

ウマにおける胎子検査法および
抗ミューラー管ホルモンを用いた性腺異常の診断
に関する研究

2015年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

村 瀬 晴 崇

目次

緒言	1
日本における軽種馬生産の現状	1
妊娠期の損耗.....	1
胎子検査.....	2
ウマの卵巢腫瘍	3
顆粒膜細胞腫.....	3
顆粒膜細胞腫の診断.....	4
ウマの潜在精巣	4
潜在精巣.....	5
ウマにおける去勢	5
騏馬と潜在精巣馬の鑑別.....	6
抗ミューラー管ホルモン	7
本研究の目的.....	8
図表	10
第1章 コンベックス型探触子を用いたウマ胎子超音波検査	17
1-1 背景と目的	18
1-2 材料と方法	20
1-3 結果	23
1-4 考察	25
1-5 図表	30
第2章 真菌性胎盤炎の1症例におけるモニタリング指標の推移	35
2-1 背景と目的	36

2-2	材料と方法	37
2-3	結果	40
2-4	考察	42
2-5	図表	45
第3章	抗ミューラー管ホルモン測定によるウマ顆粒膜細胞腫の診断	53
3-1	背景と目的	54
3-2	材料と方法	56
3-2-1	ヒト用 AMH 測定系のウマへの応用性	56
3-2-2	正常馬, GCT 馬および類似疾患馬の血中 AMH 濃度	57
3-2-3	GCT 馬における卵巣摘出術後の血中 AMH 濃度の推移	58
3-2-4	正常および GCT 卵巣における AMH, AMHR2 免疫組織化学的局在	59
3-3	結果	60
3-2-1	ヒト用 AMH 測定系のウマへの応用性	60
3-3-2	正常馬, GCT 馬および類似疾患馬の血中 AMH 濃度	60
3-3-3	GCT 馬における卵巣摘出術後の血中 AMH 濃度の推移	60
3-3-4	正常および GCT 卵巣における AMH, AMHR2 免疫組織化学的局在	60
3-4	考察	61
3-5	図表	64
第4章	抗ミューラー管ホルモン測定による片側性ウマ潜在精巣の診断	70
4-1	背景と目的	71
4-2	材料と方法	72
4-2-1	正常馬, HCUC 馬, 騏馬の血中 AMH 濃度	72

4-2-2	正常馬における去勢術後の血中 AMH 濃度の推移.....	73
4-2-3	正常精巣および潜在精巣における AMH の免疫組織化学的局在	73
4-3	結果	75
4-3-1	正常馬, HCUC 馬, 騮馬の血中 AMH 濃度	75
4-3-2	正常馬における去勢術後の血中 AMH 濃度の推移.....	75
4-3-3	正常精巣および潜在精巣における AMH の免疫組織化学的局在	75
4-4	考察	76
4-5	図表	78
	総括	81
	謝辞	83
	引用文献.....	84

緒言

日本における軽種馬生産の現状

妊娠期の損耗

国内軽種馬の受胎率および生産率は、近年 80%、72%ほどで推移しており、(図 1)、流死産を示唆する妊娠期の損耗が繁殖馬頭数の約 8%生じていることが伺える。諸外国の報告によると、シーズン妊娠率は 85-92%(19, 21)、出産率は 69-79%(4, 19, 21)であり、やはりその間には 10%程度の差がある。また、国内馬産地である北海道日高地方で行われた大規模調査の結果によると、受胎したウマのうち 5 週目までに妊娠喪失する早期胚死滅率 *early embryo loss* が 6.0%、さらにその後出産に至らない胎子喪失率が 7.0%であり、これらによる損耗率は妊娠馬全体の 13.1%であった(120)。このような妊娠期の損耗は、1 頭当たりの経済的価値が高く、小規模経営の多い競走馬生産においては大きな問題となる。

ウマの流死産原因については、日本、アメリカ、そしてイギリスで報告されている(2, 39, 99)。いずれの報告においても感染性より非感染性が多い(図 2)。非感染性流産の原因は臍帯の捻転や虚血を伴う過長など臍帯異常が多く、他に胎盤異常、双胎などが知られている(図 3)。双胎については妊娠初期に超音波検査を行うことで対処可能であるが、それ以外については詳細な発生機序も明らかになっておらず、具体的な予防策は検討されていない。一方、感染性原因においては細菌性が最も多く、続いてウイルス性、真菌性と続く(図 4)。いずれの報告においてもウイルス性流産は全て馬ヘルペスウイルスである。また、細菌性は *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* が最も多く、次いで *Escherichia coli*、真菌性では *Aspergillus* 属といった一般環境微生物が主体である。日本では高温多湿な気候のためか、欧米に比べて真菌性が多い。これら

細菌および真菌による感染性流産は主に上向性胎盤炎 *ascending placentitis* であり、環境中の病原微生物が外陰部から子宮頸管を通過して胎盤に至り、感染が広がる(106)。胎盤炎は古くからウマの流産原因として知られている(82)。近年、その検査法や治療法の研究において感染実験が行われているが(8, 9, 24, 29, 73), 自然発症例に関する報告は少なく(89, 98), 詳細な経過を追った報告はない。

胎子検査

国内では、一般的に交配後 14-18 日の間に 2 日間隔で 2 回の妊娠鑑定が行われる。その後は早期胚死滅の確認のため 4-6 週目に 1-2 回超音波検査が行われ、8-9 月に交配料支払のため再度妊娠の有無を検査されるが、その後出産までの 5-8 ヶ月もの間特に検査を受けることはない。ヒトにおいては異常の早期発見のため定期的に妊婦健診を受けることが一般的である。しかし、ウマではヒトのような定期健診が行われていないため、妊娠期の異常に気付かないまま流産に至ることが多い。ウマの流産徴候として膺分泌物 *vaginal discharge* と早期乳房腫脹 *premature udder development* が知られている。しかし、これらは病態が進行し、内分泌動態や免疫状態が変化した結果として現れるものであり(56), 経験的にこのような徴候を認めてからの治療は反応が悪い。そのため流産徴候が出現する前に診断、治療することが重要となる(106)。

ウマの胎子検査法として、超音波検査と母体血中ホルモン検査が報告されている。胎子超音波検査は、1990 年後半から報告されている比較的新しい技術であり(22), 低周波探触子 (2-3.5kHz) を用いて母体腹壁から胎子を観察し(81, 88, 91), 胎子の成長および生理状態を評価する。測定項目として眼窩, 頭蓋, 腹部, 胸幅, 肋骨間隙, それに大動脈径などが報告されているが(23, 88, 90, 91, 109), これらの標準値については品種が異なることに加えて, 検査頭数が少ないこと, 検査間隔が長いこと, 同一個体の連続した検査でないことなどが指摘されており(44), 国内軽種馬に応用できるか不明である。

母体血中ホルモン検査ではプロゲスチン **progestins** (黄体ホルモン類似物質の総称), エストロゲン **estrogens** (卵胞ホルモン類似物質の総称) が測定される。胎子副腎で分泌されたプレグネノロン **pregnenolone (P5)**は胎盤でプロゲステロン **progesterone (P4)**を経て **5 α -dihydroprogesterone (5 α DHP)**に変換される。そのため母体血中のプロゲスチンは胎盤機能とともに胎子副腎の活性を反映し, 胎子のストレス(96, 100)や胎盤炎(100)で上昇する。プロゲスチン値の異常には大きく 3 つのパターンがある。突然の低下は胎子の死亡や突然の胎子娩出といった急性の状況を示唆する(77)。持続する上昇は胎子のストレスや胎盤病変を示唆する(48, 73, 78, 95)。通常分娩前 3 週間に生じる上昇の欠如はトールフェスクによるエンドファイト中毒で生じる(20)。一方, エストロゲンはその前駆物質が胎子性腺に由来し, 胎盤で変換される。そのため, 胎子の活性を反映しうるが(54), 由来が副腎ではなく性腺であるため, プロゲスチンほどストレスを反映せず, 胎子死の予知指標としては議論の余地がある(77)。

ウマの卵巣腫瘍

顆粒膜細胞腫

顆粒膜細胞腫 **Granulosa Cell Tumor (GCT)** は卵胞を裏打ちする顆粒層細胞が増殖するもので, 性索間質腫瘍に分類される。ウマ腫瘍の 2.5%を占め(103), 特に生殖器腫瘍の 85%を占める(66)。好発年齢はなく, 未交配, 非妊娠, 妊娠, 分娩後といったステージも問わない(69)。ほとんどが片側性であり, 増殖した顆粒層細胞からインヒビンが過剰分泌されることにより下垂体からの **FSH** 分泌が抑制されるため(65), 反対側の卵巣は萎縮し, 静止する(68)。GCT は良性腫瘍に分類されているが, 内分泌学的な異常により無発情, 持続性発情, 雄性行動を呈し(69), 交配に至らないため, 繁殖分野で問題となる。有効な内科療法はな

く、繁殖性の回復には外科的な卵巣摘出が必要となる。

顆粒膜細胞腫の診断

罹患卵巣は直径 10-20cm に腫大し(69)、超音波検査において小型の卵胞を多数認める、蜂の巣状と呼ばれる特徴的な画像を示す(図 5)。しかしながら、まれに腫大しない場合もあり、超音波画像において実質性であったり単一の大型卵胞像を呈したりするため(26)、獣医師はしばしば診断に悩む。

鑑別すべき類似疾患は卵巣嚢腫や卵巣血腫といった可逆性の卵巣腫大であり、これらは卵巣摘出を必要としない。超音波検査による鑑別が難しい際には、追加検査としてインヒビンやテストステロンといった血中ホルモン濃度測定が行われる。

テストステロンは正常馬で 20-40 pg/ml のところ(67)、GCT 馬で 24.9-420 pg/ml (平均 101.4 ± 19.5 pg/ml) であり、GCT 馬の 66.7%が上昇を示す(68)。一方で正常馬が 146 ± 324 pg/ml, GCT 馬が 304 ± 107 pg/ml と鑑別が難しいとする報告もある(10)。インヒビンは正常馬が 0.1-0.7 ng/ml であり(94)、GCT 馬 0.5-3.0 ng/ml (平均 1.7 ± 0.2 ng/ml) の 87%で正常範囲を上回る(65)。インヒビンはテストステロンよりも感度が高いマーカーとされている(10, 65, 118)。しかしながら、これらホルモン濃度は測定系によって値が異なる場合があり、その判断には熟練を要する。特にインヒビンは動物種差が大きく、日本においてウマインヒビンを測定できる施設は極めて限られるため、臨床応用が困難である。

ウマの潜在精巣

潜在精巢

ウマは生後 10 日前後で精巣下降が起こる(6)。潜在精巣とは精巣下降が生じず、一方もしくは両側とも陰嚢内に精巣がないものを言う（一般に陰辜と呼ばれる）。さまざまな哺乳類で報告されており、特にヒト、ブタそしてウマで多くみられる(17, 119)。ウマにおける発生率は 5-8%とされており、その多く（85-92%）は片側性である(6)。精上皮細胞は熱感受性が強く、腹腔内に残存することで造精能が低下するため、片側性では繁殖能力が低下、両側性では不妊となるが、間質細胞からのテストステロンは分泌されるため、雄性行動は残る(6)。

国内で飼育されているウマは登録時に個体毎に「馬の証明手帳」（いわゆる健康手帳）が発行される（図 6）。これには血統、生年月日、毛色、特徴（旋毛の位置）、マイクロチップ登録番号といった個体情報に加えて、ワクチン接種歴、移動歴さらに手術歴を記載する欄があり、辜丸摘出確認欄も用意されている。辜丸摘出確認欄には片側性潜在精巣を想定し、両側、左、右と 3 段用意されているが（図 6）、乗用馬においては、流通の過程で獣医師以外の者が去勢術を行うことも多く、そのような処置については記載されないことがある。

ウマにおける去勢

競馬施行の目的には優秀な繁殖馬を選抜するという側面があることから、繁殖能力を失った去勢馬（一般に騏馬と呼ばれる）は皐月賞、日本ダービー、菊花賞といった格式あるクラシック 3 冠レース、その一部トライアルレースおよび 2 歳 G I 競走である朝日杯フューチュリティステークスに出走することができない。そのため国内競走馬において去勢は一般的ではなく、その気性の激しさが競走能力の発揮を阻害すると判断された場合に限られる。また、ウマの性別は公式情報として競馬ファンに開示されるため、競馬主催者にとって、雄と騏馬の鑑別は極めて重要である。

一方乗用馬においては、去勢は極めて一般的である。雄は雌に強く反応する

ため、同一施設内で雌雄を飼育することは突発的なトラブルが懸念される。特に乗馬初級者はウマの取扱経験が未熟なため、乗馬クラブでは温厚な性格が求められる。乗用馬においても競技成績が優秀なウマはその繁殖性が期待されるものの、多くの乗用馬は初級から中級者向けであるため、日本の乗用馬においてはほとんどの雄が去勢される。

騏馬と潜在精巣馬の鑑別

片側性潜在精巣は、もう一方が陰嚢内に下降していることから容易に雄と判断できる。しかしながら、両側性潜在精巣では陰嚢内に精巣を認めず、陰嚢皮膚も萎縮していることから、外貌上騏馬との鑑別が困難となる。また、片側性潜在精巣に対し、正常な下降側のみを摘出することは、獣医学的に無意味であるが、乗馬界ではしばしば認められる。このようなウマは、騏馬との鑑別が難しい上に、手術歴も残るため雄と疑われにくく、トラブルとなりやすい(図7)。確実な診断には、行動や外科手術歴といった十分な履歴情報が最も重要な根拠となる(79)。しかしながら、施術者が手術歴を記載しない場合や、健康手帳のない海外からの輸入、それに所有者変更の際に履歴が伝達されない場合もあるため、しばしば問題となる。

騏馬と潜在精巣馬の鑑別方法として触診、超音波検査それに血中ホルモン濃度測定などが挙げられる。精巣は寒冷や興奮により挙上しやすいため、触診する際には鎮静処置を行い、鼠径部の探索、および陰嚢の手術痕の有無を確認する。しかしながら、同検査法は熟練を要する上、客観性に乏しく、また腹腔内の精巣を直接確認することができない。直腸検査によって腹腔内の精巣の位置を診断する臨床家もいるが、その診断精度については議論の余地があり(50, 101)、信頼できると考える研究者は多くない(6)。

血中ホルモン濃度についてはテストステロンとエストロンが測定される。雄の安静時テストステロン濃度は 720-980 pg/ml, 騏馬で 120 pg/ml, であり, >440

pg/ml を雄， <240 pg/ml を騏馬とした際， 5%で誤り， 11%で追加検査を要した(7)。別の報告では雄を >100 pg/ml， 騏馬を <40 pg/ml で判断したところ， 誤診率 14%であった(31, 32)。誤診の原因は雄のテストステロン濃度が季節によって大きく変動するためである(31)。一方， 血中エストロン濃度による診断率は 96%と高いものの， 3 歳以下のウマでは検出されず利用することができない(7)。ヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin, hCG) 刺激試験は， 性腺賦活作用をもつ hCG を投与し， テストステロンの上昇を確認する検査法であり， 診断率 94.6%と高い(30)。しかし， この反応性には年齢や季節が影響し， 両側性潜在精巣では反応が低いとされている(7)。また 18 ヶ月齢未満の子馬では十分な反応が得られない(30)といった点にも注意が必要である。さらに， 同方法は 2 日にわたって複数回の採血が必要な上に， 競走馬や競技馬に対してはテストステロン分泌を促すことからドーピングに該当するということも懸念される。このように従来のホルモン濃度測定は雄であっても低かったり， 騏馬でも副腎由来のホルモンが検出されたりするため， 判断に迷ったり， 誤診したりすることがしばしばある。また， 測定系によって測定値に違いが生じるため， これらのホルモン測定結果を判定する際には測定する施設ごとのウマ標準値を考慮する必要がある(79)。

抗ミューラー管ホルモン

抗ミューラー管ホルモン (Anti-Müllerian hormone, AMH) は， 分子量 140 kDa のジスルフィド結合によるホモ 2 量体の糖タンパクで TGF- β superfamily に属する。最初に雄胎子のセルトリ細胞において見出され， 卵管・子宮の起源であるミューラー管の退行を誘導する因子として知られ(52)， 以前にはミューラー管抑制因子 (Müllerian Inhibiting Substance, MIS) と呼ばれていた。ヒト

においては出生後もセルトリ細胞から分泌し続け(51, 93), 特に性成熟前に高い(3, 11, 58)。出生後における生理学的な意義は完全に解明されていないものの, 精巣の分化(15, 53), 精母細胞の成熟(53, 105)や精巣下降(49)に関与していることが知られている。セルトリ細胞由来であることから, 血中 AMH の検出は精巣組織の存在を示唆し, 潜在精巣と無睾丸症の診断に有用とされる(43, 59, 60)。

AMH は出生後の雌においても卵巣の顆粒層細胞から分泌され(111), 胎子期の卵巣分化の抑制(116), 卵母細胞減数分裂(104, 110)に関与している。げっ歯類における研究から, 初期卵胞の発育 initial follicle recruitment(34, 36)の抑制や主席卵胞の選抜 cyclic selection for dominance(35)といった卵胞発育における 2 つのステップに関与していると考えられている。特に前胞状卵胞の数と血中 AMH 濃度が比例していることから(38), 近年ヒト婦人科領域において卵巣年齢 ovarian reserve の指標として注目されている(113-115)。

以前日本で流通していたヒト用 AMH 測定系, EIA AMH/MIS (#A11893, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) はウマ AMH を測定できなかった (unpublished data)。ウマの血中 AMH 濃度は The Active AMH-ELISA (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, USA) を用いることで測定できるが(27), 同製品は国内で流通しておらず, 現在国内で流通している測定系 AMH Gen II ELISA (#A73818, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) がウマの血中濃度を検知できるかは不明である。

本研究の目的

本研究ではウマにおける胎子超音波検査法の確立およびそれを含めた妊娠馬定期検査の有用性を検証した。さらに AMH を用いた顆粒膜細胞腫の新規診断法および, 騏馬と潜在精巣馬の新規鑑別法について検討した。第 1 章ではサラ

ブレット種正常妊娠馬における胎子胎盤のさまざまな超音波指標を継続して測定し、正常妊娠における推移を検索した。第 2 章では感染性流産に至った臨床例において、第 1 章で確立した胎子超音波検査法に加え、母体血中ホルモン濃度や炎症マーカーなどのモニタリング項目の推移を示すことで、胎子検査法の有用性について検証した。続いて第 3 章では顆粒膜細胞腫を、第 4 章では騏馬と潜在精巣馬の鑑別を対象に、新たな内分泌学的検査法として AMH を用いた診断法の開発・検証を試みた。

