

石川畜試研報
Bull.Ishikawa Pref.List.
Res.Center

ISSN 1347-913X

Bulletin
of the
Ishikawa Prefectural.Agriculture And Forestry Research Center
Livestock Experiment Station
No. 49
December-2020

石川県農林総合研究センター 畜産試験場研究報告

第49号

令和2年12月

石川県農林総合研究センター
畜産試験場

石川県羽咋郡宝達志水町坪山

Ishikawa Prefectural.Agriculture And Forestry Research Center
Livestock Experiment Station
Hodatsushimizu,Ishikawa,Japan

石川県農林総合研究センター畜産試験場研究報告

第49号

令和2年12月

目 次

1. 乳用種泌乳牛における黄体血流量の受卵牛選定指標としての有用性の検討
..... 1

乳用種泌乳牛における黄体血流量の 受卵牛選定指標としての有用性の検討

谷田孝志, 向野逸郎

石川県農林総合研究センター畜産試験場

Evaluation of Usefulness of Luteal Blood Flow for Selection of Recipients for
Embryo Transfer in Lactating Dairy Cows

Takashi Tanida, Itsuro Mukono

キーワード：黄体血流, 受精卵移植, 受卵牛, 乳用種泌乳牛

要約

乳用種泌乳牛を対象に、黄体血流量の受卵牛選定指標としての有用性を調査した。受精卵移植時の黄体の大きさに関する指標 [黄体直径, 黄体断面積, 黄体組織面積 (黄体断面積-内腔断面積)], 黄体血流面積, 黄体血流の分布範囲に関する指標 {黄体血流面積割合 [黄体血流面積/黄体組織面積×100 (%)], 黄体血流周囲割合 [黄体周囲に分布する血流の長さ/黄体周囲の長さ×100 (%)]} および血漿中プロゲステロン (P4) 濃度について受胎の予測を目的とした ROC 曲線を作成した結果、黄体血流面積が最も優れた診断能を有し、受卵牛選定指標として有用であることが示唆された。また、黄体血流面積と他の指標との関係を調査した結果、黄体血流面積が大きい牛の黄体の大きさおよび黄体血流の分布範囲に関する指標は、黄体血流面積が小さい牛と比べて有意に高く、黄体血流面積の大きさは黄体の大きさおよび黄体血流の分布範囲と関係することが示唆されたが、血漿中 P4 濃度との間に関係性は認められなかった。

I 緒論

乳用種雌牛に対する受精卵移植は子牛の生産に利用される繁殖技術の一つであるが、乳用種泌乳牛は未経産牛と比べて胚死滅が起こりやすい (片桐 2018)。そのため、受精卵移植により、乳用種泌乳牛から効率的に産子を生み出すためには、移植を実施する前に、受卵牛の受胎能を評価することができる手段が必要となる。受精卵が子宮内で発育するためには、卵巣中の黄体組織から分泌されたプロゲステロン (P4) が何らかの循環を介して子宮に到達し、子宮内の環境を妊娠に適した状態に調節する必要があると考えられている (Lonergan ら 2016)。また、超音波検査で評価された黄体断面積は P4 の血漿中濃度や黄体組織中の

濃度と正の相関があることが報告されている (Kastelic ら 1990, Assey ら 1993)。そのため、黄体の P4 の分泌能を予測するために、直腸検査や超音波検査で黄体の大きさを評価して、受卵牛の選定に利用してきた (岩田ら 2009, 村上と安達 1994)。岩田ら (2009) は、移植可能な受精卵移植時の黄体直径は、未経産牛の場合は 1 cm 以上、経産牛の場合は 1.5 cm としている。また乳用牛においては、直腸検査において、受精卵移植前日に直径が 2.0 cm 以上の黄体を有すると判断された牛は 1.5cm 程度の黄体を有すると判断された牛より受胎率が高いことが報告されている (村上と安達 1994)。

