difficult to approach the uterine tubes from the uterine cavity. However, autopsy findings show that collagenous masses are present in the uterine tubes in many cases. It has been suggested that depending on the size of the collagen masses, the patency of the uterine tubes may be impaired and that could be potential cause of infertility. In the past reports, most of researchers have attempted tubal cannulation through the fimbria by invasive methods using laparotomy or laparoscopy for suspected tubal infertility.

Compared to the anatomical structure of the uterine tube in horses, the human uterotubal junction does not have contracted smooth muscle and may open into the uterus, so that it is relatively easy to access into the uterine tube from uterine cavity. In human gynecological medicine, a selective hydrotubation has been established for diagnosing the patency of the uterine tubes by placing a catheter in the tubes under hysteroscopic observation.

In Chapter 2, which follows Chapter 1 (the introduction of this research), a catheter that can be inserted from the uterine cavity into

the uterine tube under endoscopic observation through the working channel of a video endoscope was prepared using a polyethylene tube, an outer tube of an indwelling catheter and a guide wire for human angiography. Then 10 experimental mares were restrained in stocks and sedated, and a video endoscope was inserted into the uterus from the vulva. It was attempted to insert the catheters into the uterotubal junction at both uterine horns and dye was infused into the uterine tubes. After this procedure, abdominal fluid was obtained to identify color of the stain. In addition, a partial incision was made in the vaginal wall and another endoscope was inserted into the abdominal cavity to observe the ovaries, uterine tubes, and surrounding tissue directly. We investigated whether selective hysteroscopic hydrotubation is possible in mares by these procedures. As a result, the created catheter could be inserted into the uterotubal junction with a high probability and the dye solution was observed in the ampula and on surrounding tissue. In addition, peritoneal fluid was stained by the dye solution which could be leaked from the fimbria in some cases. From this result, it was clarified that hydrotubation is possible and this technique could be a potential diagnostic tool for oviductal patency in mares.

In Chapter 3, in 28 mares with unexplained infertility, assuming the cause is that a relatively large gelatin mass presented in the uterine tubes interferes with the passage of sperm and/or fertilized eggs, using the hysteroscopic hydrotubation established in Chapter 2, recovery of the oviductal patency was attempted by pushing the collagenous mass into the peritoneal cavity with flushing saline through the uterine tubes from uterotubal junction. Success with cannulation, pregnancy rate after treatment were researched and it was evaluated that whether this treatment is clinically useful for improving fertility. As a result, catheterization into the uterotubal junction was possible with a high probability regardless of the stage of the estrous cycle, and the conception rate after the

procedure showed a high value regardless of the number of matings that did not lead to conception before the procedure. From this result, it was clarified that the hysteroscopic hydrotubation using saline could remarkably improve the conception rate in infertile mares suspected of having oviduct blockage.

The selective hysteroscopic hydrotubation developed in this research is novel and making it possible to perform non-invasive treatment. In addition, it is significant that the collagenous mass blocking the lumen of the uterine tube could be expelled into the peritoneal cavity from the extremely narrow isthmus through the ampulla which has a relatively large lumen. This study revealed that it will be possible to establish a method that can clinically contribute to the diagnosis and treatment for infertility caused by oviductal patency in mares. It was suggested that in the future, this technique is potential to help to establish oviduct insemination and advanced research for oviduct function. Also, it will contribute to improve production rate of horses.