図表

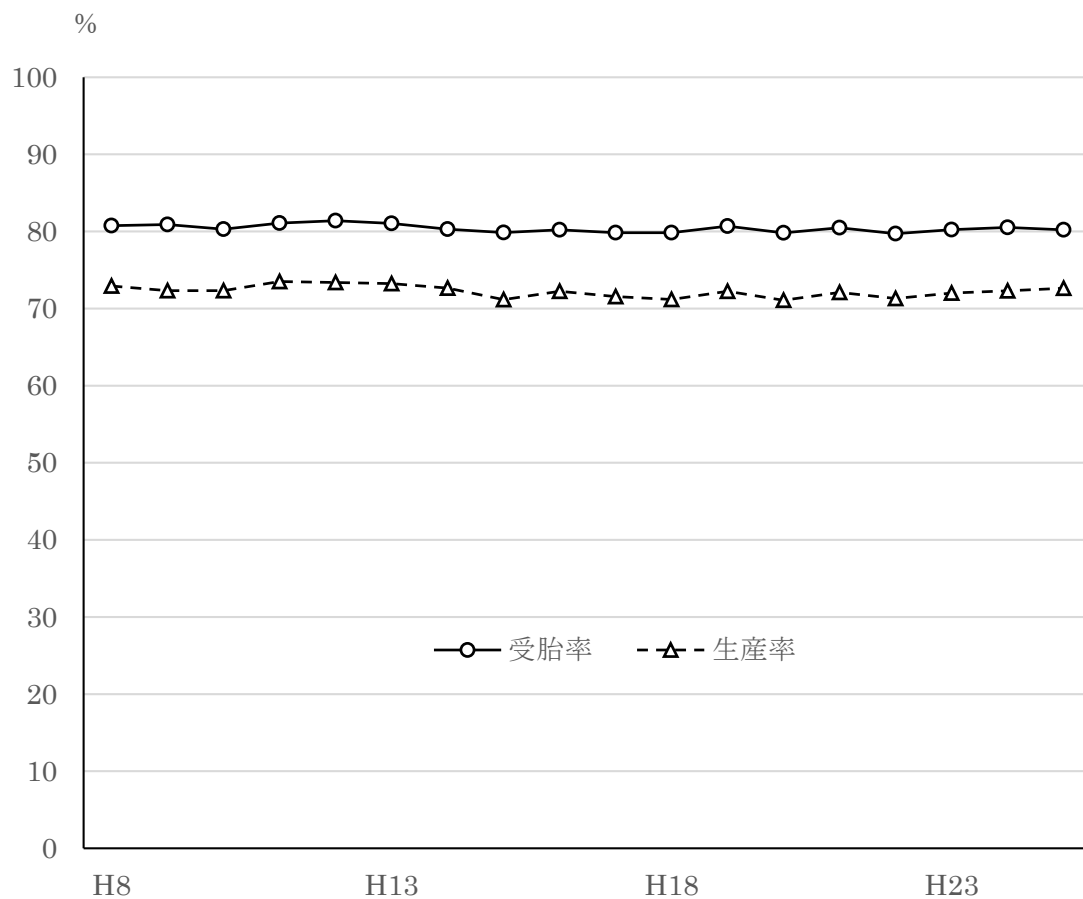


図1 日本におけるサラブレッド種の受胎率と生産率

受胎率と生産率の間には7-9%の損耗が生じている。平成26年度馬関係資料（農林水産省）を改変

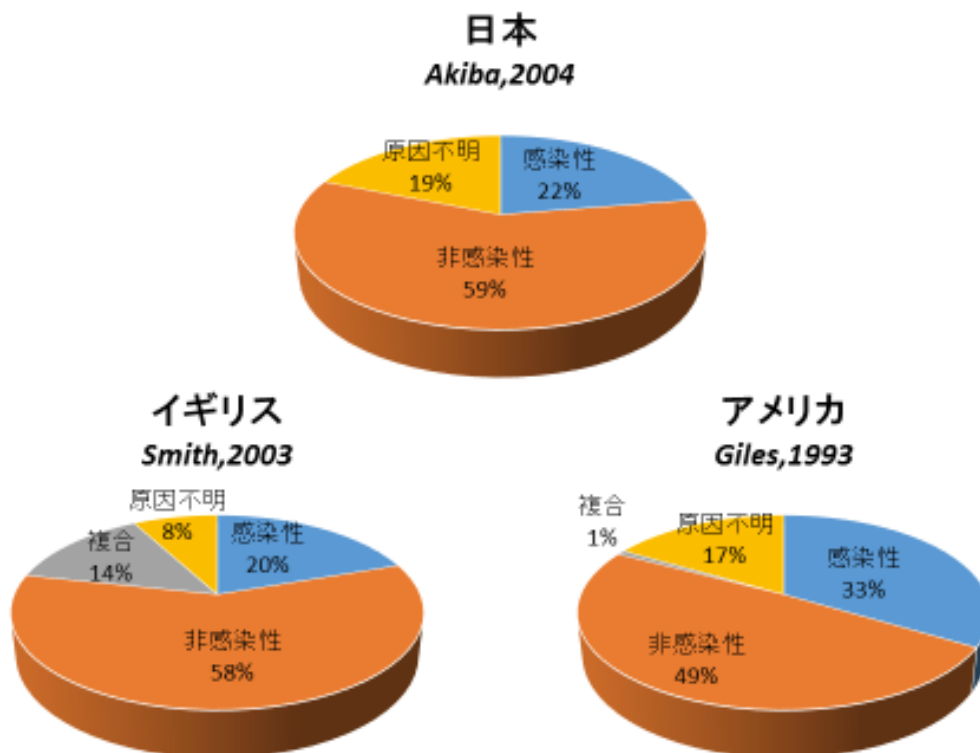


図 2 国別の流産・流死産原因

非感染性が最も多く、続いて感染性、原因不明が占める。日本の対象は流産のみであるのに対し、欧米は流死産としている点に留意。Akiba (2004), Smith (2003), Giles (1993) のデータを改変

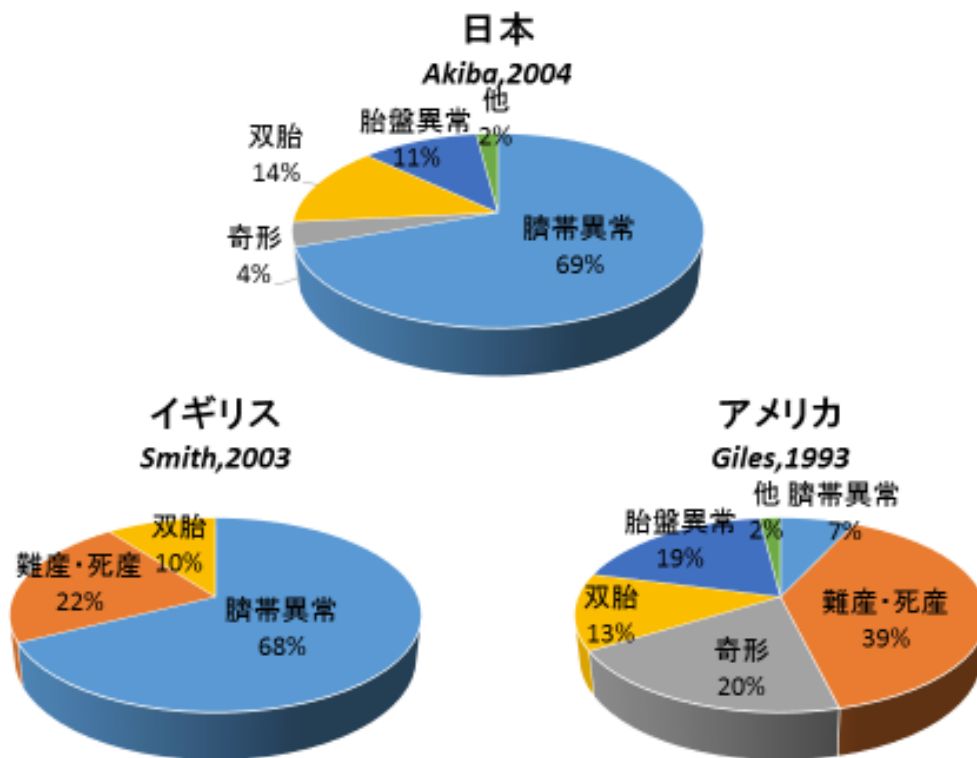


図3 国別の非感染性流産・流死産における原因

日本、イギリスでは臍帯異常が多い。日本の対象は流産のみであるのに対し、欧米は流死産としている点に留意。Akiba (2004), Smith (2003), Giles (1993) のデータを改変

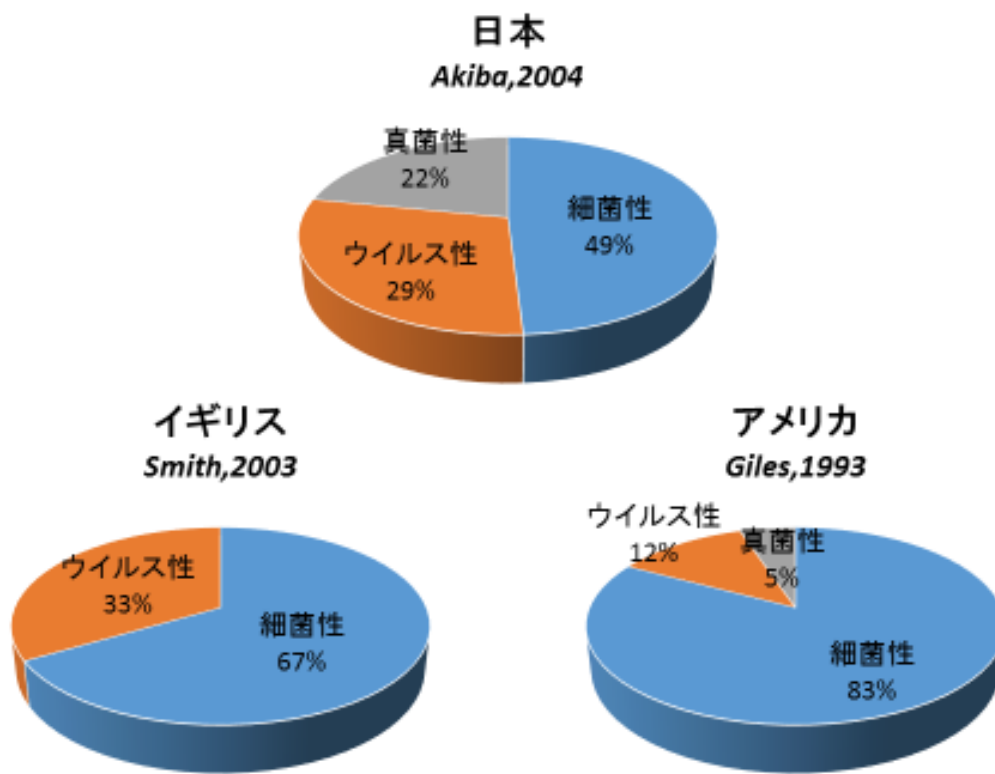


図 4 国別の感染性流産・流死産における病原微生物

各国とも細菌性が多い。日本では真菌性が多い。日本の対象は流産のみであるのに対し、欧米は流死産としている点に留意。Akiba (2004), Smith (2003), Giles (1993) のデータを改変

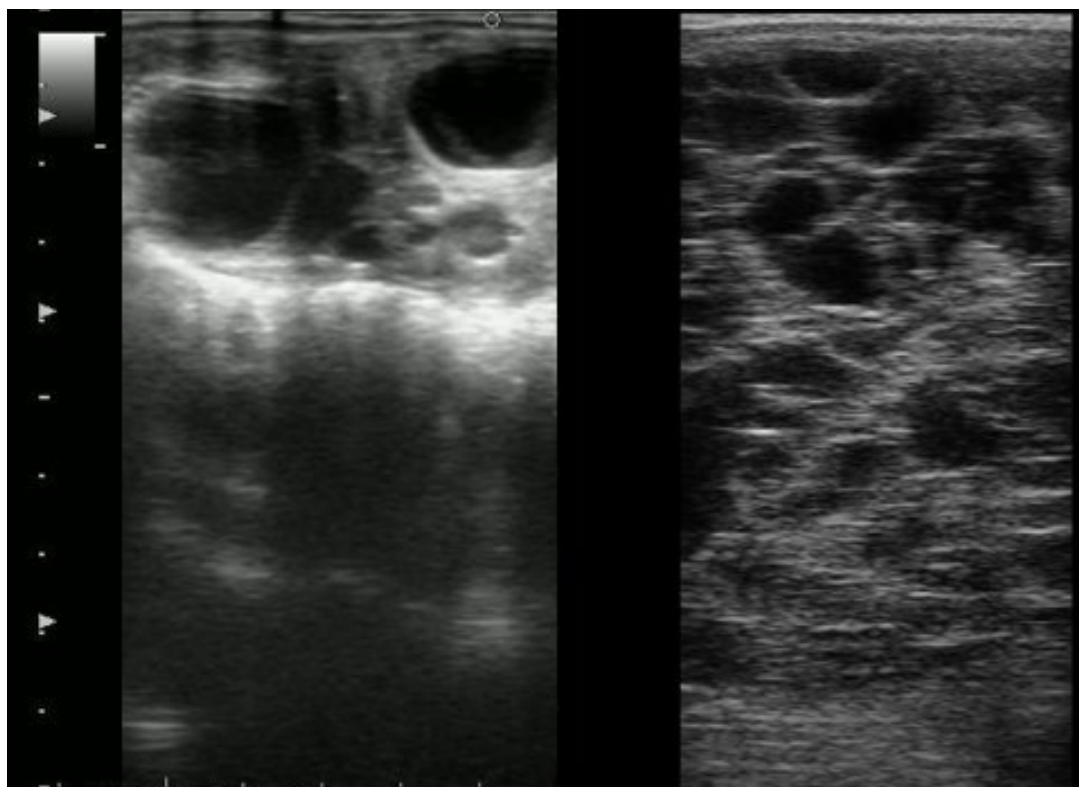


図5 正常卵巣（左）とGCT卵巣（右）の超音波画像

GCT卵巣の多くは肥大化し、内部構造は多数の小型卵胞からなる「蜂の巣状」を呈する。しかしながら、肥大化しないもの、典型的な蜂の巣状を示さないものもあり、超音波画像のみで確定診断を行うことは困難である。

馬の検査、注射 薬浴、投薬 証明手帳

用 役		品 種		性	牡、牝
名 号					
生年月日	年	月	日生	毛色	
特 徴				出生地	
所 有 者 (管 理 者)					取得年月日
氏 名	住 所				

睾 丸 摘 出 確 認 欄

睾丸摘出術を実施した獣医師は、以下に必要な事項を記入してください。
 両側の睾丸を摘出した(去勢した)場合、性別が「牡」から「セン」に変更となります。
 去勢証明書を管理者(調教師等)に提出するとともに、複写を健康手帳に添付してください。
 片側の睾丸だけを摘出した場合は、左右の欄にそれぞれ必要な事項を記入してください。(片側だけでも睾丸が残っている場合、性別は「牡」のままです)

		実 施 日 (西暦年月日)	実 施 場 所 (都道府県)	獣 医 師 氏 名 印 (所属)
実施者記入欄	両側			
	左			
	右			

		確 認 日 (西暦年月日)	確 認 者 (所属)	備 考
競馬主催者確認欄				

2

図 6 馬の証明手帳

国内で登録された馬には同手帳が手交される (左)。睾丸摘出確認欄には左右の別が記載されるようになっている (右)。



図 7 片側性潜在精巣において下降している正常側のみ摘出されたウマの外貌
一方が腹腔内に残存しているため雄であるが、外貌からは潜在精巣を推定することは
できず、同馬が騏馬か雄かの鑑別は困難である。

第1章

コンベックス型探触子を用いたウマ胎子超音波検査

1-1 背景と目的

胎盤機能障害から生じる胎子のストレスや組織傷害は累積され、細胞の損傷や内分泌、代謝および循環系の異常を経て、子宮内発育遅延 *intrauterine growth retardation* (IUGR) を招く(72)。実際、胎盤炎流産胎子は日齢に対して小さい(83)。

胎子の生存性における最も大きな障害は低酸素、感染、IUGR であり(112)、胎子検査はこの3つを診断することが目的となる(112)。今日、ヒトにおいては妊娠期間全体を通じて定期的な超音波検査を行うことは一般的である。超音波検査によって、妊娠初期には頭殿長を、後期には頭蓋大横径、頭囲、腹囲、大腿骨幹長などを計測し、胎子発育を評価する(33)。胎子の大きさだけでなく、胎子心拍数、羊水量、臍帯動脈血流などを測ることによって生理状態も評価される(71, 76, 102, 107)。一方、ウマにおいて超音波検査は妊娠初期の妊娠鑑定や早期胚死滅の検査のために行われるが、妊娠後期においてヒトのような定期的な健診は行われていない。このような定期検査を全妊娠馬に対して実施するのは現実的ではない。しかしながら、経済的価値が高かったり、繁殖性が低かったりするウマにおいては、コストを惜しまない確実な妊娠管理を望まれることもあり、ヒト同様に詳細な胎子検査法の確立が求められている。

ウマにおいても、妊娠期の異常を診断するため胎子进行评估することは有益である(23)。妊娠後期の超音波検査は、1990年後半から報告されている比較的新しい技術であり(22)、低周波探触子(2-3.5kHz)を用いて母体腹壁から胎子を観察する(81, 88, 91)。その主な対象疾病である上行性胎盤炎は感染性流産の主要な原因であり(39, 46)、その治療成功には早期診断がキーポイントとされている(106)。しかしながら、妊娠馬に対する超音波検査に関する報告の多くは妊娠後期・末期に限定されており、妊娠全期を通じたデータは少ない(22)。また、サラブレッドやクォーターホース、スタンダードブレッド、シェトランドポニー

といった品種において眼窩，頭蓋，腹部，胸幅，肋骨間隙それに大動脈の胎子成長データが報告されているが(23, 88, 90, 91, 109)，これらの報告は品種が異なることに加えて，検査頭数が少ないことや検査間隔が長いこと，同一個体の連続した検査ではないことなどからバラツキが大きいことが指摘されており(44)，国内軽種馬への応用にはサラブレッド種の十分なデータに基づいた標準的な推移を確認する必要がある。

ウマにおいて胎子三次元（3D）超音波画像が報告されている(55)。同調査において用いられたコンベックス型 3D 探触子（以下，コンベックス型探触子）は球形であるため，従来のリニア型探触子よりも直腸内における回転性や視野角などの操作性に優れ，妊娠馬に不快感を与えることなく広い視野を得ることができる。コンベックス型はリニア型に比べ大型であるため，これまで臨床現場において経直腸で用いられず，そのような研究報告もない。従来のリニア型による胎子超音波検査は，妊娠中期における観察が困難であることから，その報告は妊娠後期に限定されているものが多い(23, 89, 90)。本章ではこれらの点に着目し，コンベックス型探触子を用いて同一サラブレッド種の妊娠期間全体を通じた胎子胎盤超音波指標を測定し，各指標の推移および正常範囲，さらに描出可能時期を明らかにすることを目的とした。

1-2 材料と方法

動物：

2010 から 2015 年の 5 シーズンにおいて、延 37 頭の妊娠馬（13 頭の健康なサラブレッド種）を対象とした。分娩時年齢は 8.8 ± 4.1 歳（平均値 \pm SD），産歴は 4.0 ± 3.3 産であり，内 6 頭は初産だった。妊娠期間は 341.1 ± 9.0 日であった。対象馬は日本中央競馬会日高育成牧場で繋養され，9 点法によるボディコンディションスコア 6-7 に維持された(45)。夏期には昼夜放牧し，冬期には昼放牧とした。牧草は自由採食とし，状態に応じて配合飼料を与えた。妊娠期に異常を認めたウマは除外した。本章は日高育成牧場の実験動物管理委員会において承認された。

超音波検査：

超音波装置は Prosound $\alpha 7$ （日立アロカメディカル株式会社，東京），探触子はリニア型探触子（UST-5821-7.5; 4-13MHz）およびコンベックス型探触子（ASU-1010; 2-10MHz）を使用した（図 1-1）。周波数は経直腸においてリニア型，コンベックス型ともに 8.0MHz，経腹壁においては深度に応じてコンベックス型を 5.0 または 8.0MHz に設定した。リニア型では視野幅 60 mm，深度 15 cm の長方形に描出されるのに対して，コンベックス型は半径 40 mm，深度 30 cm，視野角 60° の扇形に描出されるため，描出面積はおよそ 5 倍となる。経腹壁検査の際には，必要に応じて腹部正中の被毛を乳房から剣状軟骨まで剃毛した。検査は 1-2 週毎に行った。検査時間は各回 15-30 分であった。各胎子の最終検査時期は以下の通りであり（46 週齢：6 例，47 週齢：10 例，48 週齢：9 例，49 週齢：8 例，50 週齢：1 例，51 週齢：3 例），データの記載においては対象頭数の過半数が分娩した 48 週齢を妊娠満期とした。

子宮胎盤厚 (*Combined Thickness of the Uterus and Placenta, CTUP*) : 経直腸にて子宮頸管付近の子宮体腹側で計測した。少なくとも 3 ヶ所を測定し、平均値を算出した (図 1-2A)。

頭尾長 (*Crown Rump Length, CRL*) : 胎子矢状断像を描出し、頭部から臀部までの距離を計測した (図 1-2B)。

胎子眼窩 (*Fetal Eye Orbit, FEO*) : 眼窩断面が最大となる像において、レンズ前縁から視神経円の内縁までを眼窩幅、それに対して垂直なものを眼窩長とした (図 1-2C)。既報と同様に眼窩幅、眼窩長それに体積近似値 (眼窩長×眼窩長×眼窩幅) を算出した。