一方近年、新たな受卵牛選定指標として、超音

波診断機器のカラー Doppler 機能を用いて評価される黄体血流量による指標が提案されている (Kanazawa ら 2016, 金澤 2017, Pugliesi ら 2019). 乳用種泌乳牛においては, 受精卵移植時において直径が 2.0 cm 以上の黄体を有する牛を対象にした場合, 黄体血流量の評価項目の 1 つである黄体血流面積が, 血漿中 P4 濃度, 黄体断面積および黄体組織面積よりも受卵牛選定指標として優れると報告されている (Kanazawa ら 2016, 金澤 2017). また, 肉用牛においては, 黄体組織面積に占める黄体血流面積の割合が受卵牛選定指標として提案されており, 受精卵移植時に本指標が小さい黄体を有する牛は, 黄体血流面積が小さく, 黄体周囲の血流分布が少なく, 受胎能が低いことが報告されている (Pugliesi ら 2019). しかし, 乳用種泌乳牛においては, 黄体血流の分布範囲に関する指標 (黄体組織面積や黄体周囲の長さに対する黄体血流の分布割合) の受卵牛選定に対する有用性や, 黄体血流面積と黄体の大きさに関する指標 (黄体直径, 黄体断面積および黄体組織面積), 黄体血流の分布範囲に関する指標および血漿中 P4 濃度との関係についての報告はほとんどない.

そこで本試験では, 乳用種泌乳牛を対象として, 黄体血流面積および黄体血流の分布範囲に関する指標の受卵牛選定における有用性を検証した. また, 黄体血流面積と黄体の大きさや黄体血流の分布範囲に関する指標および血漿中 P4 濃度との関係を調査した.

II 材料および方法

1. 供試牛

2019 年 8 月から 10 月および 2019 年 2 月から 2020 年 8 月に石川県内の 1 酪農家で飼養されていたホルスタイン種泌乳牛 26 頭 (初産: 5 頭, 2 産以上: 21 頭) を実験に供試した. これらの牛は, 自然発情または排卵誘起後 7 日目に, 直腸検査および超音波画像診断で, 黄体が 1 つのみ観察され, 生殖器 (卵巣・子宮) に異常がみられず, 臨床的に健

康な牛であった. 供試牛の分娩後日数は 161.73 ± 17.78 日 (平均値 \pm 標準誤差), 産次数は 3.27 ± 0.34 であった.

2. 方法

2. 1. 排卵同期化

供試牛 23 頭には, 黄体期の任意の時期に排卵同期化を実施した. すなわち, 排卵誘起の 9 日前にプロゲステロン腔内徐放製剤 (シダー 1900, ソエティス・ジャパン, 東京) を腔内に挿入し, 酢酸フェルチレリン (GnRH; フェルチレリン注, フジタ製薬, 東京) を 100 μ g, もしくはエストラジオール安息香酸エステル (エストラジオール注「KS」, 共立製薬, 東京) を 2mg 筋肉内投与した. 排卵誘起 2 日前にクロプロステノール (クロプロステノール C, フジタ製薬) を 500 μ g 筋肉内投与し, プロゲステロン腔内徐放製剤を抜去した. そして排卵誘起当日に GnRH を 100 μ g 筋肉内投与した.

2. 2. 黄体所見の評価

黄体所見の評価は, 受精卵移植当日である排卵誘起または自然発情後 7 日目にリニア型プローブ (SV3513, esaote, マーストリヒト, オランダ) を接続した携帯型超音波画像診断装置 (MyLab One Vet, esaote) を用いて, B モード (10 MHz, GAIN 70-90%) および CFM モード (5.0 MHz, GAIN 50%) で直腸越しに実施した. 評価項目として, 黄体の大きさに関する各指標 [黄体直径: (黄体長径 + 短径) / 2, 黄体断面積, 黄体組織面積: 黄体断面積 - 内腔断面積], 黄体血流面積, 黄体血流の分布範囲に関する指標 [黄体血流面積割合: 黄体血流面積 / 黄体組織面積 \times 100 (%), 黄体血流周囲割合: 黄体周囲に分布する血流の長さ / 黄体周囲の長さ \times 100 (%)] を測定した. これらすべての項目は黄体断面積が最大と思われる断面で静止画を撮影し評価した. 黄体長径, 黄体短径, 黄体断面積, 黄体組織面積, 黄体周囲に分布する血流の長さおよび黄体周囲の長さは MyLab One Vet の CALIPER 機能を用いて測