## 参考文献

- 1: Ricketts, S. and Troedsson, M.H.T. (2007), *In: Current Therapy in Equine Reproduction*, Eds: Samper, J.C., Pycock, J.F. and McKinnon, A.O., Saunders Elsevier, Philadelphia. p. 53-69.
- 2: Hayes, K. E. N., Pierson, R. A., Scraba, S. T., & Ginther, O. J. (1985). Effects of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. *Theriogenology*, 24 (4), 465-77.
- 3: Pycock, J. F. (2011). Ultrasonography. *In: Equine Reproduction, 2<sup>nd</sup> ed.*, Eds: McKinnon, A. O. Squires, L. S. Vaala W. E. and Varner, D. D., Blackwell publishing, West Sussex., p. 1914-21.
- 4: Wilson, G. L. (1983). Hysteroscopic examination of mares. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician*, 78 (4), 568-78.
- 5: Wilson, G. L. (1983). Equine hysteroscopy: a window to the internal reproductive tract [Mares]. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician*, 78 (9), 1455-9, 1462-6.
- 6: Wilson, G. L. (1984). Equine hysteroscopy: normal intrauterine anatomy. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician*, 79 (11), 1388-93.
- 7: Bracher, V. , Mathias, S. and Allen, W. R. (1992), Videoendoscopic evaluation of the mare's uterus: II. Findings in subfertile mares. *Equine Veterinary Journal*, 24: 279-284.
- 8: Blikslager, A. T., TATE Jr, L. P., & Weinstock, D. (1993). Effects of Neodymium: Yttrium Aluminum Garnet Laser Irradiation on Endometrium and on Endometrial Cysts in Six Mares. *Veterinary surgery*, 22 (5), 351-6.
- 9: Griffin, R.L. and Bennet, S.D. (2002). Nd:YAG laser photoablation of endometrial cysts: a review of 55 cases (2000-



- 2001). *Proceedings of the 48th Annual Convention of American Association Equine Practitioners*, p. 58-60
- 10: Traub-Dargatz, J. L., Salman, M. D., & Voss, J. L. (1991). Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198 (10), 1745-47.
- 11: LeBlanc, M. M., & Causey, R. C. (2009). Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 10-22.
- 12: Aguilar, J., Hanks, M., Shaw, D. J., Else, R., & Watson, E. (2006). Importance of using guarded techniques for the preparation of endometrial cytology smears in mares. *Theriogenology*, 66 (2), 423-30.
- 12: Christoffersen, M., Brandis, L., Samuelsson, J., Bojesen, A. M., Troedsson, M. H. T., & Petersen, M. R. (2015). Diagnostic double-guarded low-volume uterine lavage in mares. *Theriogenology*, 83 (2), 222-227.
- 13: Ball, B.A., Shin, S.J., Patten, V.H., Lein, D.H., Woods, G.L. (1988). Use of low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. *Theriogenology*, 29, 1269-83.
- 14: Card, C.E., Carley, S.D., Green, J., Chirino-Trejo, M. (2004) Endometrial cytology in mares bred with frozen semen. *Proceedings of the 50th Annual Conv American Association Equine Practitioners*, p. 505-9.
- 15: Overbeck, W., Witte, T. S., & Heuwieser, W. (2011). Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology*, 75 (7), 1311-1318.
- 16: Ferris, R. A., McCue, P. M., Borlee, G. I., Loncar, K. D., Hennes, M. L., & Borlee, B. R. (2016). In vitro efficacy of nonantibiotic treatments on biofilm disruption of Gram-negative pathogens and an in vivo model of infectious

endometritis utilizing isolates from the equine uterus. *Journal of clinical microbiology*, 54 (3), 631-39.

17: Gores-Lindholm, A. R., LeBlanc, M. M., Causey, R., Hitchborn, A., Fayrer-Hosken, R. A., Kruger, M., ... & Ahlschwede, S. (2013). Relationships between intrauterine infusion of N-acetylcysteine, equine endometrial pathology, neutrophil function, post-breeding therapy, and reproductive performance. *Theriogenology*, 80 (3), 218-27.

18: Witte, T. S., Melkus, E., Walter, I., Senge, B., Schwab, S., Aurich, C., & Heuwieser, W. (2012). Effects of oral treatment with N-acetylcysteine on the viscosity of intrauterine mucus and endometrial function in estrous mares. *Theriogenology*, 78 (6), 1199-208.

19: Ley, W. B., Bowen, J. M., Sponenberg, D. P., & Lessard, P. N. (1989). Dimethyl sulfoxide intrauterine therapy in the mare: effects upon endometrial histological features and biopsy classification. *Theriogenology*, 32 (2), 263-76.