頭蓋横径 (*Biparietal Diameter, BPD*) : 大脳の左右対称性を目安に頭蓋骨の横断像を描出し、最大横径部を計測した (図 1-2D)。

腹部横径 (*Transverse Trunk Diameter, TTD*) : 脊椎や肋骨、横隔膜などを目安に腹部横断像を描出し、最大横径部を計測した (図 1-2E)。

大動脈径 (*Aorta Diameter, AOD*) : 胎子胸部の横断像においてなるべく心臓基部を描出し、拡張期の直径を計測した (図 1-2F)。

腎臓径 (*Fetal Kidney, FK*) : 胎子腹部横断像において横断面積が最大となる像を描出し、長径、短径および面積近似値 (長径×短径) を計測した (図 1-2G)。

性腺長径 (*Gonad Length, GL*) : 胎子腹部縦断像において性腺は楕円形に描出される。縦断像が最大となる際の長径を計測した。(図 1-2H)

胎子心拍数 (*Fetal Heart Rate, FHR*) : PW (Pulse Wave doppler) モードにて胎子の動脈性拍動を計測した。胎動によって増加するため(1, 23), 複数回測定した中で最も低い値を採用した。

検査可能時期 : 各妊娠週において、指標毎に描出可能であった頭数を総検査頭数で除して描出率を算出し、描出率 50%以上の時期を検査可能時期と定義した。さらに、用いた探触子およびアプローチ法によって「リニア型探触子によって経直腸で測定可能」、「コンベックス型探触子によって経直腸で測定可能」、「コ

ンベックス型探触子によって経腹壁で測定可能」の3つに分類した。

母体血中エストラジオール濃度：

1 週間毎に採血を実施し、DELFI A Estradiol Reagents (R056-101; PerkinElmer Japan, 神奈川) を用いて測定した。エストラジオール標準液あるいは血清検体 25 μ l を抗ウサギ IgG が固相された 96 穴プレートに分注し、その後、抗エストラジオール抗体を添加し、プレートシェーカー上で 2 時間インキュベートした。さらに、ユーロピウム標識されたエストラジオールリガンドをバッファー液で希釈したものを添加し、プレートシェーカー上で 4 時間インキュベートした。これ以降の工程はプロゲステロンおよびエストラジオールとにも同様で、プレートウォッシャーにて洗浄した後、キレート剤となる増強試薬を添加し、プレートシェーカー上で再び 5 分間攪拌した。その後、マルチラベルプレートカウンター (Wallac 1420 ARVO MX, PerkinElmer Japan, 神奈川) により、時間分解蛍光測定を実施し、連動するコンピュータソフトウェア (MultiCalc, PerkinElmer Japan, 神奈川) により、検量線の作成ならびに検体濃度を解析した。全ての血清検体は 2 重測定を実施した。アッセイ内およびアッセイ間変動は 4.6, 9.4%であった。

統計解析：測定結果は、平均値 \pm SD (標準偏差) で示した。一部の項目については妊娠進行に伴う変化を示すため、各週齢における値を Tukey's HSD test により多重比較を行った。統計解析は、JMP ソフトウェア (SAS 研究所日本(株), 東京) を使用した。有意差に関する統計学的検定の有意水準を 5% に設定した。

1-3 結果

CTUP は妊娠 33 週まで一定であり，以降直線的に厚みを増し，満期（48 週）では 9.2 ± 1.4 mm であった（図 1-3A）。33 週以前と比較し，39 週目以後は有意に厚くなった（ $p < 0.05$ ）。

CRL は妊娠 4 週目の 10.6 ± 2.0 mm から 9 週目の 80.2 ± 6.0 mm まで直線的に増加した（図 1-3B）。6 週まではリニア型で計測できたが，7 週以後はリニア型では計測できず，コンベックス型を用いた。9 週目以後は描出できるものの正確な計測が困難であった（図 1-5）。

FEO は 10 週頃から超音波画像において確認できるようになり，週齢に伴って上昇した。眼窩長の推移は 10 週目に 14.1 ± 1.8 mm，20 週目 39.5 ± 3.5 mm，30 週目 27.3 ± 2.5 mm，40 週目 31.1 ± 2.0 mm，48 週目に 33.4 ± 1.8 mm と，増加は直線的ではなく後期には小さくなった。この傾向は眼窩幅においても同様であった（図 1-3C）。経直腸によりリニア型を用いた描出は 15-17 週目および 44 週目以降において可能であった。一方，コンベックス型を用いた場合には 10 週目から満期にかけて計測可能であった（図 1-5）。

BPD は 8 週齢から安定して描出された。10 週目 5.3 ± 0.8 mm，20 週目 39.5 ± 3.5 mm，30 週目 54.6 ± 11.6 mm，40 週目 70.7 ± 8.5 mm，そして 48 週目は 81.3 ± 8.3 mm と直線的に増加した（図 1-3D）。初期には経直腸で描出可能であり，リニア型よりもコンベックス型を用いた方が頭部横断像を正確に描出できた。描出率はコンベックス型を用いても 30 週目以降徐々に低下し，42 週目以降は困難となった（図 1-5）。

TTD は 10 週目 25.6 ± 2.3 mm，20 週目 97.4 ± 8.3 mm，30 週目 152.9 ± 11.3 mm，40 週目 186.2 ± 10.8 mm，48 週目に 208.3 ± 20.8 mm であり（図 1-3E），44 週齢まで概ね直線的に増加した後に停滞した。初期にはコンベックス型を用いて経直腸で測定できたが 22 週目以後は経腹壁にて測定する必要がある（図

1-5)。

AOD は経腹壁にて 24 週目頃から計測でき (図 1-5), 8.8 ± 0.7 mm から 47 週の 23.3 ± 2.4 mm まで概ね直線的に増加した (図 1-3F)。

FK は 28 週頃から満期まで経腹壁で描出することが可能であった (図 1-5)。長径および面積近似値が比較的直線的に増加したのに対し、後期には短径はほぼ横ばいであった (図 1-3G)。

GL は 13 週目ころから描出できるようになった後、直線的に上昇しつつ 28-36 週目にかけて 60 mm ほどのピークを迎え、その後低下した (図 1-3H)。18-20 週目は経直腸にて、21-37 週では経腹壁にて描出できたが、その後は描出が困難となった (図 1-5)。

FHR の計測は妊娠 4 週目から可能であった。4 週目には 153.8 ± 10.6 bpm であったものが、9 週目に 179.7 ± 8.8 bpm とピークを迎え、その後徐々に低下し満期には 67.8 ± 7.1 bpm であった (図 1-3I)。経直腸により 9 週までリニア型での計測が可能であり、10-32 週はコンベックス型を用いて計測した。32 週以後は経腹壁において計測可能であった (図 1-5)。

1-4 考察

CTUP は上向性胎盤炎において上昇する(8)。手軽に行える検査であることから、胎盤炎の指標として近年臨床現場で普及されつつある。既報による 95%信頼限界は妊娠 9 ヶ月まで約 4 mm で一定であり、その後 1.5-2.0 mm/月ずつ増加し、最終月には 12 mm に達する(92)。オランダ温血種においては 200 日まで変化せず、250 日以後急速に増加し、その 95%信頼限界上限値は経産馬で 12.6 mm である(44)。本研究においては既報と品種が異なるものの、33 週まで差がなく、その後 0.5 mm/週ずつ増加し、満期の 95%信頼限界上限値が 12.0 mm であり、既報とおおむね同様である。既報が 30 日毎の値であるのに対し(92)、本研究は週毎の滑らかな標準値の推移を示した。

ウマ胎子の CRL は、胎齢の推定を目的とした解剖学的な実測値(16, 18, 37)および超音波検査による測定値(40)が報告されている。本結果は、これらの実測値(16, 37)や超音波データ(40)と合致していた。リニア型を用いて経直腸で確実に矢状断像を描出することは難しい(40)。本研究においてはリニア型を用いて 6 週まで計測できたが、7 週以降には正確な矢状断像を描出することが困難であった。一方、コンベックス型を用いることで 9 週まで正確に計測することができた。10 週以降では胎子全体が描出されているにもかかわらず、頸部または体部が側方に屈折するようになるため、正確な CRL の計測は不可能となった。

FEO は初期には同程度であった眼窩長と眼窩幅が徐々に乖離した。これは胎子の眼窩が、発育に伴い正球形から眼球特有のレンズ形を呈することに起因する。これまでの研究では、眼窩長(109)、眼窩幅と眼窩長の和(23)、体積近似値(91)などが指標として有用と報告されている。小型ポニーを用いた研究では眼窩幅を正確に描出することが困難であるため、眼窩長単独が分娩日予測の指標として最適と延べられている(109)。このことは胎子の大きさの指標としても眼窩長単独が適当であることを意味する。本研究においても、しばしば眼窩幅の

最大径を描出することが困難であった。Renaudin ら(91)は、眼窩長、幅、和、体積近似値について妊娠日齢と比較し、体積近似値が最も相関性が高いことを示した ($r^2=0.94$)。また、ある報告では分娩までその増加は直線的であり(23)、別の報告では妊娠 9 ヶ月日以降は横ばいであった(109)。本研究において、体積近似値は妊娠後期に直線的な増加を示したが、妊娠前期には指数関数的な増加を示した。一方、眼窩長および眼窩幅は前期には直線的、後期には対数的に推移した。これは眼窩直径が 1 次元的指標であるのに対し、推定体積値はその 3 乗値であることに起因する。いずれの既報も胎齢との相関性に着目しているが、これは眼窩の成長が日齢と完全に比例することが前提となる。妊娠全期を通じた本研究の結果、妊娠前期は眼窩長および眼窩幅が、後期には体積近似値が胎齢に対して直線性をもつことを示した。Renaudin ら(91)の報告は妊娠 100 日齢以降を対象にしているため、本研究の結果と合致する。FEO は 16 週まで容易に描出できた後も比較的安定して満期まで描出可能であった。描出できない主な原因は胎位と胎勢である。17-26 週では尾位の際に、28 週以降では頭位ながら頸部が屈曲したり前肢が伸展して頭部が沈み込んだりした際に描出できなかった。リニア型での画像診断は、15-17 週および 44 週以降で可能であった。これ以外の時期は、リニア型では描出できずコンベックス型でのみ計測可能であった。

BPD は胎齢と強く相関し ($r^2=0.95$) (91) , 本研究においても胎齢に対して直線的に増加した。リニア型では 304 日以後画面に収まらなくなるとされているが(91), 本研究ではコンベックス型を用いることでその後も描出が可能であった。しかしながら、胎子の成長に伴い子宮内空間がなくなるため、コンベックス型を用いても適切な角度での描出が困難となり、30 週齢頃から描出率は低下、42 週齢以降は描出が困難となった。

TTD は胎齢と相関を示すものの、210 日以降はリニア型では描出できない(91)。本研究ではコンベックス型を用いることで妊娠全期に渡って描出可能であった。

TTD は妊娠の進行に伴って概ね直線的に増加したが、妊娠後期には若干停滞した。これは成長が停滞しているのか TTD の測定に阻害要因があるのか、本研究結果からは判断が難しい。妊娠中期には十分な子宮内空間があるのに対し、後期には超音波画像上胎水が認められなくなるように子宮内空間が狭まっており、胎子腹部が横軸方向に圧迫を受け、過小評価されている可能性が考えられる。

AOD は心臓基部が最も太く、遠位に進むにつれて細くなるため、測定の際には心臓を含めた胸部横断像を正確に描出することが重要である。AOD は胎齢と強く相関し ($r^2=0.95$) (91)、出生時体重と相関することから、発育指標として優れているとされている(89)。本研究においても、胎齢に対して直線的な上昇を示した。一方で、AOD から出生時体重を算出することは困難であり(1, 90)、出生前 5 日という直前の測定値のみ有効とされている(91)。このことは出生直前においても胎子が発育を継続しているという生理的な背景を意味するものと解される。本研究においても、他の項目と異なり満期まで停滞せず、直線的に増加したことはこの所見と一致する。

FK は妊娠後期に経腹壁で描出できた。腎臓は形が不定形であるため、描出される形は探触子の角度によって容易に変化する。また縦断像ではバラツキが大きい(91)、本研究では肋骨を目安とすることで一定した腹部横断面の描出を試みた。長径、短径それに面積近似値のうち、面積近似値が妊娠日齢と最も相関する(91)。本研究では、腹部横断像における腎臓の長径は妊娠週齢に比例して直線的に増加した。一方、短径の増加が停滞しているため、その乗である面積近似値は指数関数的な増加を示さず、直線性を示した。FK の描出は胎位に依存する。後期にはほとんどが側胎向であり、容易に描出できるが、下胎向や上胎向の際には、描出できなかつた。また、満期近くでは胎子の腰部が母親の剣状軟骨周辺にまで位置するため描出が困難となった。

ウマの性腺は胎齢 230-260 日をピークに肥大化することが古くから知られている(28)。超音波検査による測定値の報告は少なく、妊娠日齢との直線的な関係

性が得られないという考察に留められている(91)。本研究においては、28-36週目にピークを示した。この推移から、やはり胎子の成長指標となり得ない。一方で、この推移は母体血中エストロゲンの推移と関連しており(図 1-4)、母体血中エストロゲンの前駆物質 DHEA が胎子性腺由来である(80, 86, 87)ことを支持する。

FHR に関しては、オランダ温血種において 100 日目で約 145 bpm、満期で 75 bpm でありその間は直線的な低下を示した(44)。別の報告では 6-12 ヶ月でそれぞれ約 115, 110, 105, 90, 85, 75, 65 bpm であり、その低下は直線的ではない(品種不明)(23)。本研究において FHR の低下ははじめ大きく、中期には小さくなり、娩出前に再び大きく低下した。測定値は全体に既報よりやや高く推移した。FHR は胎動に伴って一時的(15-30 秒)に上昇するため(1, 23)、本研究では数回測定し、平均値ではなく最低値を採用したが、さらに詳細な計測をすべきであったかもしれない。胎子の徐脈は低酸素(14, 23)による中枢神経系抑制の結果であり、ヒト(42)とウマ(1)で転帰不良に関連するとされている。超音波検査によって FHR が異常であった場合には、さらなる精密検査のため連続したモニタリングが可能な胎子心電図が有用かもしれない(64, 74)。

過去の報告では、BPD と FEO は妊娠後期に横ばいであった(44, 109)。本研究においても BPD, TTD, FEO, FK などと同様の傾向が認められた。流産胎子の調査によると、CRL の増加は妊娠中期で最大となる一方で、体重の増加は満期に最大となる(83)。これは CRL が頭部や脊柱といった骨格の成長を反映する一方、体重は主に筋肉や他の軟部組織の発育も包含するため、骨格と軟部組織の発育時期が異なることを示唆する(83)。また、胎子の発育は器官によっても発育時期が異なることが知られている(84)。このことから、指標は必ずしも胎齢に比例して直線的に増加しないことが分かる。さらに、実際の検査においては胎位や胎向、胎勢によって指標が描出されないこともある。そのため、胎子発育をモニタリングする際には特定の指標に限定するのではなく、さまざまな部

位，器官の発育曲線データを確立することが重要である。さらに，臨床応用のためには各指標の観察しやすい時期を理解することが重要である。

本研究では，サラブレッド種妊娠馬における超音波検査指標を継続して測定し，その推移を示した。これまでの報告は品種の違いや測定間隔の広さについて指摘があるため(44)，本研究ではサラブレッド種同一馬に対し，定期的に測定することで標準的な推移を求めた。胎子モニタリングにおける 3 つの事象である低酸素，感染，IUGR についてはそれぞれ，FHR，CTUP，それに大きさの指標（CRL・BPD・TTD・AOD・FEO・FK）が該当する。これらの指標は，その時点の胎子胎盤の評価のみならず，治療の際にはその推移をみることで治療効果の評価にも応用できる。本研究で用いたコンベックス型探触子は視野の広さに加え，操作性，前方向における描出性に優れ，各指標の観察時期および項目を広げることにより，胎子発育の評価精度を向上させる。FHR と FEO はリニア型では観察できる時期が制限されたがコンベックス型を用いることで概ね妊娠期の全体を通じて観察することが可能であった。胎子発育指標については，初期の CRL，中期の FEO と BPD，TTD，AOD，後期の TTD，FK といった具合に，妊娠の時期に適した観察項目を明らかにした。また，胎盤発育の指標である CTUP および胎子生理状態の指標である FHR は妊娠全期を通じて測定可能であった。本章では，妊娠期の異常を早期に診断することを目的とした妊娠馬検査の基礎的なデータとして，サラブレッド種妊娠馬における胎子超音波指標の推移を明らかにし，臨床応用において重要な各指標における推移の特徴，また測定適期についても明らかにした。

1-5 図表



図 1-1 探触子の外観

コンベックス型探触子（右）は深さ 30cm まで描出でき、さらにその形状から従来のリニア型探触子（左）と比較して直腸内での操作性や前方の描出性などに優れている。

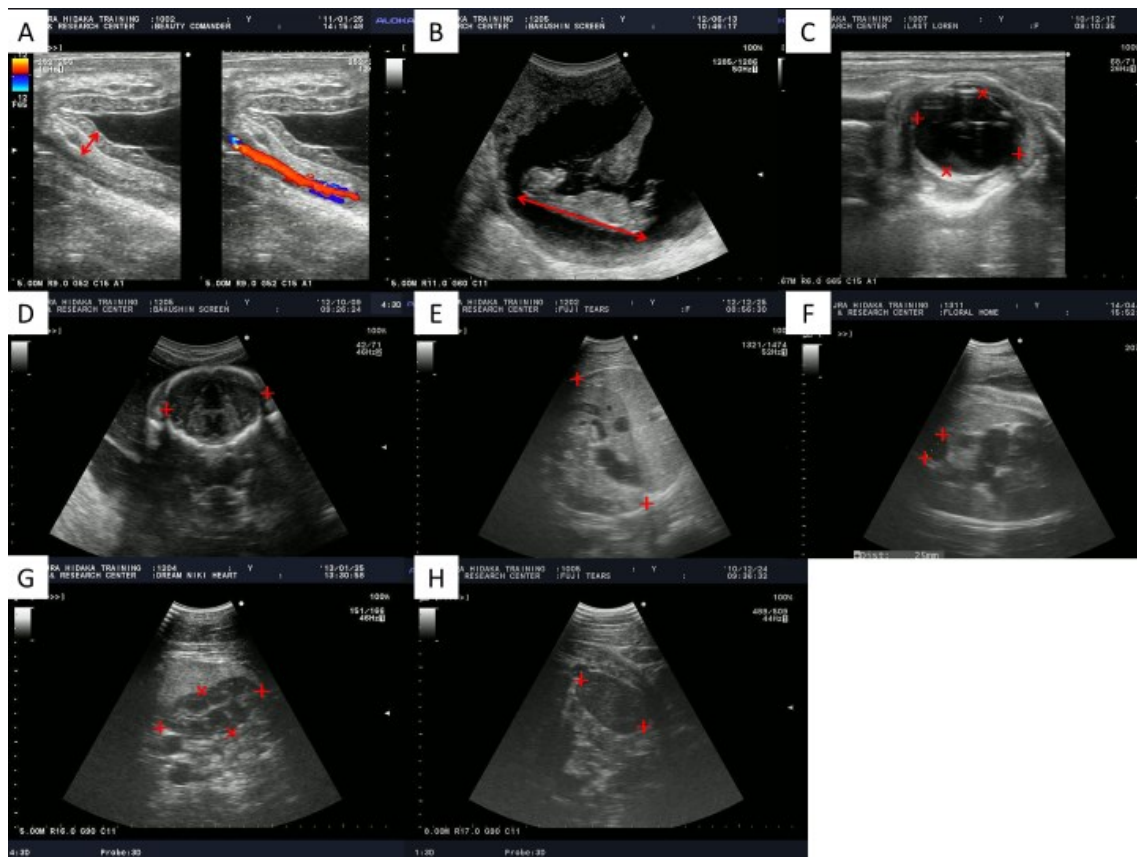


図 1-2 妊娠馬に対する超音波検査指標

(A)子宮胎盤厚 (Combined Thickness of the Uterus and Placenta, CTUP)。経直腸にて子宮頸管付近の子宮体腹側(矢印)を計測する。(B)頭尾長 (Crown Rump Length, CRL)。経直腸による胎児矢状断像にて計測する(矢印)。(C)胎児眼窩 (Fetal Eye Orbit, FEO)。眼窩長 (Length, +) は硝子体内縁の最長部位を, 眼窩幅 (Width, ×) はそれと直行するレンズ前縁から視神経円板までを計測する。(D)頭蓋横径 (Biparietal Diameter, BPD)。胎児頭部横断像において最大横径部(+)を計測する。(E)腹部横径 (Transverse Trunk Diameter, TTD)。胎児腹部横断像において最大横径部(+)を計測する。(F) 大動脈径(Aorta Diameter, AOD)。胸部横断像において拡張期の最大横径部(+)を計測する。(G)胎児腎臓 (Fetal Kidney, FK)。胎児腹部横断像において長径 (Length, +) と短径 (Width, ×) を計測する。(H) 胎児性腺径(Gonadal Diameter, GD)。胎児腹部縦断像において長径(+)を計測する。