定した。黄体血流面積は超音波画像を超音波診断装置から抽出し、パソコン上に取り込んだのち、カラー表示された血流部分の面積を画像解析ソフト Image J (NIH, メリーランド, 米国) を用いて算出した (図 1, 図 2)。

2. 3. 血液採取および血漿中 P4 濃度測定

排卵誘起または自然発情後 7 日目の黄体所見観察後に、供試牛の尾静脈もしくは頸静脈からヘパリン入り真空採血管 (ベノジェクト II 真空採血管: テルモ, 東京, 日本) に血液を採取した。採取した血液はただちに氷冷し, 4°C, 3000rpm (1551G), 30 分の条件下で遠心し, 血漿を分離した。分離された血漿はプロゲステロンを測定するまで, -80°C 下で凍結保存した。

血漿中プロゲステロン濃度は外部の検査機関に測定を依頼し, 電気化学発光免疫測定法 (ECLIA 法) にて実施した。

2. 4. 受精卵移植

排卵誘起または自然発情後 7 日目の黄体所見観察および血液採取後に、供試牛に対し市販凍結体内胚 (JA 全農 ET 研究所, 北海道) を 1 卵移植した。胚の融解方法は受精卵の供給元の融解方法に従った。受精卵は深部注入器 (モ 4 号: ミサワ医科工業, 茨城) を用いて黄体側子宮角の深部に移植した。

3. 統計処理

受胎を予測内容として, 黄体直径, 黄体断面積, 黄体組織面積, 黄体血流面積, 黄体血流面積割合, 黄体血流周囲割合および血漿中 P4 濃度のそれぞれについて縦軸に感度を横軸に 1-特異度を取った ROC 曲線を作成し, 曲線下面積 (AUC) を算出した。また, AUC の 95% 信頼区間を算出し, その区間内に 0.5 を含まない場合に有意なモデルとし, 診断能を有するとした。さらに, カットオフ値を, 感度が 1 および特異度が 1 である場合の点からの距離が最も短い ROC 曲線上の点を示す値として選定し, その時の感度および特異度を算出した。また, 各評価項目について, 供試牛をカットオフ値以上および未満の 2 群に分け, 両群の受胎率を算出した。各群の受胎率はフィッシャーの正確確率検定を用いて比較した。

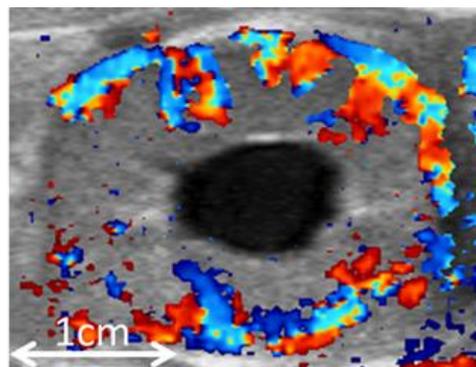
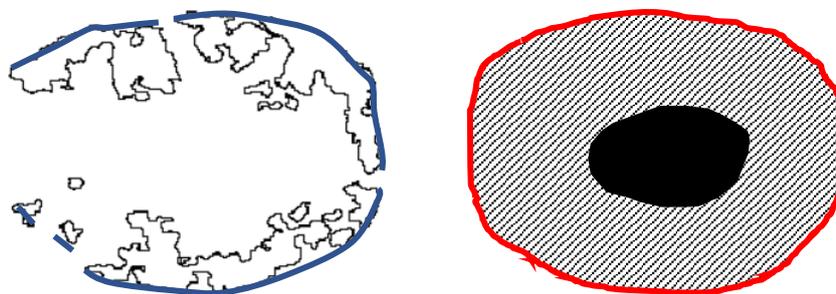


図 1: 黄体周囲に観察される黄体血流 (カラーで表示された領域)



□: 黄体血流面積 (cm²), ▨: 黄体組織面積 (cm²), ■: 内腔断面積 (cm²)
 黄体断面積 (cm²) = 黄体組織面積 + 内腔断面積
 黄体血流面積割合 (%) = 黄体血流面積 / 黄体組織面積 × 100
 黄体血流周囲割合 (%) = 黄体周囲に分布する血流の長さ (—) / 黄体周囲の長さ (—) × 100