20: Ley, W. B., Ochs, D. L., Metcalf, E. S., Pyle, H., Purswell, B. J., & Bowen, J. M. (1990). Dimethyl sulfoxide intrauterine therapy in the mare: effect upon uterine-derived neutrophil function. *Theriogenology*, 33 (6), 1177-89.

21: Weinstein, W. L., Moore, P. A., Sanchez, S., Dietrich, U. M., Wooley, R. E., & Ritchie, B. W. (2006). In vitro efficacy of a buffered chelating solution as an antimicrobial potentiator for antifungal drugs against fungal pathogens obtained from horses with mycotic keratitis. *American journal of veterinary research*, 67 (4), 562-8.

22: LeBlanc, M. M., McKinnon, A.O. (2011): Breeding the problem mare. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., et al, editors. *Equine Reproduction*. Ames (IA): Wiley-Blackwell

- 23: Ferris, R. (2014): Bacterial endometritis: A focus on biofilm. *Clinical Theriogenology*, 6: 315-9.
- 24: Nielsen, J. M. (2005). Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology*, 64 (3), 510-18.
- 25: Petersen, M. R., Nielsen, J. M., Lehn-Jensen, H., & Bojesen, A. M. (2009). Streptococcus equi subspecies zooepidemicus resides deep in the chronically infected endometrium of mares. *Clinical Theriogenology*, 2009 (1), 393-409.
- 26: Petersen, M. R., Skive, B., Christoffersen, M., Lu, K., Nielsen, J. M., Troedsson, M. H., & Bojesen, A. M. (2015). Activation of persistent Streptococcus equi subspecies zooepidemicus in mares with subclinical endometritis. *Veterinary microbiology*, 179 (1-2), 119-25.
- 27: Hinrichs, K., Kenney, R. M., & Hurtgen, J. P. (1984). Unilateral hydrosalpinx and absence of the infundibulum in a mare. *Theriogenology*, 22 (5), 571-7.
- 28: Hawkins, K. L. (1986). Bilateral salpingitis, hydrosalpinx and oophoritis in a mare. *The Cornell veterinarian*, 76 (1), 38-48.
- 29: Saltiel, A., Paramo, R., Murcia, C., & Tolosa, J. (1986). Pathologic findings in the oviducts of mares. *American journal of veterinary research*, 47 (3), 594-7.
- 30: Henry, M., Vandeplasse, M. (1981). Pathology of the oviduct in mares. *Vlaams Diergeneesk Tijdschr*, 50, 301-25
- 31: Sisson, S. (1975). Female genital organs. In: *Sissons and Grossman's Anatomy of the Domestic Animals*, 5<sup>th</sup> ed, W.B. Saunders, Philadelphia, p 542-9,
- 32: 加藤嘉太郎 (1983) 家畜比較解剖学図説, 養賢堂, 東京, p 398

- 33: Brinsko, S. P., Varner, D. D., & Blanchard, T. L. (1991). The effect of uterine lavage performed four hours post insemination on pregnancy rate in mares. *Theriogenology*, 35 (6), 1111-9.
- 34: Oguri, N., & Tsutsumi, Y. (1972). Non-surgical recovery of equine eggs, and an attempt at non-surgical egg transfer in horses. *Reproduction*, 31 (2), 187-195.
- 35: Betteridge, K. J., Eaglesome, M. D., Mitchell, D., Flood, P. F., & Beriault, R. (1982). Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. *Journal of anatomy*, 135, 191.
- 36: Weber, J. A., & Woods, G. L. (1993). Influence of embryonic secretory chemicals on selective oviductal transport in mares. *Equine Veterinary Journal*, 25 (S15), 36-8.
- 37: van Niekerk, C. H., & Gerneke, W. H. (1966). Persistence and parthenogenic cleavage of tubal ova in the mare. The Onderstepoort journal of veterinary research, 33 (1), 195–232.
- 38: Betteridge, K. J., & Mitchell, D. (1972). Retention of ova by the Fallopian tube in mares. *Journal of reproduction and fertility*, 31 (3), 515.
- 39: Onuma, H., Matsuoka, K., Nakamura, Y., Nakanishi, H. Fujishiro, T. (1972) Intra-oviductal retention of the eggs of mares. Jap. J. vet. Sci. 34, 166-7.
- 40: Steffenhagen, W. P., Pineda, M. H., & Ginther, O. J. (1972). Retention of unfertilized ova in uterine tubes of mares. *American journal of veterinary research*, 33 (12), 2391-8.
- 41: Betteridge, K. J., & Mitchell, D. (1974). Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of the mare. *Reproduction*, 39 (1), 145-8.
- 42: Betteridge, K. J., & Mitchell, D. (1975). A surgical technique applied to the study of tubal eggs in the mare. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, (23), 519-24.