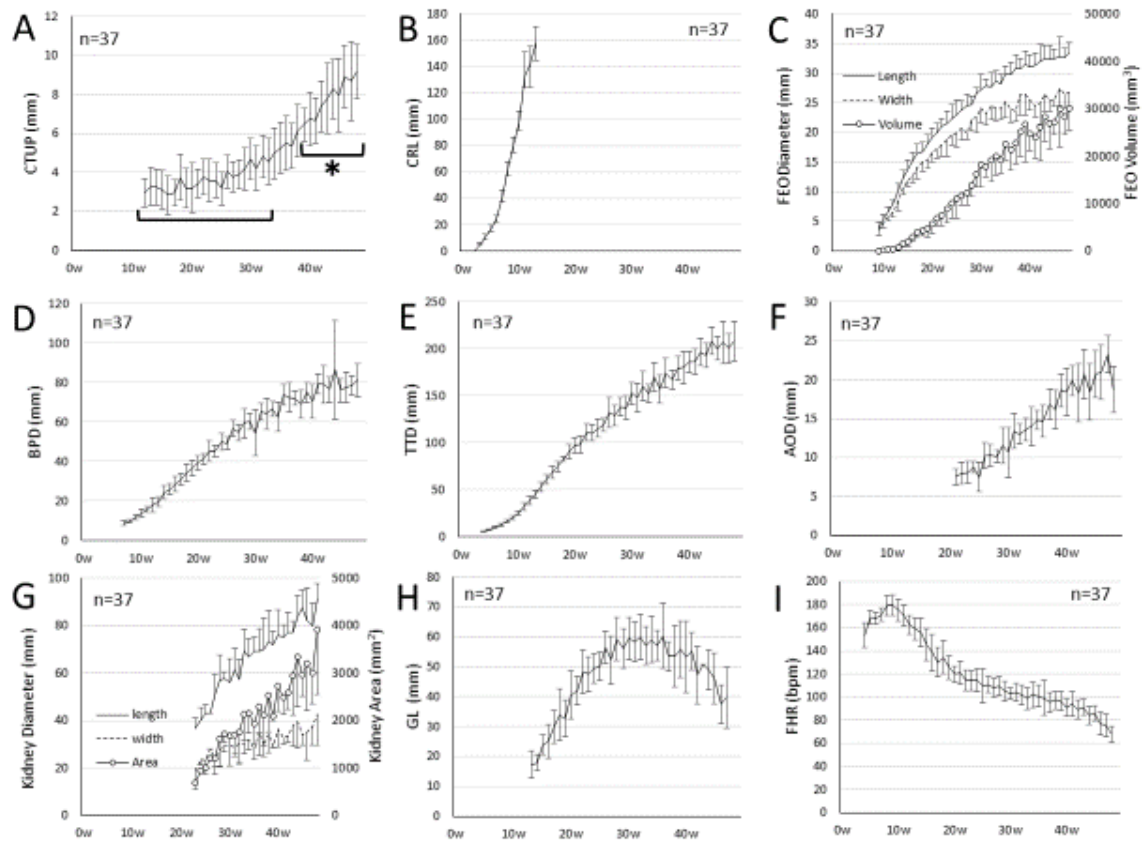


図 1-3 妊娠全期における超音波指標の推移

(A) 子宮胎盤厚 (Combined Thickness of the Uterus and Placenta, CTUP), (B) 頭尾長 (Crown Rump Length, CRL), (C) 胎子眼窩 (Fetal Eye Orbit, FEO), (D) 頭蓋横径 (Biparietal Diameter, BPD), (E) 腹部横径 (Transverse Trunk Diameter, TTD), (F) 大動脈径 (Aorta Diameter, AOD), (G) 胎子腎臓 (Fetal Kidney, FK), (H) 胎子性腺径 (Gonadal Diameter, GD) それに (I) 胎子心拍数 (Fetal Heart Rate, FHR)。CTUP におけるアスタリスク (*) は 33 週以前との有意差 ($p < 0.05$) を示す。

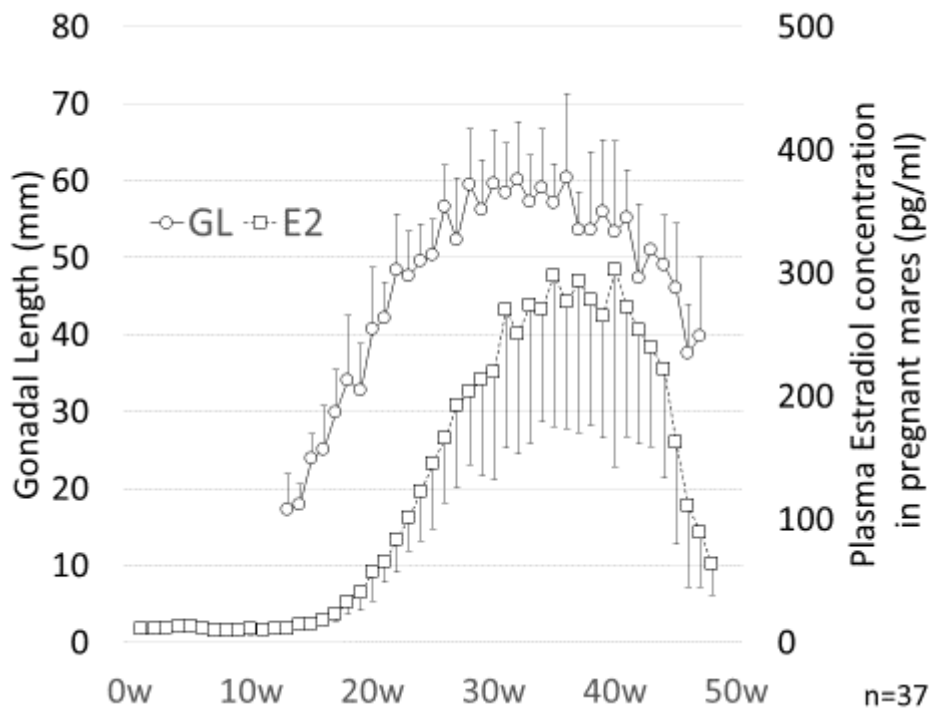


図 1-4 胎子性腺長径と母体血中エストラジオール濃度

性腺の大きさと母体血中エストラジオール濃度が関連しており、性腺がエストラジオール前駆物質を分泌していることを支持する。

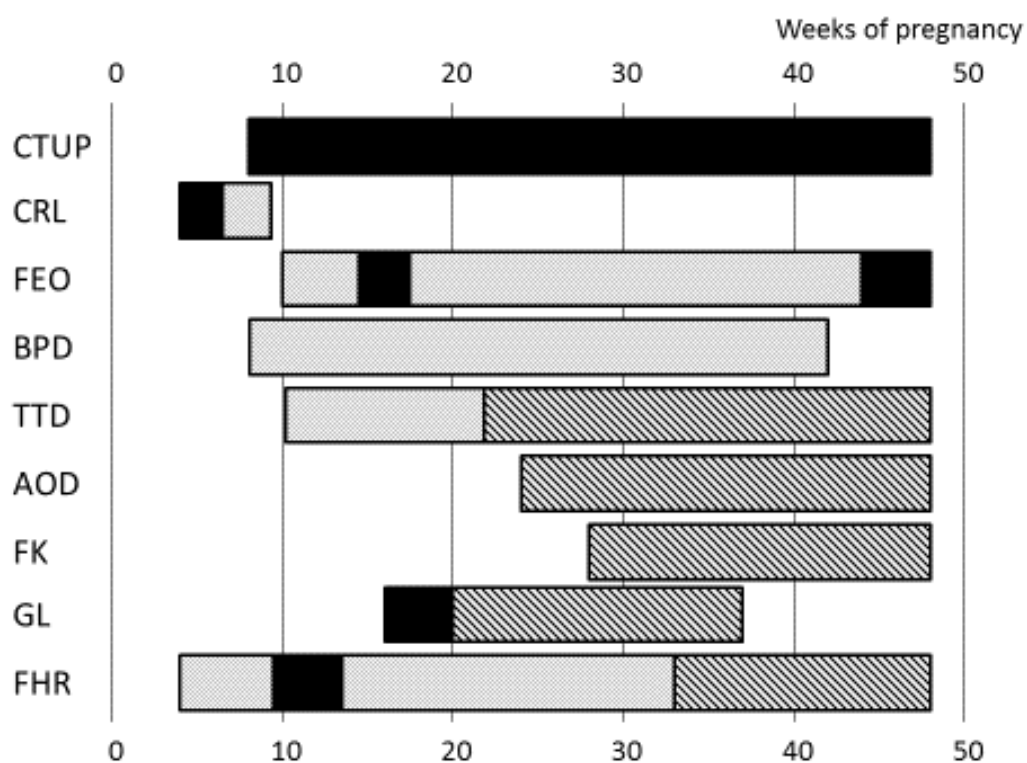


図 1-5 妊娠馬における各指標の検査可能期間

各バーは描出率 50%以上の期間を示す。■：リニア型を用いて経直腸で観察可能。

▨：コンベックス型を用いて経直腸で観察可能。▧：コンベックス型を用いて経腹壁にて観察可能。

第2章

真菌性胎盤炎の1症例における

モニタリング指標の推移

2-1 背景と目的

第 1 章では妊娠期の異常の早期診断を目的とした胎児超音波検査法を確立した。しかしながら、実際の流産症例においてこれら指標がどのような経時的な推移を示すのかについては報告が無く、その応用性に関する情報は不十分である。

上向き胎盤炎 *ascending placentitis* はウマの早産および流死産の主な原因であり(2, 39, 99)、治療成功には早期治療がキーポイントであることから(106)、早期診断法の開発が希求されている。胎盤炎の診断や胎児胎盤のモニタリング項目としてプロゲステロンやエストロゲンといった母体血中ホルモン濃度(73)や胎児胎盤の超音波検査指標(8, 73)などが有用とされている。しかし、細菌感染実験においては、臨床徴候より先に異常を示す項目はなく(8, 9, 24, 29, 73)、早期診断という点において有用性に疑問が残る。感染実験と自然発症ではその病原体への暴露状況が異なるため、病態の進行も異なり、これらの指標が異常を示す時期も異なると考えられるが、自然発症例における詳細な経過については知られていない。

そこで、本章では流産に至った真菌性胎盤炎自然感染例において、第 1 章で確立した超音波指標に加えて、母体血中ホルモンや炎症マーカーなど複数の項目を測定することで、早期診断における各指標の特性について検証した。

2-2 材料と方法

動物：

症例馬はサラブレッド種 12 歳で過去に 6 産しており，流産既往は無かった。同馬は日本中央競馬会日高育成牧場（北海道，浦河）において 9 点法によるボディコンディションスコア 6-7 に維持された(45)。

妊娠馬のモニタリング：

妊娠馬のモニタリングとして定期的に超音波検査および血液検査を行った。超音波検査は 26 週齢までは毎週，以後隔週行っていたが，異常と判断した 32 週目以降は再び毎週行い，子宮胎盤厚，胎子心拍数それに胎子成長指標を計測した。採血は毎週行い，プロゲステロン，エストラジオール，白血球数（White Blood Cell Count, WBC），血清アミロイド A（Serum Amyloid A, SAA）を測定した。このモニタリング方法は日高育成牧場の実験動物管理委員会の承認を得て行った。

母体血中ホルモン濃度の測定：

母体血中プロゲステロン濃度は競合型時間分解蛍光免疫測定法（time-resolved fluoroimmunoassay, TR-FIA）を原理とする DELFIA Progesterone Reagents（R066-101; PerkinElmer Japan, 神奈川）を用いて測定した。抗ウサギ IgG が固相された 96 穴プレートにプロゲステロン標準液および血清検体 25 μ l を分注し，その後，抗プロゲステロン抗体およびユーロピウム標識されたプロゲステロンリガンドをバッファー液で希釈したものをそれぞれ 100 μ l 添加し，プレートシェーカー上で 2 時間インキュベートした。一方，エストラジオール濃度は，DELFLIA Estradiol Reagents（R056-101; PerkinElmer Japan, 神奈川）を使用した。エストラジオール標準液あるいは血清検体 25 μ l

を抗ウサギ IgG が固相された 96 穴プレートに分注し、その後、抗エストラジオール抗体を添加し、プレートシェーカー上で 2 時間インキュベートした。さらに、ユーロピウム標識されたエストラジオールリガンドをバッファー液で希釈したものを添加し、プレートシェーカー上で 4 時間インキュベートした。これ以降の工程はプロゲステロンおよびエストラジオールともに同様に、プレートウォッシャーにて洗浄した後、キレート剤となる増強試薬を添加し、プレートシェーカー上で再び 5 分間攪拌した。その後、マルチラベルプレートカウンター (Wallac 1420 ARVO MX, PerkinElmer Japan, 神奈川) により、時間分解蛍光測定を実施し、連動するコンピュータソフトウェア (MultiCalc, PerkinElmer Japan, 神奈川) により、検量線の作成ならびに検体濃度を解析した。全ての血清検体は 2 重測定を実施した。アッセイ内およびアッセイ間変動はプロゲステロンで 5.5, 8.6%, エストラジオールで 4.6, 9.4%であった。

微生物学的検索：

陰部浸出液を認めて以降、病原微生物を同定するため子宮頸管スワブ採取した。採材は膣鏡を用い、膣円蓋周辺からカルチャースワブ (BD BBL カルチャースワブプラス, 日本ベクトン・ディッキンソン(株), 東京) を用いて採取した。検体は 5%のウマ血液を添加したコロンビア寒天培地を用いて 37°Cで 5%CO₂下または嫌気条件下で 24 時間培養した。培地上に発育した細菌は、純培養を行った後、グラム染色や市販の細菌同定検査キットアピシリーズ (シスメックス・バイオメリュー(株), 東京) を用いて同定を行った。また、培地上に真菌の発育が認められた場合にはポテトデキストロース寒天培地を用いて純培養し、巨大培養集落および顕微鏡下における形態的特長により同定を行った。

治療：

治療指針は既報(62)を参考に、抗菌製剤としてST合剤(15 mg/kg, BID, PO),

非ステロイド性消炎鎮痛剤としてジクロフェナクナトリウム（125–250 mg, BID, PO）、子宮収縮抑制剤としてリトドリン塩酸塩（0.1 mg/kg, BID, PO）およびメドロキシプロゲステロン（200–400 mg, SID, PO）を用いた。これらの投薬は臨床症状及び検査結果に応じて調整した。膣分泌物を認めた後は病原微生物を同定する目的で適時子宮頸管スワブを採取した。流産時には胎盤及び胎子組織から病理学的検査を行った。

統計解析：

各項目の正常範囲は正常妊娠馬の平均値±2 SD（標準偏差）を採用した。正常妊娠馬のホルモン値については同一牧場で飼養された延 28 頭（4 年，12 頭）の値（unpublished data）および *Shikichi* らの提唱するカットオフ値(98)と比較した。超音波検査所見については第 1 章の結果を用いた。プロゲステロンおよび CTUP は正常範囲を上回った場合，エストラジオールと FHR は下回った場合を異常値とした。

2-3 結果

臨床所見，検査結果，治療内容を表 3-1 に示す。妊娠 32 週目に外見上流産徴候を認めないものの，プロゲステロン値 (5.18 ng/ml : 正常範囲 1.46-4.17 ng/ml) および CTUP (10.7 mm : 2.6-7.0 mm) が異常を示したため (図 2-1A, 2)，ST 合剤の経口投与を開始した。34 週目に膣分泌物を認め，*Aspergillus fumigatus* を同定したため (表 2-2)，子宮収縮抑制剤であるリトドリン塩酸塩の経口投与を追加した。37 週目に乳房が腫大し，膣分泌物が増えたため，抗炎症剤であるジクロフェナクの経口投与を追加した。その後膣分泌液が消失し臨床症状が安定したため，39 週目からジクロフェナクの投与量を漸減した。FHR は 38 週目から低下し (78 bpm : 82-112 bpm)，40 週目には乳房がさらに腫大，そして 41 週目に流産した。流産時は早期胎盤剥離による未破水での胎子胎盤の娩出，いわゆる Red bag delivery であった。流産胎子は頭尾長 90 cm，体重 31 kg でやや削瘦していた。胎盤は重量 7 kg，頸管星状部の絨毛膜は頭側へ約 15 cm にわたって肥厚し，石灰化によって白色を呈した。尿膜面は瀰漫性の出血を呈していた (図 2-4)。

子宮頸管スワブからは *A. fumigatus* が継続して検出された (表 2-2)。35 週目以降，さまざまな細菌も検出されたがいずれも一時的であった。流産時の胎盤及び子宮頸管スワブからは *Streptococcus suis*，*Escherichia coli*，*A. fumigatus* が検出された。病理組織学検索により胎盤から抗 *Aspergillus sp.* 抗体 (AbD Serotec) およびグロコット染色陽性の菌糸状構造物を認めた (図 2-5)。胎子組織及び胃内容物からは細菌，真菌それにウマヘルペスウイルスは検出されなかった。

34 週目に臨床症状 (膣分泌物) を示したが，それに先立って 32 週目からプロゲステロン値および CTUP は異常を示した。SAA と FHR はそれぞれ 36，38 週目に異常を示し，WBC は異常を示さなかった。超音波検査における胎子の成

長指標については、いずれの項目においても正常範囲ながら、35-40週目にかけて成長が停滞している可能性が示唆された（図 2-6）。

2-4 考察

本章では定期的な妊娠馬検査を実施している妊娠馬が流産に至ったため、その経過について報告した。子宮頸管スワブより一貫して *A. fumigatus* が検出されたこと、頸管星状部を中心に胎盤絨毛膜に病変が認められたことから、典型的な上向性感染性胎盤炎と診断した。真菌性胎盤炎においても細菌性と同様の病理所見が認められるが(47)、その詳細な病原性の違いについては不明であり、比較は難しい。子宮内真菌感染による流産胎子は発育が抑制されることが報告されているが(83)、そもそも正常な発育胎子の大きさに関する報告がないため、ウマ IUGR とその原因に関する報告はない。本症例は頭尾長も体重も既報と同程度であった(83)。また、超音波検査による胎子成長指標から 35-40 週の期間に成長が停滞していることが伺えた(図 2-6)。流産時の実測値は正常であったが、同馬は当初平均より大きく推移しており、成長している中で IUGR が生じている可能性も考えられた。これは外貌が消瘦気味であったという所見を裏付ける。

胎盤炎感染実験では *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* が用いられており(8, 9, 25, 29, 57, 73)、本症例とは病原体が異なるものの、プロゲステロンの上昇、エストラジオールの低下、CTUP の上昇、SAA の上昇といった所見は同様であった。本報ではさらに FHR が低下した。感染実験においてこれらが異常を示す時期は、SAA では病原体暴露 4 日後から(29)、CTUP では 3 日後から(8)、プロゲスチンでは約 1 週間後から(73)である。しかしながら Coutinho らの報告(29)では感染 36 時間後に陰部浸出液を認めており、早期診断という点においてこれら指標の有用性は疑問が残る。本症例では 34 週目に陰部浸出液が、37 週目に乳房の腫脹が観察されたのに対し、CTUP とプロゲステロンは 32 週目から、SAA は 36 週目に異常を示した。本症例が病原体に暴露された時期は不明であるため、詳細な比較は困難であるが、CTUP とプロゲステロンが臨床症状より早期に異常を示したことから、これらを定期的に測定することが妊娠馬検