図 2: 黄体所見の評価項目 (図 1 の画像を例とした場合)

表 1: 各評価項目の受胎を予測内容とした ROC 曲線の AUC とカットオフ値を基準とした感度および特異度

評価項目 (単位)	AUC (95%信頼区間)	カットオフ値	感度	特異度
黄体血流面積 (cm ²)	0.80 (0.62-0.98)	0.93	0.75	0.88
黄体血流面積割合 (%)	0.72 (0.52-0.93)	26.0	0.75	0.67
黄体直径 (cm)	0.58 (0.31-0.86)	1.98	0.75	0.44
血漿中P4濃度 (ng/ml)	0.56 (0.34-0.79)	3.01	0.75	0.61
黄体血流周囲割合 (%)	0.55 (0.32-0.78)	54.3	0.75	0.57
黄体断面積 (cm ²)	0.57 (0.32-0.83)	2.93	0.88	0.39
黄体組織面積 (cm ²)	0.60 (0.36-0.85)	2.93	0.88	0.39

黄体血流面積と、黄体直径、黄体断面積、黄体組織面積、黄体血流面積割合、黄体血流周囲割合および血漿中 P4 濃度との関係を調査するため、黄体血流面積について、得られたカットオフ値を基準として、供試牛をカットオフ値以上および未満の 2 群に分け、両群の黄体直径、黄体断面積、黄体組織面積、黄体血流面積割合、黄体血流周囲割合および血漿中 P4 濃度の平均値を Student の t 検定で比較した。

結果はすべて平均値±標準誤差で記載した。統計処理は、R (R Foundation for Statistical Computing, ウィーン, オーストリア) のグラフィカルユーザーインターフェースである EZR (埼玉医療インター, 自治医科大学, 埼玉) を用いて実施した (Kanda 2013)。統計処理の結果、 $p < 0.05$ であった場合は有意な結果とし、 $p < 0.1$ の場合は傾向ありとした。

Ⅲ 結果

受胎を予測内容とした ROC 曲線の AUC の 95% 信頼区間が 0.5 を含まない評価項目の中で、AUC、感度および特異度が最も高かったのは黄体血流面積であり、次いで黄体血流面積割合であった (表 1)。

その他の評価項目については、AUC の 95% 信頼区間に 0.5 を含んでいた。

黄体血流面積について、供試牛をカットオフ値 (0.93 cm²) 以上および未満の 2 群に分け、両群の受胎率を算出したところ、カットオフ値以上であった群の受胎率がカットオフ値未満であった群と比べて有意に高値であった (表 2)。また、黄体血流面積割合について、供試牛をカットオフ値 (26.0%) 以上および未満の 2 群に分け、両群の受胎率を算出したところ、カットオフ値以上であった群の受胎率がカットオフ値未満であった群と比べて高値である傾向がみられた。その他の評価項目については、カットオフ値以上であった群と未満であった群の受胎率に有意な差は認められず、傾向も認められなかった。

黄体血流面積がカットオフ値以上であった群の黄体直径、黄体断面積、黄体組織面積、黄体血流面積割合および黄体血流周囲割合は、カットオフ値未満であった群に比べて有意に高値であった。一方、両群間の血漿中 P4 濃度に差は認められなかった (表 3)。

表 2 : 各評価項目の受胎を予測内容とした ROC 曲線のカットオフ値を基準とした受胎率

評価項目(単位)	カットオフ値	受胎頭数	不受胎頭数	受胎率(%)	
黄体血流面積 (cm ²)	0.93	以上	6	3	66.7
		未満	2	15	11.8
黄体血流面積割合 (%)	26.0	以上	6	6	50.0
		未満	2	12	14.3
黄体直径 (cm)	1.98	以上	6	10	37.5
		未満	2	8	20.0
血漿中P4濃度 (ng/ml)	3.01	以上	6	7	46.2
		未満	2	11	15.4
黄体血流周囲割合 (%)	54.3	以上	6	8	42.9
		未満	2	10	16.7
黄体断面積 (cm ²)	2.93	以上	7	11	38.9
		未満	1	7	12.5
黄体組織面積 (cm ²)	2.93	以上	7	11	38.9
		未満	1	7	12.5

a, b: 異符号間で有意差あり (p<0.05). A, B: 異符号間で傾向あり (p<0.1)