- 43: Onuma, H., & Ohnami, Y. (1975). Retention of tubal eggs in mares. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, (23), 507-11.
- 44: Flood, P. F., Jong, A., & Betteridge, K. J. (1979). The location of eggs retained in the oviducts of mares. *Reproduction*, 57 (2), 291-4.
- 45: Tsutsumi, Y., Suzuki, H., Takeda, T., & Terami, Y. (1979). Evidence of the origin of the gelatinous masses in the oviducts of mares. *Reproduction*, 57 (2), 287-90.
- 46: Saltiel, A., Paramo, R., Murcia, C., & Tolosa, J. (1986). Pathologic findings in the oviducts of mares. *American journal of veterinary research*, 47 (3), 594-7.
- 47: G: Lantz, K. C., Enders, A. C., & Liu, I. K. (1998). Possible significance of cells within intraluminal collagen masses in equine oviducts. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 252 (4), 568-79.
- 48: Liu, I. K. M., Lantz, K. C., Schlafke, S., Bowers, J. M., & Enders, A. C. (1990). Clinical observations of oviductal masses in the mare. In *Proceedings of the 36th annual convention of the American Association of Equine Practitioners*, p 41-5
- 49: Bennett, S. D., Griffin, R. L., & Rhoads, W. S. (2002) Surgical evaluation of oviduct disease and patency in the mare. In *Proceedings of the 48th convention of the American Association of Equine Practitioners*, p. 347-9.
- 50: Ferguson I.L.C. (1982) Laparoscopic investigation of tubal infertility. In: *Tubal Infertility: Diagnosis and Treatment*, Eds: G. Chamberlain and R. Winston, Blackwell Scientific Publications, Oxford. p 30-46.
- 51: Fortier, K. J. and Haney, A. F. (1985) The Pathologic Spectrum of Uterotubal Junction Obstruction. *Obstetrics and Gynecology*. 65. 93-8

- 52: Eddy, C. A., & Pauerstein, C. J. (1980). Anatomy and physiology of the fallopian tube. *Clinical obstetrics and gynecology*, 23 (4), 1177-94.
- 53: Suarez, S.S. and Pacey, A.A. (2006) Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum. Reprod. Update* 12. 23-37
- 54: Kothari, B., Renton, J. P., Munro, C. D., & Macfarlane, J. (1978). Use of the phenolsulphonphthalein dye test for fallopian tube patency in cattle. *The Veterinary record*, 103 (11), 229-32.
- 55: Kessy, B. M., & Noakes, D. E. (1979). The use of the starch grain and phenolsulphonphthalein tests to investigate infertile cows. *The Veterinary record*, 105 (21), 489-91.
- 56: Kelly, E. F., Renton, J. P., & Munro, C. D. (1981). Assessment of oviduct potency in the cow. *The Veterinary record*, 108 (16), 357-60.
- 57: Yániz, J. L., Lopez - Gatius, F., Santolaria, P., & Mullins, K. J. (2000). Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 260 (3), 268-78.
- 58: Menezo, Y., & Guerin, P. (1997). The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. *European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology*, 73 (1), 99-104.
- 59: Kainer, R. A. (1993) Reproductive organs of the mare. In: *Equine Reproduction*. Eds: A. O. McKinnon and J.L. Voss. Lea and Febiger. Philadelphia., pp5-19
- 60: 武谷雄二：女性不妊．新女性医学体系 1998；14-23、日本受精着床学会・倫理委員会：日受精着床学会誌 2004；21:6-14
- 61: Dun, E. C., & Nezhat, C. H. (2012). Tubal factor infertility: diagnosis and management in the era of assisted reproductive technology. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*, 39 (4), 551-66.