査として有用であることが示された。

胎盤炎罹患馬ではプロゲステロンが上昇する(100)。本研究においても、母体血中プロゲステロン値は 26 週から上昇し始め、29 週目に *Shikichi* らが提唱するカットオフ値(98)を上回り、32 週目には正常範囲を上回った。この持続した緩やかな上昇は、感染実験とは異なり自然感染が緩やかに進行することを示唆するかもしれない。カットオフ値は 221-240 日齢の値がその後の 241-260 日齢、261-280 日齢よりも高いというように、妊娠の進行に応じて一貫した推移をしていない点に議論の余地がある。本結果においても、29 週目に異常を示した後、30、32-35 週目は正常範囲であった。

エストラジオール値は流産に至るまで一貫して正常範囲内であったものの、31-32 週目からの低下は正常妊娠馬の動態とは異なった (図 2-1B)。この低下は 33 週目には一旦復したが 34 週目以降再び低下した。このような変化にもかかわらず、エストラジオールが終始正常範囲内に収まっていた理由は、正常妊娠馬において個体差が大きく、正常範囲が広範であることに起因すると考えられる。一方、エストラジオール値は 37 週目にカットオフ値(98)を下回った。エストロゲンは胎子のモニタリング指標としては議論の余地があるが(77)、流産前に異常を示した。プロゲステロンおよびエストラジオールの結果は従来言われているように、胎盤炎の早期診断には、正常範囲やカットオフ値との比較よりも個々の妊娠馬における変化に焦点をおいてモニタリングすることが重要であることを支持する結果となった。

感染実験の結果から SAA は胎盤炎の診断マーカーとして有用であると報告されている(24, 29)。しかし、週 1 回の採血において、臨床症状よりも先に SAA の上昇は認めなかった。臨床症状の出現後早期に治療することにより SAA の上昇を抑えられるため(29)、今回の SAA 上昇が一過性で低かったのは臨床所見を示す前から投薬していたことが影響しているかもしれないが、週 1 回のモニタリングで検知できなかったのか、上昇しなかったのかは不明である。また、36

週目に認められた SAA の上昇は一過性であった。これは子宮頸管スワブから細菌が検出された時期に一致することから、細菌の 2 次感染を反映していた可能性が考えられる。

WBC は一貫して上昇を認めなかった。感染実験においても変化しないと報告されており(25)、同様の結果であった。

胎子の徐脈は低酸素に起因する中枢神経系の抑制の結果であり(23)、予後が悪いとされている(1)。本症例では 38 週目（流産 16 日前）に FHR が正常範囲を下回った。実験感染例では FHR は変化しないとされているが(8)、有意差はないものの低下の傾向が示されており、胎盤炎では胎子の低酸素を招くことが示唆される。

本章では、胎盤炎自然発症例における超音波指標、母体血中ホルモン濃度および炎症マーカーといったモニタリング項目の経時的変化について報告した。感染性胎盤炎においては治療の早期開始が重要であるが(106)、本結果から自然発症例における早期診断項目として、SAA に疑問が残る一方、プロゲステロン値と CTUP が有用である可能性が示唆された。また、プロゲステロンやエストラジオールは、正常値やカットオフ値との比較よりも個体毎の推移を確認することでより早期に診断できることが示唆された。

2-5 図表

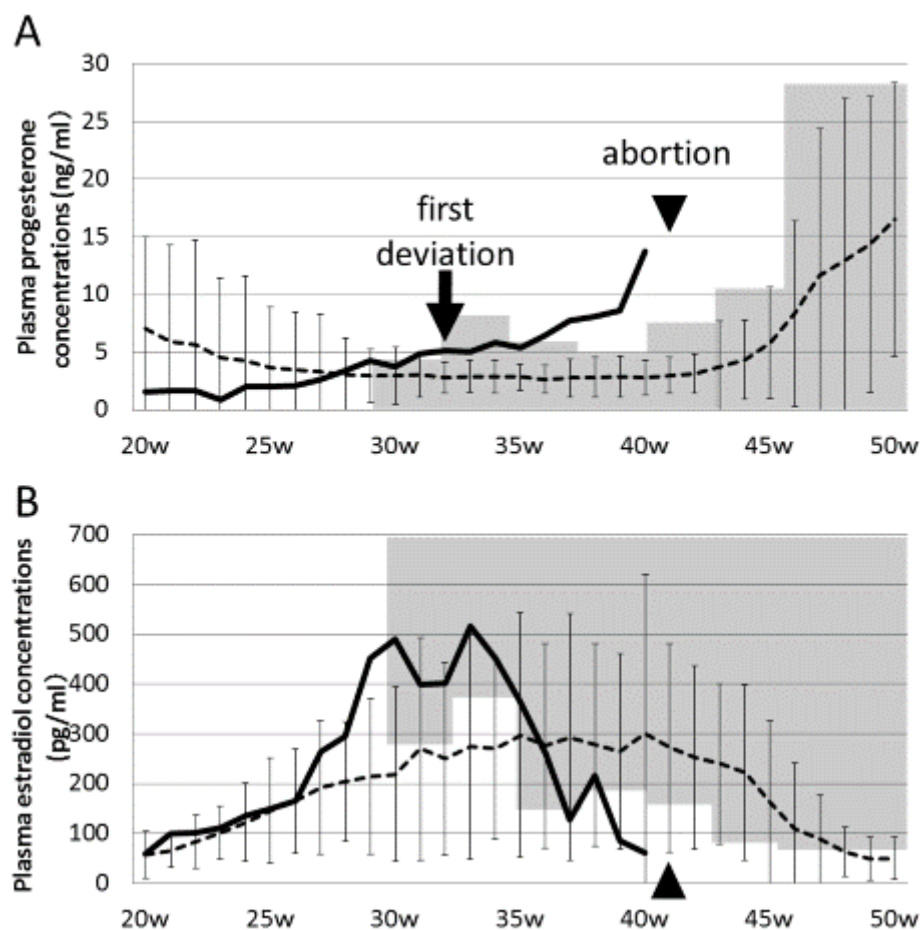


図 2-1 血中プロゲステロンおよびエストラジオール濃度の推移

A)プロゲステロン濃度は20週代後半から上昇し始め、32週目に異常値を示した(矢印)。B)エストラジオール濃度は33週目から低下し始めたが終始正常範囲内であった。正常馬から求めた正常範囲(平均±2SD)を点線+エラーバーで、*Shikichi*らのカットオフ値を灰色網掛けで示す。正常範囲からの最初の逸脱を矢印で、流産を矢頭で示す。

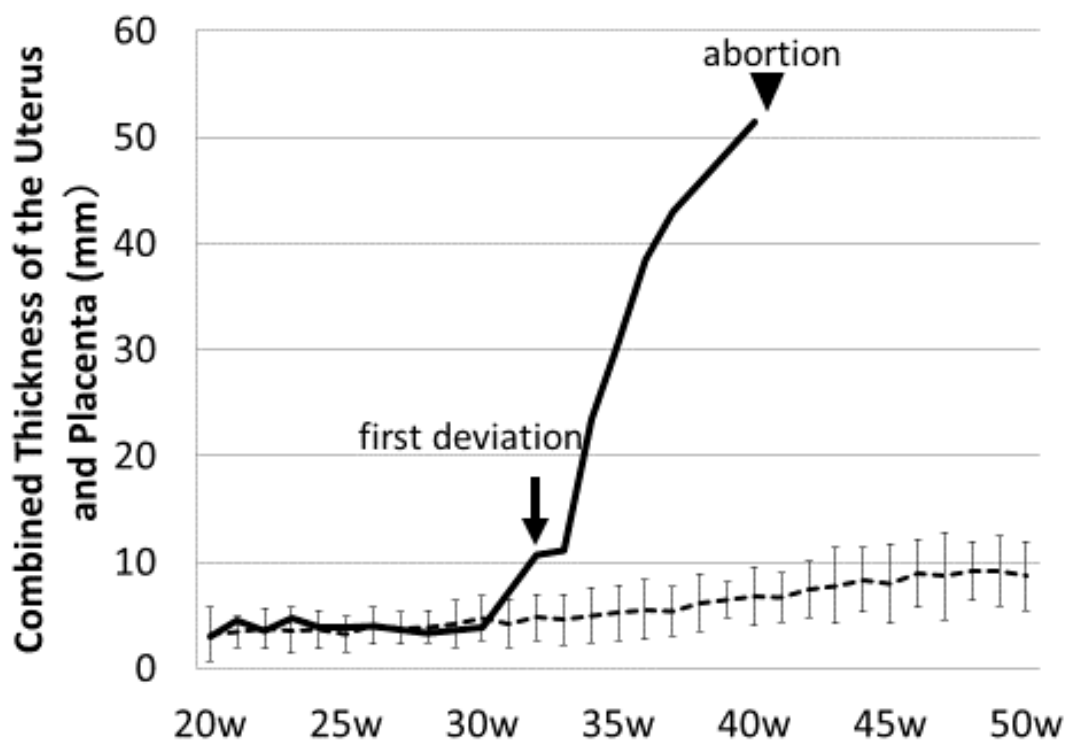


図 2-2 子宮胎盤厚の推移

CTUP は 32 週目以後肥厚した(矢印)。正常範囲（平均±2SD）を点線+エラーバーで示す。正常範囲からの最初の逸脱を矢印で、流産を矢頭で示す。

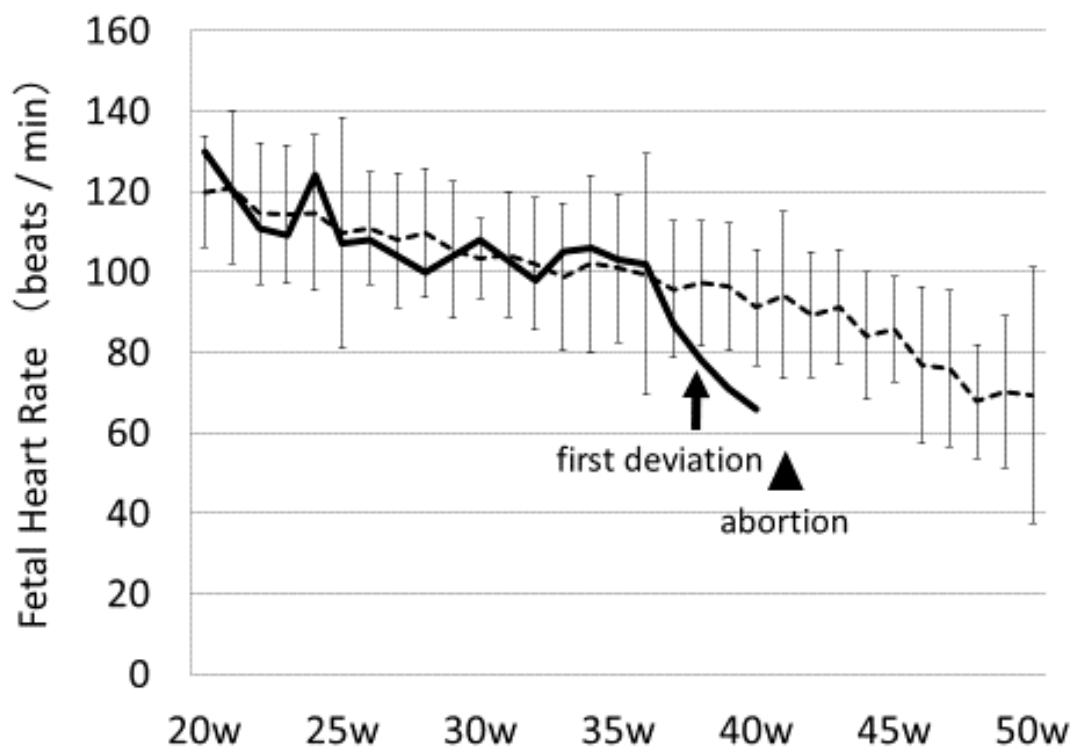


図 2-3 胎児心拍数の推移

FHR は 38 週目に正常範囲を下回った (矢印)。正常範囲 (平均 \pm 2SD) を点線+エラーバーで示す。正常範囲からの最初の逸脱を矢印で、流産を矢頭で示す。

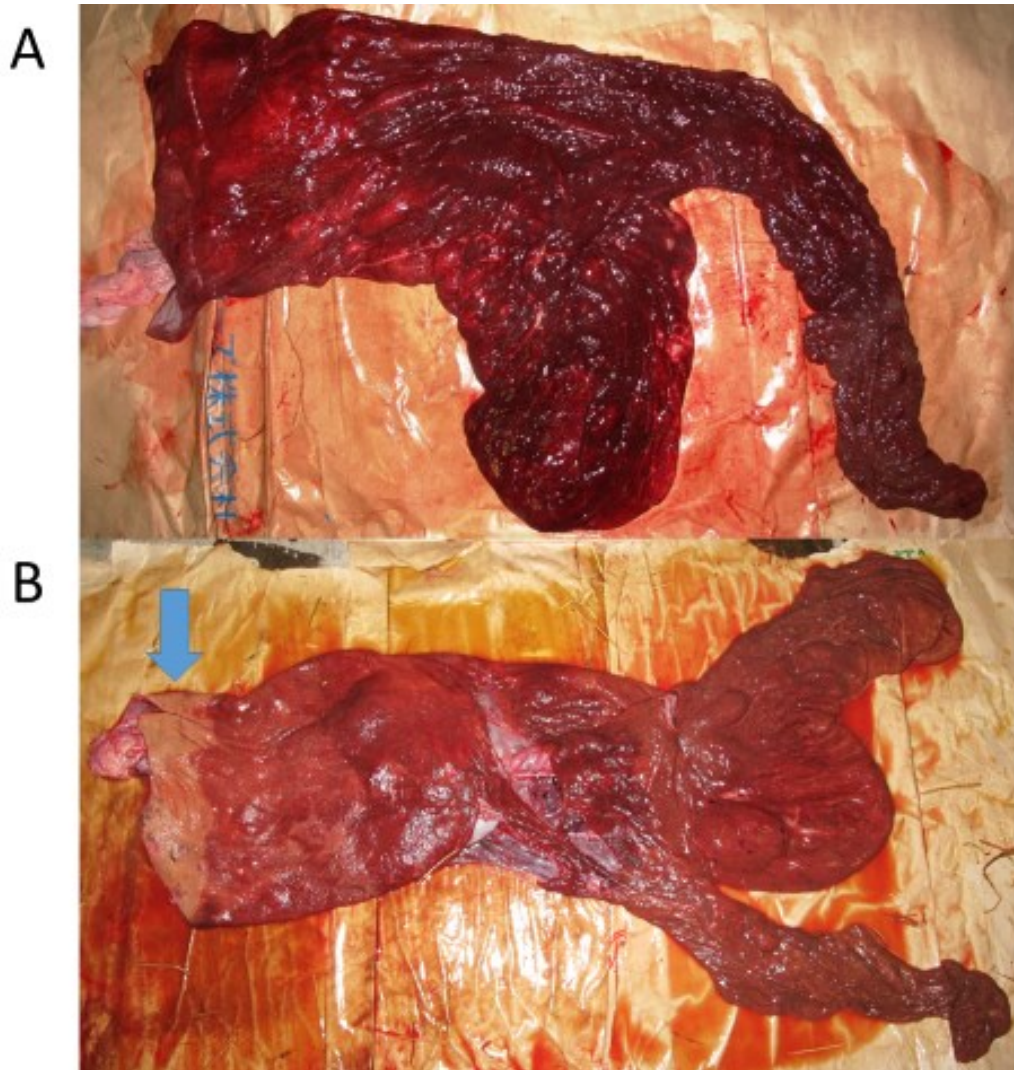


図 2-4 正常胎盤(A)および流産胎盤(B)の外観

頸管星状部の絨毛膜面は頭側へ約 15cm にわたり灰白色を呈し肥厚していた。

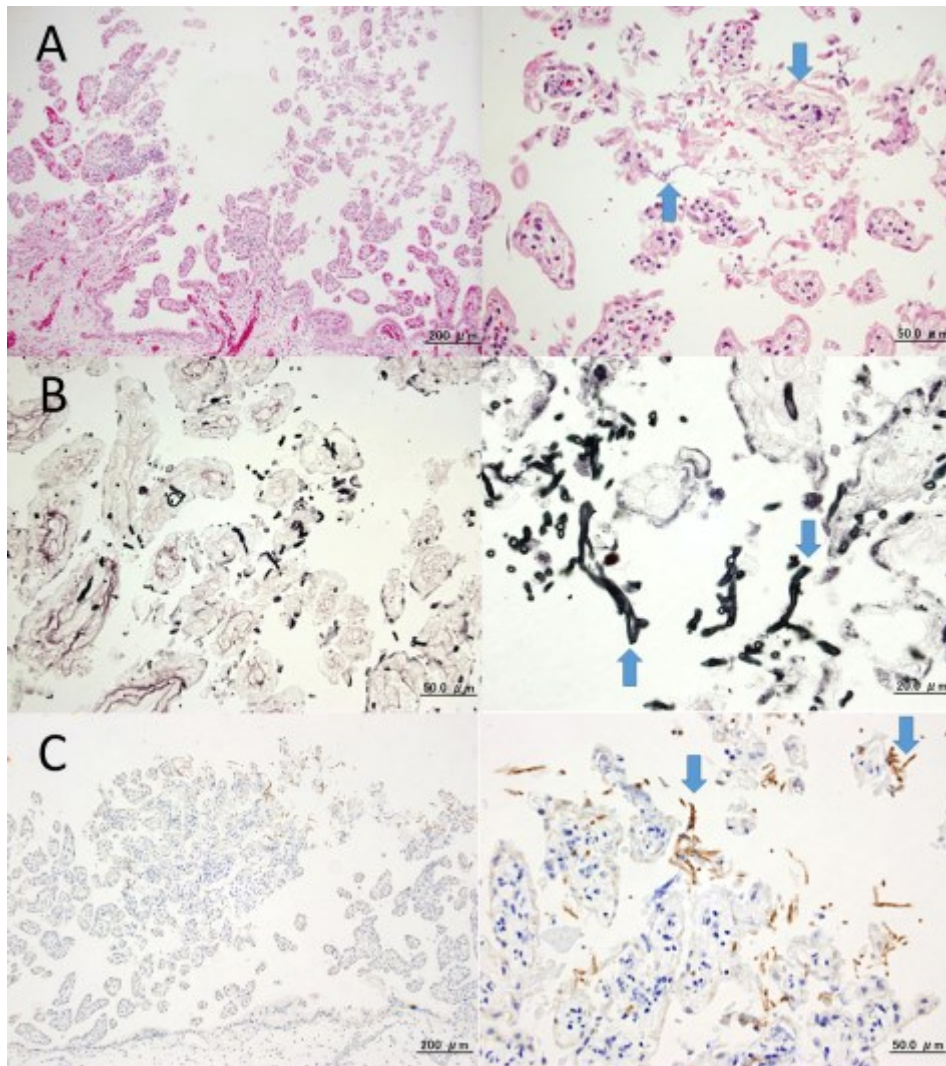


図 2-5 胎盤絨毛部の(A)HE 染色, (B)グロコット染色および(C) 抗 *Aspergillus* sp.抗体を用いた免疫染色像

絨毛膜絨毛は消失ないし短縮し, 絨毛先端領域は瀰漫性に軽度な凝固壊死を呈する。一部の固有層に好中球やリンパ球が浸潤し, 真菌の菌糸状構造物が観察された(矢印)。絨毛組織内部にグロコット染色陽性, 抗 *Aspergillus* sp.抗体陽性の菌糸状構造物を認める(矢印)。