表 3: 黄体血流面積の大小と黄体の大きさ, 黄体血流の分布範囲および血漿中 P4 濃度

評価項目(単位)	黄体血流面積	
	カットオフ値* 以上	カットオフ値 未満
黄体直径(cm)	2.41±0.11 ^a	1.99±0.07 ^b
黄体断面積(cm ²)	4.60±0.43 ^a	3.27±0.20 ^b
黄体組織面積(cm ²)	4.39±0.40 ^a	3.10±0.27 ^b
黄体血流面積割合(%)	32.5±3.17 ^a	18.2±2.70 ^b
黄体血流周囲割合(%)	65.4±3.67 ^a	44.4±4.92 ^b
血漿中 P4 濃度(ng/ml)	3.31±0.17	2.80±0.40

*黄体血流面積のカットオフ値は 0.93 cm²
平均値±標準誤差, a, b: 同行異符号間で有意差あり (p<0.01)

IV 考察

受胎を予測する診断能を有し, 最も高い AUC, 感度および特異度を有した評価項目は黄体血流面積であった。また, 黄体血流面積がカットオフ値以上であった牛の受胎率がカットオフ値未満であった牛と比べて有意に高値であった。このことから, 今回検討した評価項目の中では, 黄体血流面積が乳用種泌乳牛の受卵牛選定指標として最も適することが示唆された。乳用種泌乳牛の受卵牛選定指標として, 血液中の P4 濃度および黄体断面積よりも黄体血流面積のほうが有用であることは過去に報告されており(金澤ら 2016), 今回の結果はこの報告を支持する結果となった。また, 黄体血流の分布

範囲に関する指標については, 肉用牛では受卵牛の選定指標として有用であることが報告されている(Pugliesi ら 2019) が, 乳用種泌乳牛に対しては不明であった。しかし今回の結果から, 乳用種泌乳牛においても, 黄体血流面積割合は受卵牛の選定指標として有用である一方, 黄体血流面積の方がより有用な指標であることが示唆された。黄体血流面積が大きい牛の受胎率が高くなる理由として, 黄体の高い血管形成が黄体への栄養や P4 の基質供給量を増加させ, 局所循環を介して黄体側の子宮角の P4 濃度を増加させるためと推測されている(金澤ら 2016)。また, 胚の栄養膜から分泌されるインターフェロンタウ (IFN- τ) は子宮内膜のプロスタグランジン F2 α (黄体退行因子) /プロスタグランジン E2 (黄体刺激因子) 産生比を高め, 黄体のプロスタグランジン F2 α に対する感受性を低下させる(高橋 2012) ことから, 黄体血流面積が大きい牛の場合, 子宮内の胚から分泌された IFN- τ の局所循環を介した黄体への供給が行われやすく, その結果黄体機能が持続し, 妊娠が維持される可能性がある。