- 62: Liu, I. K. M. (2011) Disorders of the oviduct. In: *Equine Reproduction 2<sup>nd</sup> ed.* Eds: A. O. McKinnon, E. L. Squire, W. E. Vaala, D. D. Varner. Blackwell Publishing. Philadelphia., p 2692-6.
- 63: Hinrichs, K., Kenney, R. M., & Hurtgen, J. P. (1984). Unilateral hydrosalpinx and absence of the infundibulum in a mare. *Theriogenology*, 22 (5), 571-7.
- 64: Hawkins, K. L. (1986). Bilateral salpingitis, hydrosalpinx and oophoritis in a mare. *The Cornell veterinarian*, 76 (1), 38-48.
- 65: Kenney, R. M. (1993). A review of the pathology of the equine oviduct. *Equine Veterinary Journal*, 25 (S15), 42-6.
- 66: Bennett, S. (2007) Diagnosis of oviductal disorders and diagnostic techniques. In: *Current therapy in Equine Reproduction*. Eds: J. Samper, J. Pycock and A. McKinnon, Saunders Elsevier, St Louis. p 78-82.
- 67: Köllmann, M., Rötting, A., Heberling, A., & Sieme, H. (2011). Laparoscopic techniques for investigating the equine oviduct. *Equine veterinary journal*, 43 (1), 106–11.
- 68: Allen, W. E., Kessy, B. M., & Noakes, D. E. (1979). Evaluation of uterine tube function in pony mares. *The Veterinary record*, 105 (16), 364–6.
- 69: Ley, W. B., Brown, J. M., Purswell, B. J., Dascanio, J. J., Arker, N.A., Baily, T. L., DiGrassie, W. A. (1998) Modified technique to evaluate uterine tubal function in the mare. *Proceedings of the 44th Annual Convention of American Association of Equine Practitioners*, p 56-59
- 70: Allen, W. R., Wilsher, S., Morris, L., Crowhurst, J. S., Hillyer, M. H., & Neal, H. N. (2006). Laparoscopic application of PGE2 to re-establish oviducal patency and fertility in infertile mares: a preliminary study. *Equine veterinary journal*, 38 (5), 454–9.



- 71: Ortis, H. A., Foss, R. R., McCue, P. M., Bradecamp, E. A., Ferris, R. A., & Hendrickson, D. A. (2013). Laparoscopic application of PGE2 to the uterine tube surface enhances fertility in selected subfertile mares. *Journal of equine veterinary science*, 33 (11), 896-900.
- 72: Weber, J. A., & Woods, G. L. (1993). Influence of embryonic secretory chemicals on selective oviductal transport in mares. *Equine Veterinary Journal*, 25 (S15), 36-38.
- 73: W2: Weber, J. A., Woods, G. L., & Lichtenwalner, A. B. (1995). Relaxatory effect of prostaglandin E2 on circular smooth muscle isolated from the equine oviductal isthmus. *Biology of Reproduction*, 52 (monograph\_series1), 125-130.
- 74: X: Zent, W. W., Liu, I. K. M., Spirito, M. (1993) Oviductal flushing as a treatment for infertility in the mare., *Equine Veterinary Journal, Suppl. 15*, 47-48.
- 75: Lei, Z. W., Xiao, L., Xie, L., Li, J., & Chen, Q. X. (1991). Hysteroscopic hydrotubation for treatment of tubal blockage. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 34 (1), 61-64.
- 76: Baramki, T. A. (2005). Hysterosalpingography. *Fertility and sterility*, 83(6), 1595-1606.
- 77: Simpson Jr, W. L., Beitia, L. G., & Mester, J. (2006). Hysterosalpingography: a reemerging study. *Radiographics*, 26(2), 419-431.
- 78: Siegler, A. M. (1983). Hysterosalpingography. *Fertility and sterility*, 40(2), 139-158.
- 79: World Health Organization. (1986). Comparative trial of tubal insufflation, hysterosalpingography, and laparoscopy with dye hydrotubation for assessment of tubal patency. *Fertility and Sterility*, 46(6), 1101-1107.
- 80: Adelusi, B., Al-Nuaim, L., Makanjuola, D., Khashoggi, T., Chowdhury, N., & Kangave, D. (1995). Accuracy of