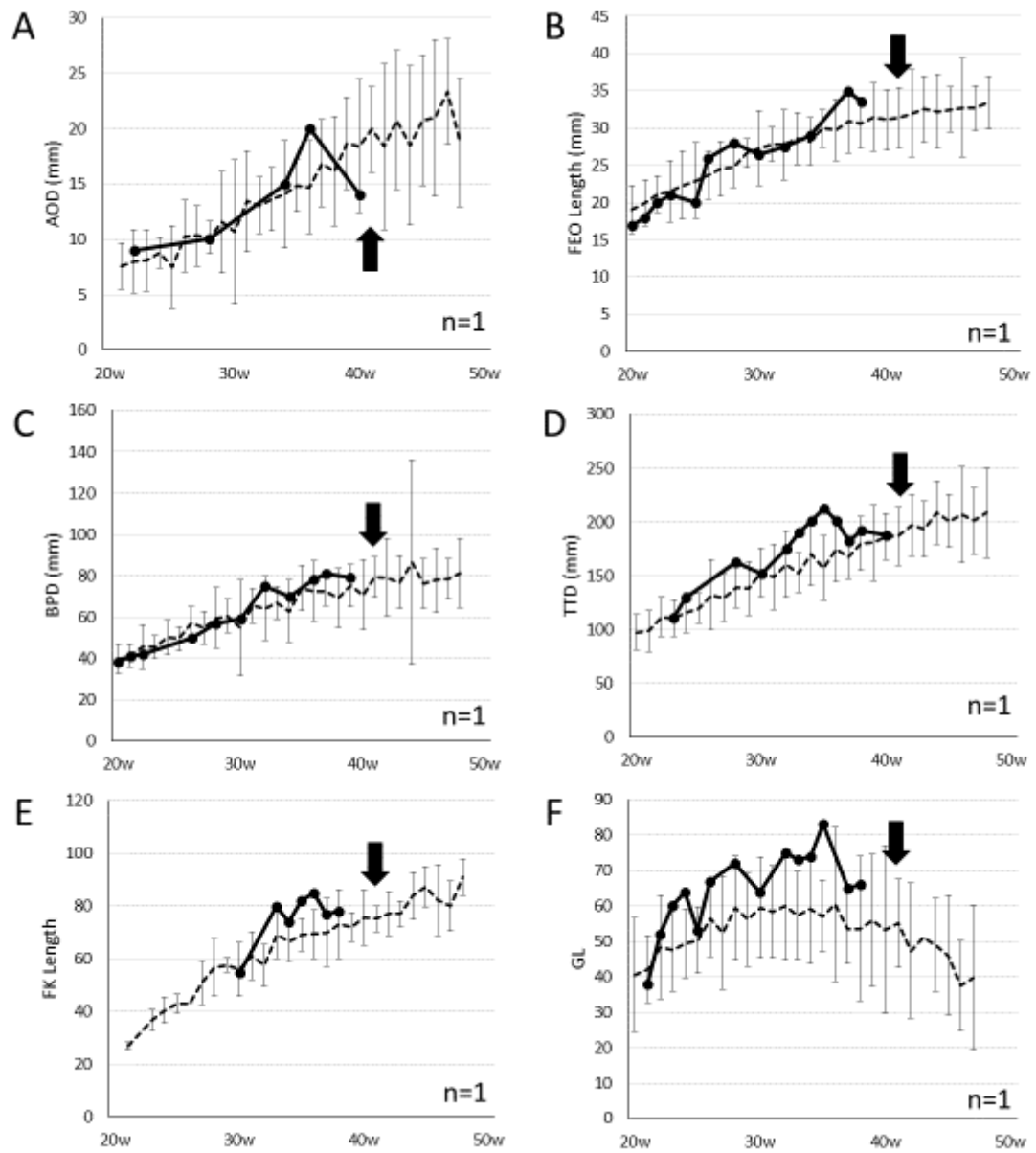


図 2-6 流産症例における胎児成長指標の推移

(A)大動脈径 (AOD), (B)眼窩長径 (FEO), (C)頭蓋横径 (BPD), (D)腹部横径 (TTD), (E)腎臓長径 (FK), (F)性腺長径 (GL) を示す。第 1 章の結果に基づく正常範囲 (平均 \pm 2SD) を点線+エラーバーで、流産した時期を矢印で示す。35-40 週齢にかけて停滞している可能性が示唆される。

表 2-1 臨床症状，検査結果および治療の経過

weeks of pregnancy	clinical signs	examination results												treatment			
		Ultrasonography								Blood				TMP/SMX	RTD	MPA	DIC
		CTUP	FHR	FEOL	BPD	TTD	AOD	FKL	GL	WBC	SAA	P4	E2				
30		3.8	108	26.5	59	152		55	64			3.73	489				
31												4.91	400				
32		10.7	98	27.5	75	175			75	8900	0	5.18	402				
33		11.1	105			190		80	73	8700	0	5.05	516				
34	vaginal discharge	23.4	106	29	70	201	15	74	74	7800	0	5.86	451				
35		30.5	103			213		82	83	6100	0.8	5.36	363				
36		38.4	102		78	201	20	85		10000	288.1	6.47	261				
37	udder development	43	87	35	81	182		77	65	7800	28.3	7.78	128				500mg
38	vaginal discharge																
38	discharge disappear	45.7	78	33.5		192		78	66	6800	0	8.1	217				
39			71		79					8600	0	8.64	85.3				250mg
40	udder development	51.4	66			188	14			9500	0	13.7	60.8				125mg
41	abortion																

異常値を示した箇所，投薬を行った期間を灰色網掛けで示す。TMP/SMX: Trimethoprim-sulfamethoxazole (ST 合剤)，RTD: Ritodrine hydrochloride (リトドリン)，MPA: Medroxyprogesterone (メドロキシプロゲステロン)，DIC: Diclofenac sodium (ジクロフェナク)

表 2-2 子宮頸管スワブからの培養同定結果

Weeks of pregnancy (Days of pregnancy)	34 (240)	35 (242)	35 (245)	36 (251)	37 (260)	38 (266)	39 (273)	40 (280)	41 (285)	41 (289)	42 (293)	43 (301)
Vaginal discharge	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Fungus*												
<i>Aspergillus fumigatus</i>	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-
Gram-positive bacterium												
α-hemolytic <i>Streptococcus</i> sp.	-	-	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	-	-	+++	+	-	-	-	++++	-	-
<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus suis</i>	-	-	-	-	-	-	++++	-	++++	-	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	-
Gram-negative bacterium												
<i>Enterobacteriaceae</i>	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
Gram negative anaerobe	-	-	-	-	++++	-	-	-	-	-	-	-
Gram negative facultative anaerobe	-	-	-	-	++++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	++++	-	-	++++	+++	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	-	-	-

コロニー数(CFU/mL)は以下のように示す。(-, 0; +, 1-10; ++, 11-100; +++, 101-1000; +++++, 1001-10000; ++++++, 10001-)

*真菌はコロニー数を集計できないため、陽性結果を NA と示す。

第3章

血中抗ミューラー管ホルモン測定による

ウマ顆粒膜細胞腫の診断

3-1 背景と目的

第1章, 2章では妊娠期の異常を早期に診断することを目的とした超音波検査, 母体血中ホルモン濃度測定の有用性を示した。これら検査法は交配管理においても有用であり, 広く用いられているが, 臨床現場においては依然として診断に悩む症例に遭遇することも少なくない。

顆粒膜細胞腫 (Granulosa Cell Tumor, GCT) はウマの卵巢腫瘍で最も多い(66)。そのほとんどは反対側の卵巢が小さく不活発となるため(68), 交配に至らず, 生産現場で問題となる。有効な内科療法はなく, 卵巢摘出術が推奨される(26)。罹患卵巢は腫大し, 超音波検査によって蜂の巣状を示すことが多いが, 卵巢囊腫や卵巢血腫といった類似疾患との正確な鑑別は困難である。また, インヒビンやテストステロンといった血中ホルモン濃度測定が有効とされるが, 日本においては測定できる施設が極めて限られる上に, その診断精度も確実ではない(10, 65, 68, 118)。

そこで, 新たな診断マーカーとして抗ミュラー管ホルモン (Anti-Müllerian hormone, AMH) に着目した。AMH は, ジスルフィド結合によるホモ 2 量体の糖タンパクで卵巢顆粒層細胞から分泌されることが知られ(111), 前胞状卵胞数と血中 AMH 濃度が比例することから, ヒトにおいて卵巢年齢の指標として注目されている(113-115)。ウマにおいてもヒトと同じく顆粒層細胞において発現し(13), GCT 馬で高い血中 AMH 濃度を示すと報告されている(5)。しかし, 以前日本で流通していた EIA AMH/MIS (#A11893, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) はウマ AMH を測定できなかった (unpublished data)。ウマ AMH の測定に有用な The Active AMH-ELISA (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, USA) (27)は国内で入手できず, 現在国内で入手可能なヒト用 AMH 測定系 AMH Gen II ELISA (#A73818, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) がウマの血中濃度を検知できるかは不明である。

本章では、AMH Gen II ELISA がウマの血中 AMH 濃度を測定しうるか検証した上で、GCT 診断マーカーとしての血中 AMH の有用性を検討する。また、正常卵巣および GCT 卵巣における AMH およびその受容体の免疫組織化学的な局在性についても確認した。

3-2 材料と方法

3-2-1 ヒト用 AMH 測定系のウマへの応用性

供試動物

正常雄 2 頭 (2 歳および 4 歳), GCT 馬 2 頭 (6 歳および 8 歳) の血清および正常雌 2 頭 (6 歳および 13 歳) の卵胞液を用いた。

血液および卵胞液の採取

血液は頸静脈から真空採血管を用いて採取し, 4°C, 1880g にて 10 分間遠心分離した後, 血清を測定まで -20°C で保存した。卵胞液は排卵前 (排卵誘発剤としてヒト絨毛性ゴナドトロピン 5000 IU 静脈内投与後 32 時間) の卵胞液を経膣超音波ガイド下にて吸引した(75)。

血中および卵胞液中 AMH 濃度の測定

AMH 濃度はサンドイッチ法を原理とする市販の ELISA キット, AMH Gen II ELISA (#A73818, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) を用いて測定した。抗 AMH 抗体が固相された 96 穴プレートに各規定濃度の AMH 標準液, コントロール, 検体を 20 μ l ずつに入れた。高濃度の検体については, 測定結果が標準曲線に収まるよう標準希釈液を用いて希釈した。プレートシェーカー上で 2 時間のインキュベート後, プレートウォッシャーにて洗浄し, ビオチンで標識された抗 AMH 抗体を加えた。同じくプレートシェーカー上で 1 時間のインキュベート, 洗浄後にストレプトアビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体を加えた。さらに 30 分のインキュベート, 洗浄後, テトラメチルベンジン基質を加え, その 8-12 分後に酸性反応停止液を加えた。酵素反応の程度はマイクロプレート分光光度計 (Multiskan Go, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) によって 450 および 615 nm の 2 重波吸光度測定によつ

て測定した。測定下限値は 0.16 ng/ml であり、本研究においては計算上それ以下を 0 ng/ml とした。全ての血清検体は 2 重測定を実施した。本測定系のアッセイ内およびアッセイ間変動係数はそれぞれ 5.6% および 5.4% 以下である。

十分な AMH 濃度が期待される正常雄 2 頭、GCT 雌 2 頭の血清および正常雌 2 頭の卵胞液を段階希釈し、キット付属の AMH 標準液であるウシ AMH 精製標準液との平行性を比較した。

3-2-2 正常馬、GCT 馬および類似疾患馬の血中 AMH 濃度

供試動物

GCT 馬として卵巢の腫大および対側卵巢の萎縮を伴い、発情周期の停止を認め、後日病理組織学的に GCT と診断した馬 16 頭 (9.7±6.1 歳, 2.6±3.8 産, 平均値±SD) を用いた。また、GCT と同じく卵巢腫大を呈し、臨床獣医師が GCT の可能性を疑った類似疾患馬 24 頭 (14.2±5.4 歳, 6.4±3.7 産, 平均値±SD) を用いた。類似疾患馬は病理学的な診断をしていないものの、後に受胎性を確認できたことから GCT を否定した。対照として JRA 日高育成牧場 (北海道、浦河) で繋養されている健常馬 10 頭 (8.9±3.7 歳, 4.8±2.9 産, 平均値±SD) における発情期、黄体期、妊娠前期、妊娠後期の血液を測定した。

採血

正常馬においては毎週採血を行い、その血中プロゲステロン濃度から発情周期を特定した。黄体期はプロゲステロン濃度が 1ng/ml 以上の時を、また発情期はプロゲステロン濃度が 1ng/ml 以下であり、前後に正常なプロゲステロン値の上昇が認められたものを用いた。妊娠前期および後期として妊娠 100 日齢、250 日齢前後の血液を用いた。血液検体は頸静脈から真空採血管を用いて採血し、4℃、1880g にて 10 分間遠心分離し、血清を測定まで-20℃で保存した。

血中 AMH 濃度の測定

上記 3-2-1 と同様に行った。

統計解析

正常馬, GCT 馬, 類似疾患馬の血中 AMH 濃度の有意差を検定するため, 一元配置分散分析を行った後, 多重比較検定法として Tukey's HSD test を用いた。有意水準は 5%とし, $p < 0.05$ で有意差ありと判断した。これらの検定は JMP software (SAS 研究所日本(株), 東京) を用いた。測定値は平均値 \pm SE (標準誤差) で表記した。

3-2-3 GCT 馬における卵巣摘出術後の血中 AMH 濃度の推移

供試動物

卵巣摘出術を実施した GCT 馬 11 頭 (7.9 \pm 3.6 歳, 1.9 \pm 2.8 産, 平均値 \pm SD) を用いた。

採血

卵巣摘出術前および術後に 1 週間間隔で採血した。血液検体は頸静脈から真空採血管を用いて採血し, 4°C, 1880g にて 10 分間遠心分離した後, 血清を測定まで-20°Cで保存した。

血中 AMH 濃度の測定

上記 3-2-1 と同様に行った。

統計解析

術前術後の血清濃度の変化を検定するために, Dunnett's test を用いた。有意

水準は5%とし、 $p<0.05$ で有意差ありと判断した。これらの検定はJMP software (SAS 研究所日本(株), 東京) を用いた。測定値は平均値±SE (標準誤差) で表記した。

3-2-4 正常および GCT 卵巣における AMH, AMHR2 免疫組織化学的局在

供試動物

正常馬 (栃木県の競走馬総合研究所にて繋養される 12 歳) は本調査とは無関係な事案により 6 月に安楽殺された際に、GCT 馬 (北海道の民間生産牧場に繋養される 5 歳) は 8 月に卵巣摘出術を行った際に摘出した卵巣を用いた。

免疫組織化学的染色

卵巣組織は 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液にて固定後アルコール上昇系列により脱水し、キシレンにて透徹、パラフィン包埋した。4 μm に薄切し免疫組織化学的染色 (以下、免疫染色) を施した。免疫染色は AMH および AMHR2 の発現を検出するため行い、過去にウマ精巣で報告されているアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体法 (ABC 法) を用いた(12)。1 次抗体には抗ヒト AMH ヤギポリクローナル抗体 (sc-6886, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) および抗ヒト AMHR2 ウサギポリクローナル抗体 (AP7111a; AB-GENT; San Diego, CA, USA) を用いた。陰性対照には 1 次抗体の代わりに PBS を用いた。ABC 染色の後、ヘマトキシリンで核染色した。

全ての実験は日高育成牧場の実験動物管理委員会の承認を得て行った。

3-3 結果

3-2-1 ヒト用 AMH 測定系のウマへの応用性

段階的に希釈した血清および卵胞液の測定吸光度は AMH 標準液と平行な用量反応性を示した (図 3-1)。

3-3-2 正常馬, GCT 馬および類似疾患馬の血中 AMH 濃度

正常馬の血中 AMH 濃度は, 発情期 0.53 ± 0.07 ng/ml, 黄体期 0.55 ± 0.07 ng/ml, 妊娠前期 0.21 ± 0.08 ng/ml, 妊娠後期 0.51 ± 0.11 ng/ml であり, 類似疾患馬は 0.79 ± 0.29 ng/ml であった。これらに対し, GCT 馬は 827.85 ± 371.63 ng/ml と有意な高値を示した ($p < 0.01$) (図 3-2)。類似疾患のうち 3 例で 1 ng/ml 以上とやや高い値を示した (表 3-1)。

3-3-3 GCT 馬における卵巣摘出術後の血中 AMH 濃度の推移

術前の血清中 AMH 濃度 827.9 ± 371.6 ng/ml を 100% とすると, 1 週間後には $21.3 \pm 3.3\%$, 2 週間後には $1.9 \pm 0.4\%$ と低下した (図 3-3)。

3-3-4 正常および GCT 卵巣における AMH, AMHR2 免疫組織化学的局在

AMH は正常卵巣において卵胞を覆う顆粒層細胞に限定して好染を認めた。GCT 卵巣においては増殖した顆粒層細胞において強く発現した。AMHR2 においても, 正常卵巣, GCT 卵巣ともに顆粒層細胞に限局して発現し, 局在は AMH と一致していた (図 3-4, 5)。

3-4 考察

本章は国内で流通しているヒト用 AMH 測定系がウマにおいても応用可能であるか検討した上で、正常馬と GCT 馬の血中 AMH 濃度を比較し、GCT 診断マーカーとしての有用性について検証した。

AMH は糖タンパクであり、ステロイドホルモンと異なり動物種差が大きいと考えられる。実際、本キットの前製品である EIA AMH/MIS (#A11893, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) はウマに応用できなかった。そこで、国内で入手可能なヒト用 AMH 測定系、AMH Gen II ELISA を用いてウマの血中および卵胞液中 AMH 濃度を測定できるか検討したところ、AMH 標準液と平行な用量反応性が認められた。両キットで用いる抗体は異なるため、それがウマ AMH への交差性に影響したと考えられる。このことから、本測定系によりウマの血中 AMH 濃度を測定できることが明らかとなった。

正常馬における測定結果から、血中 AMH 濃度は発情周期、妊娠に影響されないことが示された。季節繁殖性動物における血中 AMH 濃度の季節性変化については、ヒツジにおいてわずかに変化することが報告されているのみである(70)。ウマにおいてもその影響が考えられるが本研究では日照時間の影響は検討できなかった。

GCT 診断マーカーとしての有用性を検討するためには正常馬との比較のみならず、鑑別すべき類似疾患症例と比較する必要がある。本研究では臨床獣医師が GCT の可能性を疑った類似疾患馬 24 頭を用いた。卵巢の大きさは矮小から小児頭大に腫大したものまであり、超音波所見は多胞性 8 例、血腫様・充実性 6 例、静止 1 例、不明 9 例であった。これらは病理学的な検索は行えず確定診断には至らなかったが、いずれもその後の受胎性が確認できたことから GCT を否定した。GCT の超音波画像は蜂の巣様以外に実質様、血腫様また小さい場合もあるなど多様性があることが知られているため、臨床獣医師が鑑別に悩む類似

疾患としては卵巣嚢腫、血腫さらには卵巣静止などが含まれると考えられる。類似疾患馬の血中 AMH 濃度は正常馬よりも高い傾向があり、多くは正常馬と同程度であるものの、3.1, 4.1, 5.5 ng/ml と比較的高値を示すウマが存在した(表 3-1)。これらはいずれも当年から翌々年かけて受胎した。3 頭中 2 頭は腫大卵巣が正常に戻り、その際には血中 AMH 濃度も低下することを確認した。このことから、一過性の卵巣腫大(臨床現場では卵巣嚢腫と総称される)においても血中 AMH が上昇しうることを示された。しかしながら、GCT 馬の最低値は 7.6 ng/ml, 類似疾患の最高値は 5.5 ng/ml と、両群の値は交差しなかった。そのため現時点においては 5.5-7.6 ng/ml の間が GCT 診断の判断基準となる。以上のことから、血中 AMH はウマ GCT の診断マーカーとして有用であることが判明した。従来のホルモン検査法であるインヒビンやテストステロンは GCT 馬でも高値を示さず、判定が困難なことがある(10, 65, 68, 118)。特に診断率が高いインヒビンは動物種差が大きく、国内でウマインヒビンを測定できる施設は極めて限られる。これに対し、本研究で用いた AMH 測定系は国内で入手可能な ELISA キットであり、ヒト用の検査センターでも用いられていることから、利用しやすい。