黄体血流面積がカットオフ値以上であった群は未満であった群と比べて, 黄体の大きさおよび黄

体血流の分布範囲に関する指標がすべて高値であった。このことから、乳用種泌乳牛において受精卵移植時の黄体血流面積が小さい黄体は、黄体の大きさに関する指標、または、黄体血流の分布範囲に関する指標が低値の黄体であることが示唆された。受精卵移植日前日の黄体直径が小さい牛の受精卵移植の受胎率は低いことは過去に報告されている（村上と安達, 1994）が、その要因の一つとして、黄体直径が小さい黄体は黄体血流面積も小さいために受胎率が低値を示したのではないかと思われた。一方、黄体血流面積がカットオフ値以上であった群と未満であった群の血漿中 P4 濃度に有意な差や傾向は認められなかった。Pugliesi ら (2019) は肉用牛において、受精卵移植時の黄体血流面積割合が小さい個体の黄体血流面積は小さく、血清中 P4 濃度は低いことを報告している。それに対して Bollwein ら (2013) は泌乳牛の黄体中期（発情後 12-15 日）において、血漿中 P4 濃度は主に黄体の大きさに依存し、黄体血流面積割合に依存しないが、黄体組織中 P4 濃度は黄体血流面積割合と関連するとし、血漿中 P4 濃度が低い牛の黄体機能は必ずしも低下していないとしている。今回の結果は後者の報告を支持する結果になっており、乳用種泌乳牛においては、受精卵移植時の黄体血流面積と血漿中 P4 濃度の関連性は低いことが示唆された。泌乳牛では泌乳による摂食量の増加に伴い、肝臓における血液循環量が増加して P4 代謝が高まる結果、非泌乳牛と比べて血液中の P4 の量が低下するとされている (Wiltbank ら 2014)。そのため、泌乳牛の血液中の P4 濃度は黄体からの P4 分泌量を必ずしも反映していないと考えられる。本調査においても、血漿中 P4 濃度が黄体からの P4 分泌量を反映していなかった可能性がある。

これらのことから、乳用種泌乳牛における受卵牛の選定指標として、黄体血流面積が有用であり、受胎率と関係することが検証された。また、黄体血流面積の大きさは、黄体の大きさまたは黄体血流の分布範囲と関係することが示唆された。

V 謝辞

供試牛を提供してくださった株式会社ホリ牧場代表取締役堀達夫氏および従業員の方々、関係者に感謝を申し上げます。

VI 引用文献

- Assey RJ, Purwantara B, Greve T, Hyttel P, Schmidt M. 1993. Corpus luteum size and plasma progesterone levels in cattle after cloprostenol-induced luteolysis. *Theriogenology* 39, 1321-1330.
- Bollwein H, Lüttgenau, Herzog K. 2013. Bovine luteal blood flow: basic mechanism and clinical relevance. *Reproduction, Fertility and Development* 25, 71-79.
- 岩田尚孝, 牛島仁, 後藤太一, 砂川政広, 平田統一, 鬼頭武資, 古舘誠. 2009. 受精卵移植技術実践マニュアル Q&A 集. 社団法人家畜改良事業団家畜バイオテクセンター, 東京.
- 金澤朋美. 2017. 超音波カラードブラを用いた黄体血流量の評価と胚移植への応用. *臨床獣医臨時創刊号* 35, 45-48.
- Kanazawa T, Seki M, Ishiyama K, Kubo T, Kaneda Y, Sakaguchi M, Izaike Y, Takahashi T. 2016. Pregnancy prediction on the day of embryo transfer (Day 7) and Day 14 by measuring luteal blood flow in dairy cows. *Theriogenology* 86, 1436-1444.
- Kanda Y. 2013. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplantation* 48, 452-458.
- Kastelic J, Bergfelt D, Ginther O. 1990. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology* 33, 1269-1278.
- 片桐成二. 2018. 牛の受精卵の着床過程と早期胚

- 死滅. 臨床獣医 臨時創刊号 36, 82-89.
- Lonergan P, Forde N, Spencer T. 2016. Role of progesterone in embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 28, 66-74.
- 村上司, 安達善則. 1994. 牛の胚移植における黄体と卵胞の共存する例および囊腫様黄体形成例の受胎牛としての適応性. *Journal of Reproduction and Development* 40, j81-j86.
- Pugliesi G, Dalmaso de Melo G, Silva J, Carvalhêdo A, Lopes E, De Siqueira Filho E, Silva LA, Binelli M. 2019. Use of color-Doppler ultrasonography for selection of recipients in timed-embryo transfer programs in beef cattle. *Theriogenology* 135, 73-79
- 高橋芳幸. 2012. 第5章交配・受精・着床, 3. 胚発生と着床. 中尾敏彦, 津曲茂久, 片桐成二編, 獣医繁殖学第4版, pp. 150-161. 文永堂, 東京.
- Wiltbank MC, Souza AH, Carvalho PD, Cunha AP, Giordano JO, Fricke PM, Baez GM, Diskin MG. 2014. Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. *Animal* 8 (Supplement), 70-81.