hysterosalpingography and laparoscopic hydrotubation in diagnosis of tubal patency. *Fertility and sterility*, 63(5), 1016-1020.

81: Miyazaki, T., Kobayashi, T., Kuji, N., Gabionza, D. T., Sueoka, K., Natori, M., & Nozawa, S. (1995). Evaluation of the radiologic findings on hysterosalpingography by selective hydrotubation with flexible hysterofiberscope. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 12(6), 369-374.

82: Gordts, S., Campo, R., Rombauts, L., & Brosens, I. (1998). Transvaginal hydrolaparoscopy as an outpatient procedure for infertility investigation. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(1), 99-103.

83: Arnold, C. E. and Love, C. C. (2011). Laparoscopic evaluation of oviductal patency in the standing mare. *Proceedings of the 57th Annual Convention of American Association Equine Practitioners*, p 233

84: Alvarenga, M. and Segabinazzi, L. (2018). Application of misoprostol as a treatment of unexplained infertility in mares. *Journal of equine veterinary science*, 71, 46-50.

85: Li, S. C., Liu, M. N., Hu, X. Z., & Lu, Z. L. (1994). Hysteroscopic tubal catheterization and hydrotubation for treatment of infertile women with tubal obstruction. *Chinese medical journal*, 107(10), 790-793.

86: 神野正雄, 生方良延, 佐藤学, 勝又木綿子, 吉村泰典, 中村幸雄 (1995) 卵管通気検査の改良:超音波断層法併用と子宮鏡下選択的通気の試み. 産婦人科マイクロサージャリー学会雑誌, 8 (1), 51-4.

87: 田口泰之, 石塚文平, 堀越裕史, 丸岡充, 浜田宏 (1989) 卵管疎通性検査 -超音波による-. 産科と婦人科, 4 (56), 809-12.

88: 石塚文平, 堀越裕史, 松本一彦, 平井邦彦, 雨宮章, 永江学 (1994) カラードプラを利用した卵管疎通性検査, 11 (61), 1590-6.

- 89: 大野洋介, 岡田弘二, 藤本泰子, 石川睦男, 玉手健一, 佐藤和雄, 正岡直樹, 武谷雄二, 梁善光, 野澤志朗, 宮崎豊彦, 濱田宏, 石塚文平, 堀越裕史, 藤井明和, 鈴木隆弘, 谷澤修, 佐治文隆, 大橋一友, 野田起一郎, 星合昊, 堀井高久, 猿渡善治, 中野仁雄, 佐野正敏, 佐藤昌司, 米虫節夫 (1994) 超音波断層撮影における SH/TA-508 の第 II 相試験. 産科と婦人科, 11 (62), 1647-59.
- 90: 浅井光興, 前田桂子, 正橋鉄夫, 野口昌良, 中西正美 (1996) 子宮鏡下選択的卵管造影. 産科と婦人科, 1 (63), 17-21.
- 91: Ginther O. J. (1992) In: Reproductive biology of the mare 2nd ed., Equiservices, Wisconsin. pp 555-556.