また、GCT 馬の卵巣摘出後の血中 AMH 濃度は術前と比べて有意に低下した。1 週間後の AMH 値は個体によって術前の 10-40% とバラツキがあった。これは、特に術前値の高低と関連しなかった。このバラツキは希釈倍率の違いが原因かもしれない。本測定系は測定範囲が 0.16-22.5 ng/ml であり、高濃度の GCT 検体では 1, 5, 10, 20, 100 さらに 500 倍と倍率の異なる希釈を行った。さらに本調査においては全検体を一括測定していないため、希釈倍率の違いに加え、測定間誤差も影響し、このようなバラツキが生じたと考えられる。ヒトにおいて卵巣摘出を行った際の半減期は 27.6 時間であり(41)、5 日後には 95% が消失する(41)。本研究では 1 週間後に 88.7% が、2 週間後に 98.1% が消失した。1 週間後における消失速度がヒトよりも遅い理由については、ヒトでは両側卵巣を切除

しているのに対し、本研究は片側のみの切除であることが影響していると考えられる。

免疫組織化学染色によって正常卵巣および GCT 卵巣の顆粒層細胞が AMH および AMHR2 陽性を示した。卵巣において AMH は初期卵胞の発育抑制(34, 36)や主席卵胞の選択(35)に関与すると考えられている。AMH が所属する TGF- β superfamily は体内で広く発現するのに対して AMH は高い組織特異性をもつ(97)。また、TGF- β superfamily の受容体は一般に細胞膜上の 1 型受容体と 2 型受容体が複合体を形成して機能するが、AMH の 1 型受容体は今日までその存在が報告されておらず、2 型受容体 (AMHR2) しか同定されていない。AMH と AMHR2 は精巣セルトリ細胞と卵巣顆粒層細胞において共発現する(97)。AMHR2 単独での発現はげっ歯類(61, 85)とヒト(63)のライディヒ細胞においてのみ報告されている。ウマにおいては卵巣顆粒層細胞(13)および精巣セルトリ細胞(12)で AMH 発現が報告されている。本研究では正常卵巣および GCT 卵巣の顆粒層細胞において AMH と AMHR2 の共発現を認めた。このことから、他種で従来言われているとおり、ウマにおいても胎子期のミューラー管と同様(108)、AMH が自己分泌もしくは傍分泌により顆粒層細胞自身に作用していることが示唆された。

以上のことから、本章では国内で入手可能なヒト用 AMH 測定系がウマにおいても応用可能であり、AMH はウマ GCT における簡便で明瞭な診断マーカーであることが示唆された。

3-5 図表

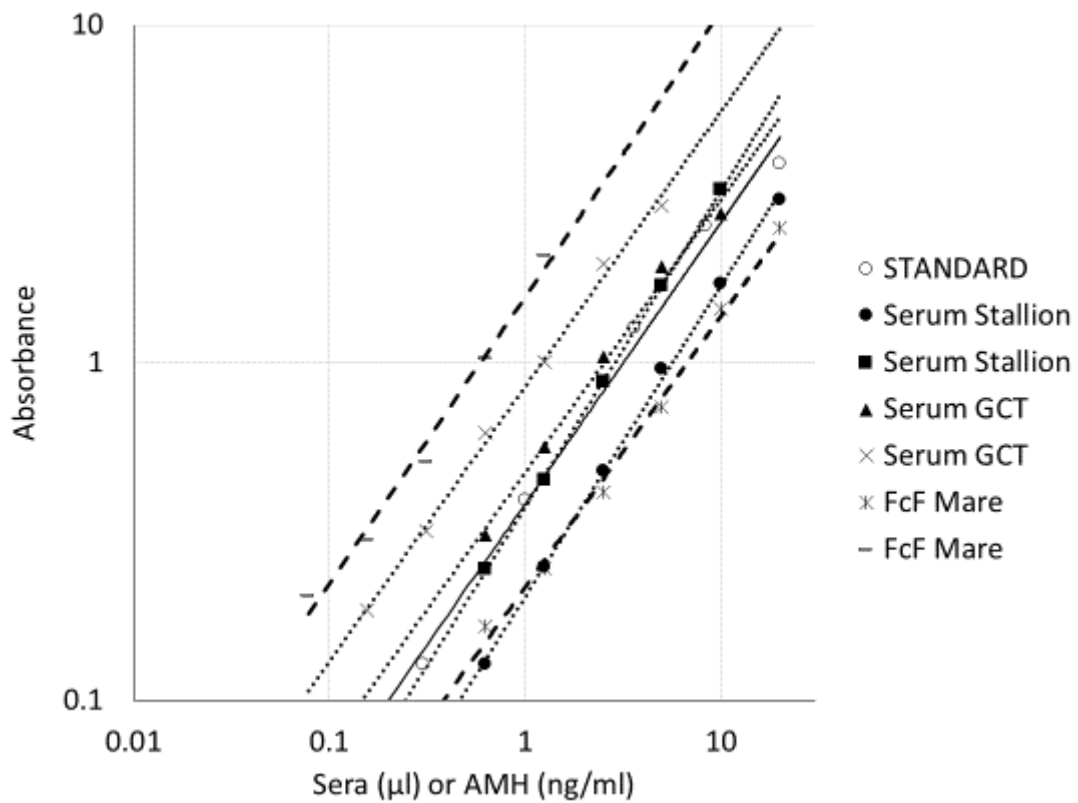


図 3-1 AHM 標準液とウマ血清および卵胞液の平行性

段階希釈した GCT 馬血清（点線）および正常馬卵胞液（破線）は AMH 標準液（実線）に対して平行な用量反応性を示した。横軸は標準液においては AMH 濃度 (ng/ml) を、検体においては血清量 (μl) を示す。

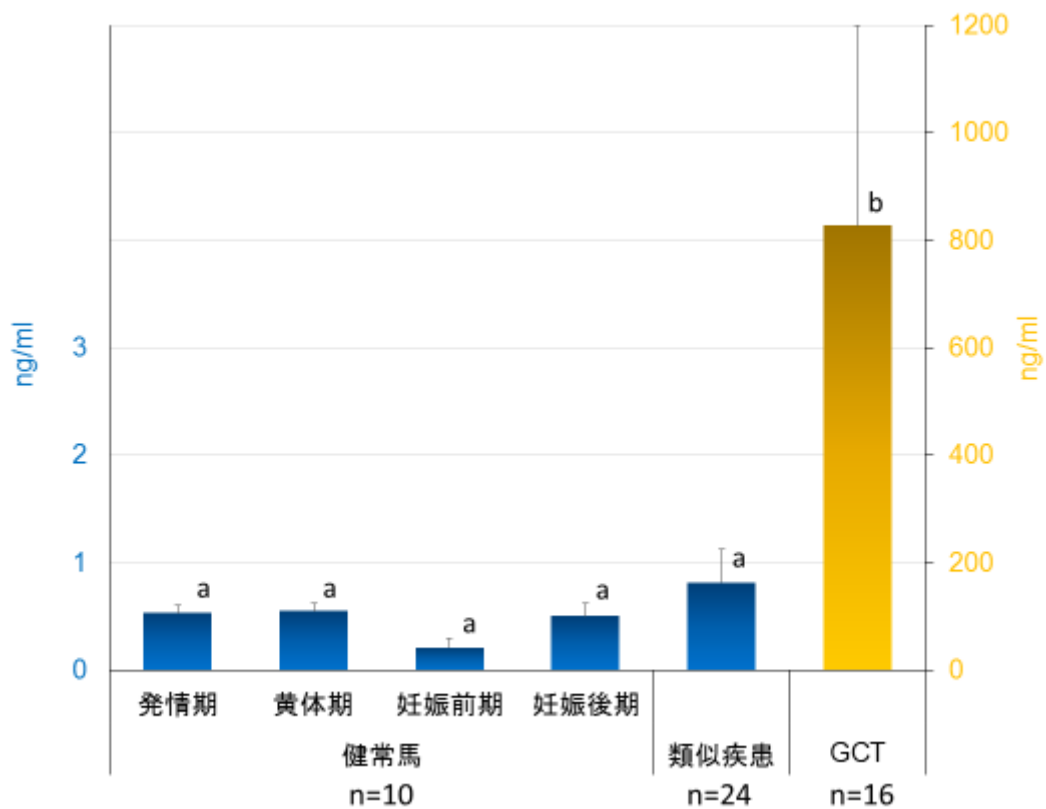


図 3-2 正常馬，類似疾患馬，GCT 馬の血中 AMH 濃度

血中 AMH 濃度は発情周期，妊娠による影響を受けず，また健常馬および類似疾患馬に対して GCT 馬では有意な高値を示した。データは平均値±標準誤差。a,b：異なる文字間には有意差を示す。

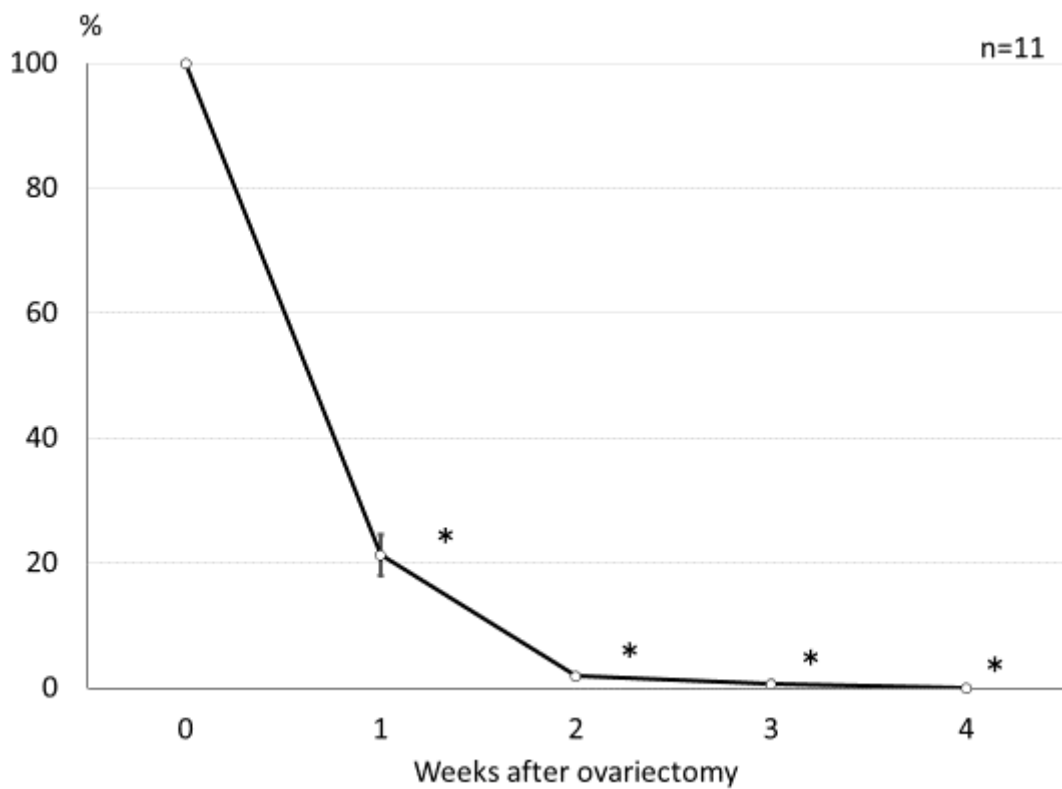


図 3-3 卵巣摘出後の血中 AMH 濃度の推移

それぞれ術前値を 100%とする。アスタリスク (*) は術前との有意差($p < 0.05$)を示す。

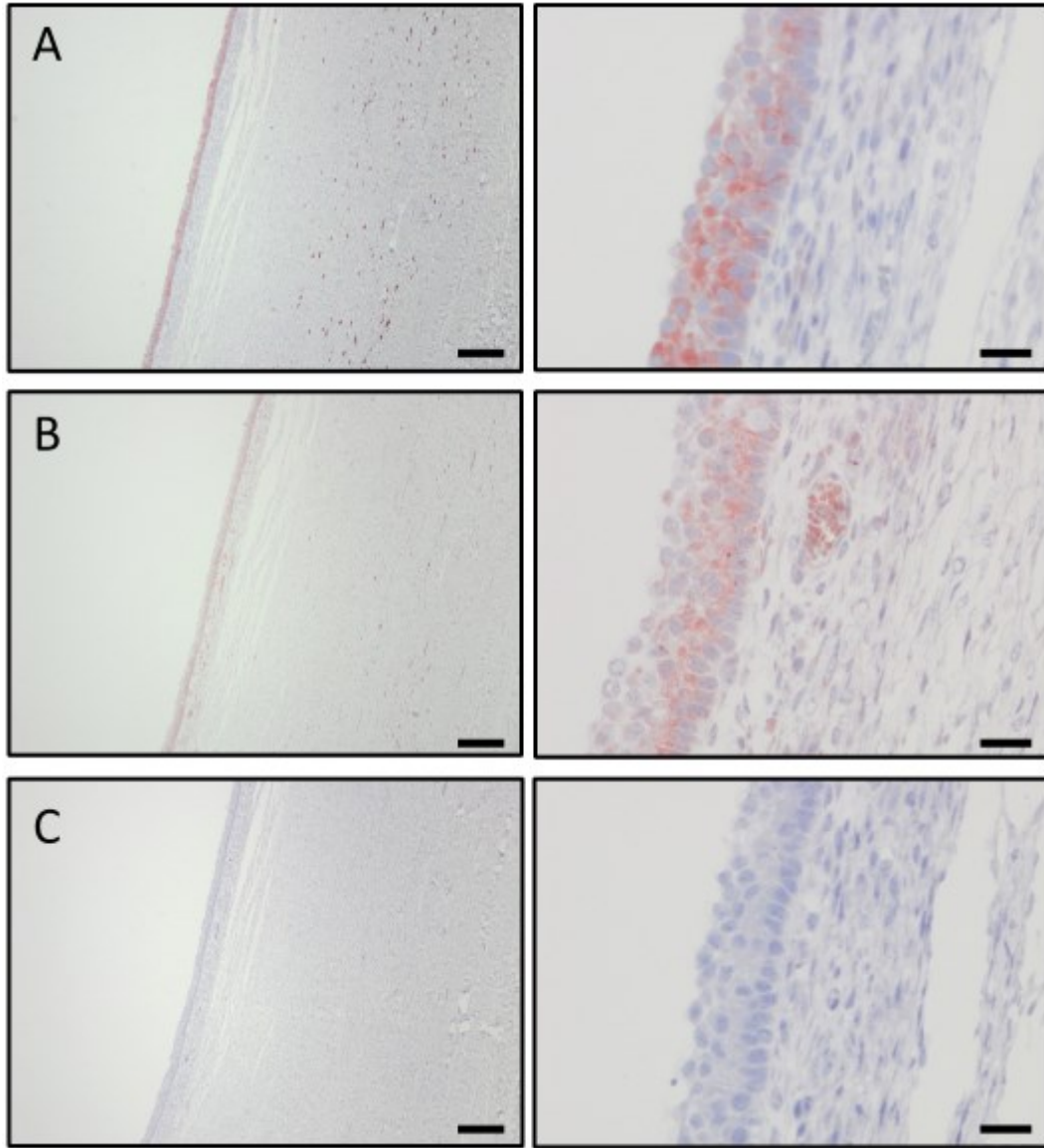


図 3-4 正常卵巣の AMH および AMHR2 免疫組織化学的染色

(A) AMH, (B) AMHR2 そして (C) PBS を用いた陰性対照を示す。それぞれ左に弱拡大像 (Scale bars = 200 μm), 右に強拡大像 (Scale bars = 20 μm) を示す。AMH, AMHR2 とともに顆粒層細胞に限局的に好染した。

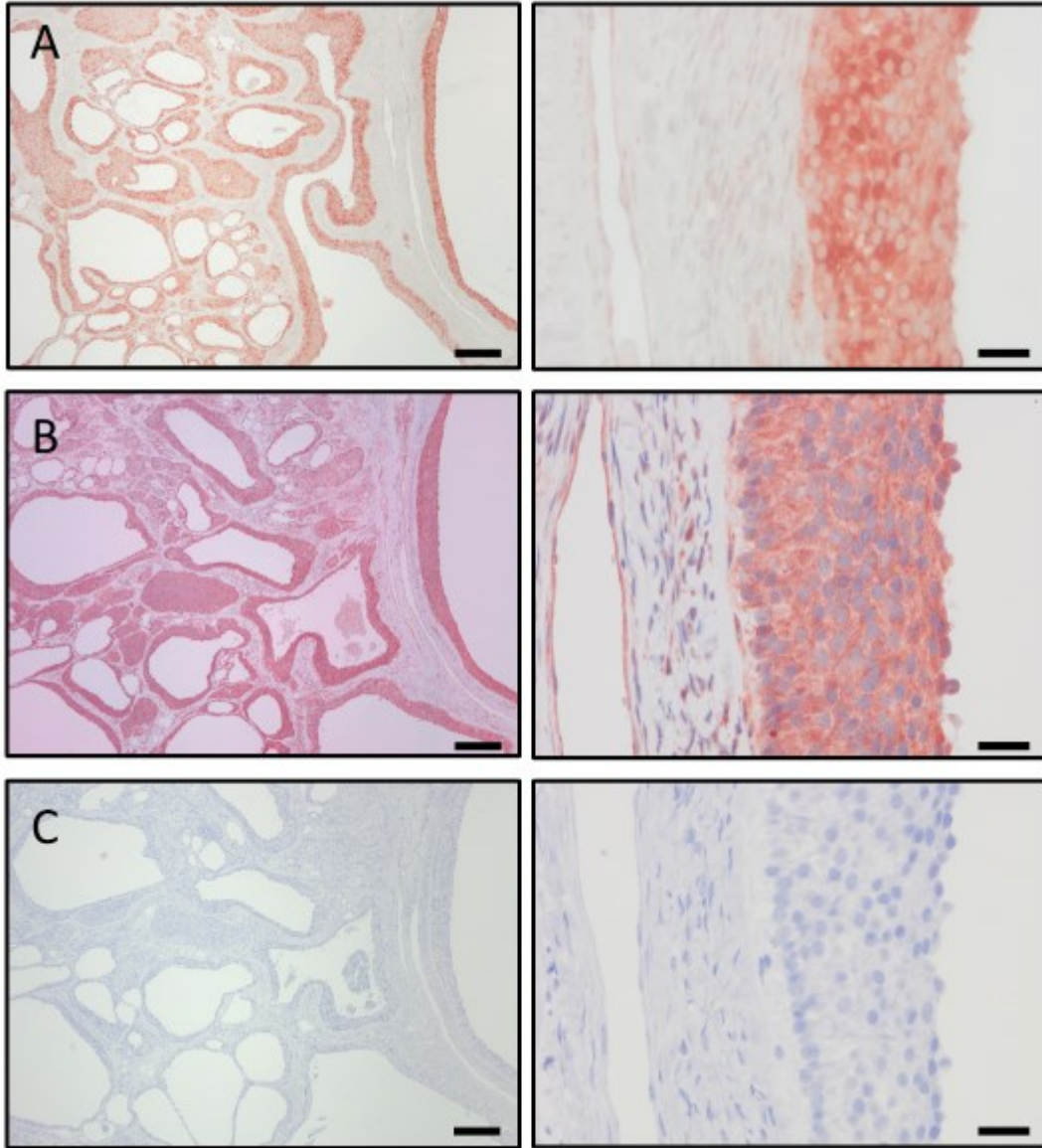


図 3-5 GCT 卵巣の AMH および AMHR2 免疫組織化学的染色

(A) AMH, (B) AMHR2 そして (C) PBS を用いた陰性対照を示す。それぞれ左に弱拡大像 (Scale bars = 200 μm), 右に強拡大像 (Scale bars = 20 μm) を示す。AMH, AMHR2 とともに腫瘍性に増殖した顆粒層細胞に限局的に好染した。

表 3-1 類似疾患馬の所見

	AMH濃度 (ng/ml)	卵胞サイズ	USD所見	対側卵巢	予後
A馬	3.1	?	血腫様	機能	翌年も腫大卵巢残るが、対側の排卵で受胎 その後AMH未計測
B馬	4.1	?	多胞状	機能	当年受胎 翌年、正常サイズとなりAMH0.91ng/ml
C馬	5.5	人頭大	無エコー	機能	当年受胎 翌年、腫大卵巢残るが対側の排卵で受胎。 2年後、正常サイズとなりAMH0.72ng/ml

第4章

血中抗ミューラー管ホルモン測定による

片側性ウマ潜在精巣の診断

4-1 背景と目的

第3章では抗ミュラー管ホルモン（Anti-Müllerian hormone, AMH）の雌における分泌源が顆粒層細胞であることに着目し，血中 AMH が顆粒膜細胞腫の診断マーカーとなりうるか検証した。一方，雄において AMH はセルトリ細胞のみから分泌する。そのため，セルトリ細胞腫の診断マーカーとなりうると考えられるが，軽種馬飼育における雄生殖器疾患としてはセルトリ細胞腫が問題となることは少なく，しばしば潜在精巣が問題になる。

潜在精巣とは，通常起こる精巣下降が生じず，一方もしくは両側とも陰嚢内に精巣がないものを言う。まれに片側性潜在精巣のウマが不適切な去勢術によって下降精巣側のみ摘出されることで（Hemi-Castrated Unilateral Cryptorchism, 以下 HCUC 馬），雄であるにもかかわらず騏馬と誤認される場合がある。雄と騏馬の鑑別には超音波検査や血中ホルモン濃度測定が行われるが，いずれも確実ではない(6, 7, 30-32, 50, 101)。

AMH はセルトリ細胞由来であることから，血中 AMH の検出は精巣組織の存在を示唆し，ヒトにおいて潜在精巣と無辜丸症を鑑別に有用とされる(43, 59, 60)。本章ではこの点に着目し，血中 AMH 濃度の測定が HCUC 馬と騏馬の鑑別診断マーカーとして有用であるか検討した。また，正常精巣および潜在精巣における AMH の局在を免疫組織学的に検索した。

4-2 材料と方法

4-2-1 正常馬, HCUC 馬, 騏馬の血中 AMH 濃度

供試動物

正常馬 11 頭 (サラブレッド種, 15.4 ± 6.4 歳, 平均値 \pm SD), 騏馬 6 頭 (サラブレッド種, 11.2 ± 4.9 歳, 平均値 \pm SD) それに HCUC 馬 8 頭 (サラブレッド種 4 頭, ポニー 2 頭, クォーターホース 1 頭, ウェストファール種 1 頭, 6.3 ± 3.2 歳, 平均値 \pm SD) を用いた。HCUC 馬は去勢した履歴があり, 外見上陰嚢内に精巣が認められないものの, 雄性行動から潜在精巣を疑い, 外科的に腹腔内に停留した精巣を確認した馬と定義した。本研究は国内数か所において HCUC が疑われた症例について紹介のあった獣医師との共同研究として, 日高育成牧場実験動物管理委員会の承認を得て実施した。

採血

正常馬と騏馬の採血は 4 月に行った。一方, HCUC 馬は臨床獣医師から相談を受けた時期によって 2, 3, 4, 7 それに 8 月に採血した。血液検体は頸静脈から真空採血管を用いて採血され, 4°C , 1880g にて 10 分間遠心分離された後, 血清を測定まで -20°C で保存した。

統計解析

正常馬, HCUC 馬, 騏馬の血中 AMH 濃度の有意差を検定するため, 一元配置分散分析を行った後, 多重比較検定法として Tukey's HSD test を用いた。有意水準は 5% とし, $p < 0.05$ で有意差ありと判断した。これらの検定は JMP software (SAS 研究所日本株式会社, 東京) を用いた。測定値を平均 \pm 標準誤差 (Standard Error, SE) で表記する。

4-2-2 正常馬における去勢術後の血中 AMH 濃度の推移

供試動物

正常馬（サラブレッド種 4 頭， 2.3 ± 0.5 歳，平均値 \pm SD）に対して去勢術を実施し，術後の血中濃度の推移を調べた。

採血

去勢術は 6 月および 10 月に実施し，術前から術後 4 日目までは毎日，以後 2 日毎に 2 週間後まで毎日採血した。血液検体は頸静脈から真空採血管を用いて採血し， 4°C ， 1880g にて 10 分間遠心分離した後，血清を測定まで -20°C で保存した。

統計解析

術前術後の血清濃度の変化を検定するために，Dunnett's test を用いた。有意水準は 5% とし， $p < 0.05$ で有意差ありと判断した。これらの検定は JMP software（SAS 研究所日本(株)，東京）を用いた。

4-2-3 正常精巣および潜在精巣における AMH の免疫組織化学的局在

供試動物

正常精巣は 10 月に 4 歳サラブレッド種の陰嚢内から，潜在精巣は 7 月に 4 歳ポニーの腹腔内からそれぞれ去勢術時に得た。

免疫組織化学的染色

精巣組織は 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液にて固定後アルコール上昇系列により脱水し，キシレンにて透徹，パラフィン包埋した。4 μm に薄切し免疫組織化学的染色（以下，免疫染色）を施した。免疫染色は AMH の発現を検出するために行い，過去にウマ精巣で報告されているアビジン-ビオチン-ペ

ルオキシダーゼ複合体法 (ABC 法) を用いた(12)。1 次抗体には抗ヒト AMH ヤギポリクローナル抗体 (sc-6886, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を用いた。陰性対照として, 1 次抗体をブロッキングペプチド (sc-6886P, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) と混合し (1:5; w:w), 4°C にて一昼夜おいた後に用いた。ABC 染色の後, ヘマトキシリンで核染色した。

全ての実験は日高育成牧場の実験動物管理委員会の承認を得て行った。

4-3 結果

4-3-1 正常馬, HCUC 馬, 騏馬の血中 AMH 濃度

騏馬はいずれも 0 ng/ml であったが, 正常馬と HCUC 馬の血中 AMH 濃度はそれぞれ 13.3 ± 1.8 ng/ml (1.7-21.9 ng/ml), 17.6 ± 3.0 ng/ml (3.1-28.2 ng/ml) と騏馬より有意に高かった ($p < 0.05$) (図 4-1)。正常馬と HCUC 馬の間に有意な差は認められなかった。

4-3-2 正常馬における去勢術後の血中 AMH 濃度の推移

4 頭の去勢術前の血清 AMH 濃度はそれぞれ 8.7, 9.1, 11.3 および 27.0 ng/ml であった。術後 AMH 濃度は低下し, 術前を 100%とした際の術後の推移は 1 日目 $79.9 \pm 4.7\%$, 2 日目 $60.2 \pm 4.0\%$ および 3 日目 $44.5 \pm 3.6\%$ であった。手術翌日には術前よりも有意に低下し, 生物学的半減期はおよそ 2.5 日であった (図 4-2)。

4-3-3 正常精巣および潜在精巣における AMH の免疫組織化学的局在

潜在精巣は正常精巣と比べて精子形成細胞の層が薄く, 精細管の直径が小さく, 間質が広がった。免疫組織化学的な AMH 発現はセルトリ細胞で認められたが精原細胞では認められなかった。また, 染色性は潜在精巣より正常精巣において強かった (図 4-3A, B)。

4-4 考察

本章では血中 AMH 濃度が HCUC 馬と騏馬の鑑別マーカーとして有用であるか検証した。

血中 AMH はこれまでの報告(27)と同様、正常馬で検出され、騏馬では検出下限である 0.16 ng/ml を下回り、検出されなかった。正常馬と HCUC 馬の AMH 濃度はそれぞれ 13.3 ± 1.8 および 17.6 ± 3.0 ng/ml であり、HCUC 馬の方が高い傾向にあったものの有意差は認められなかった。一方、DSL 測定系 The Active AMH ELISA (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, USA) を用いた報告では、正常馬は 15 ng/ml であるのに対し、潜在精巢馬は 33 ng/ml と有意に高い(27)。この違いの原因は、対側の精巢の存在と採血時期が異なるためと考えられる。本研究における HCUC 馬はいずれも対側の正常精巢がなかったのに対し、Claes らの報告(27)においては正常精巢が残存するウマ、摘出されたウマ、潜在するウマが混在している。本研究では正常精巢が確実に存在しない分、AMH 濃度が低くなったと考えられる。雄における血中 AMH 濃度は日照時間による影響を受け、長日期は短日期よりも約 1.7 倍高い(27)。本研究においては、雄が長日期の 4 月採取であるのに対して HCUC 馬はさまざまであったため、HCUC 馬で低くなりうる。また、本結果は DSL 測定系を用いた Claes らの測定値よりも低く、これはヒトにおいて AMH Gen II 測定系は DSL 測定系よりおよそ 40% 高い(117)という報告と矛盾する。この点について、Claes らの報告(27)は採取時期を示していないため厳密な比較は困難であるが、対象馬の年齢が影響しているかもしれない。ウマでもヒト同様に成熟前は成熟後よりも血中 AMH 濃度が高い(27)。本調査における正常馬は 15.4 ± 6.4 歳であるのに対し、Claes らの報告(27)では 2 歳以上と定義されていることから、本研究の方が高齢であり、正常馬の AMH 濃度が低い可能性が考えられる。潜在精巢馬についても上術の通り対側精巢の有無から本研究対象馬で低く見積もられている可能性が考えら

れ、これらの要因が測定系の違いを上回ったのかもしれない。

従来の検査法である安静時テストステロン濃度やエストロン濃度、それに hCG 負荷試験などは騏馬と雄の測定値が交差するため、誤診するケースがある(6, 7, 30-32)。また、ホルモン濃度は測定系によって値が異なるため、結果の解釈には熟練を要する。一方、AMH は騏馬では検出されず、HCUC 馬では検出されたことから、騏馬と HCUC 馬の境界は明瞭であった。このことから、AMH は既存の検査法よりも明確に精巢の有無を判断しうると考えられる。

去勢術後に漸減し、2週間後に検出されなくなったことから、精巢が血中 AMH の分泌に関与していることを確かめた。生物学的半減期は約 2.5 日であったが、ヒトにおいては 27.6 ± 0.8 時間と報告されており(41)、本結果より短い。本研究と同じく去勢馬を用いた調査においても 1.5 日とされているが(27)、この違いの理由については不明である。また、免疫組織学的染色により潜在精巢セルトリ細胞において AMH 陽性を認めた。これは、ウマにおいてもセルトリ細胞で発現しているという従来の報告と同様であった(12)。去勢後に血中 AMH が検出されなくなることと合わせて、精巢は雄における AMH 分泌に必須であることが示され、血中濃度の測定が精巢の有無を明確に反映することを裏付けた。

以上のことより、本章では雄における AMH 分泌は精巢に依存しており、かつ潜在精巢においても分泌されていることから、血中 AMH 濃度が潜在精巢における簡便確実な診断マーカーであることを明らかにした。

4-5 図表

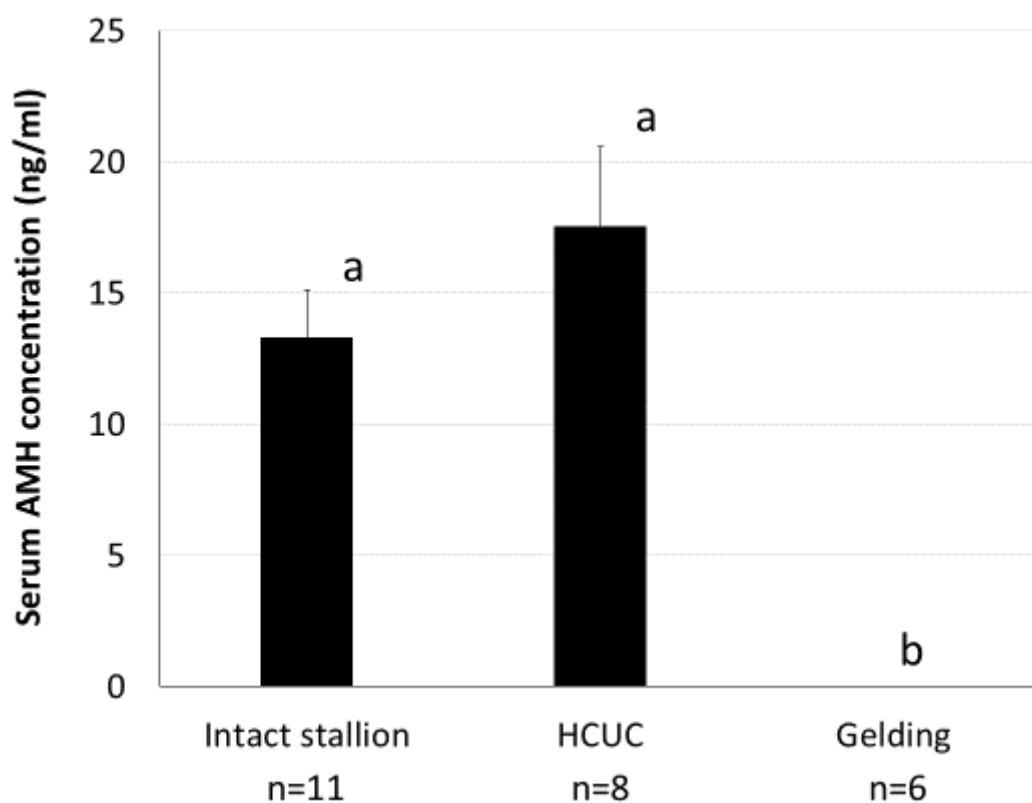


図 4-1 正常馬，HCUC 馬，去勢馬の血中 AMH 濃度

セン馬からは検出されなかった(0 ng/ml)。a, b: 異なる文字間に有意差あり ($p < 0.05$)。

データは平均値±標準誤差。

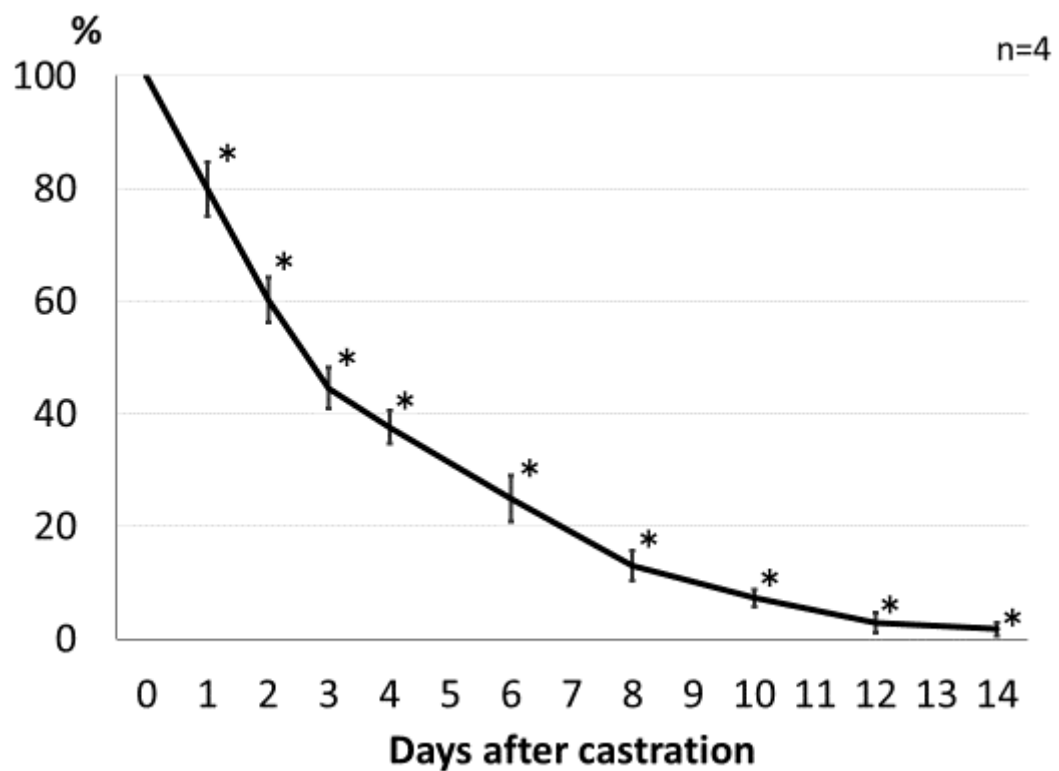


図 4-2 正常馬 4 頭における去勢術前後における血清 AMH 濃度

それぞれの術前値を 100%として術後の低下を示す。生物学的半減期はおよそ 2.5 日であった。データは平均±標準誤差。アスタリスク(*)は術前(0 日)との有意差($p < 0.05$)を示す。

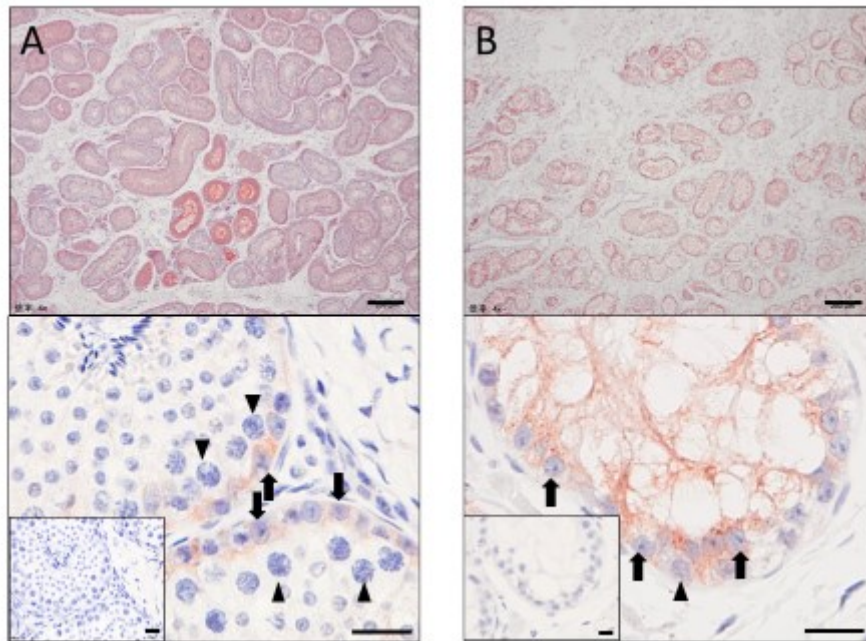


図 4-3 (A) 正常精巣および (B) 潜在精巣における AMH 免疫組織化学的染色

上段は弱拡大像を示す。潜在精巣では正常精巣と比べ、精細管径が小さく、間質が広い。また、精母細胞が少なかった。Scale bars = 200 μm 。下段は強拡大像を示す。セルトリ細胞 (矢印) において好染が認められたが、精母細胞 (矢頭) では認められない。ブロッッキングペプチドを用いた陰性対照像を挿入図で示す。Scale bars = 20 μm 。

総括

競走馬は 1 頭あたりの経済的価値が高いため、未交配や妊娠期の損耗といった生産性の低下は大きな問題となる。また、競馬施行主や乗用クラブにとって性別は重要であり、潜在精巢馬と騮馬の鑑別がしばしば問題になる。

第 1 章では妊娠馬に対する超音波検査法として、胎盤の発達、胎子の成長および生理状態に関する各種超音波指標の推移を明らかにした。検査には従来用いられていたリニア型探触子に加えて、広い視野を有するコンベックス型 3D 探触子を用い、これまでの超音波指標と比べてより詳細な推移および標準範囲を示した。また、各指標の成長曲線や描出時期が一樣ではないことを示した。このことは本検査法を臨床応用する際に重要な情報となる。未だ早期異常診断を目的とした妊娠馬定期健診は臨床現場において一般的ではないが、本結果は今後の臨床応用に向けて有用な基礎データとなりうる。

第 2 章では自然感染によって真菌性胎盤炎に罹患し流産に至った症例について、第 1 章で確立した超音波検査法を含む各種モニタリング指標の推移を示した。母体血中プロゲステロン値と CTUP は臨床症状の出現よりも先に異常を示した。さらにエストラジオール値は正常範囲内であるものの、やはり臨床症状が出現する前から変化を示した。SAA および FHR は臨床症状出現後に異常を示した。感染実験においてもプロゲステロン値と CTUP が感染性胎盤炎の早期診断に有用であるとされているが、本研究は、胎盤炎自然感染例においてそれらが臨床症状より先に検知されうることを示した。特に内分泌学的な評価においては、同一個体を反復測定し、その推移をみることでより早期の診断に有用である可能性を示した。

第3章では交配不能となる卵巢疾患、顆粒膜細胞腫（GCT）の新たな診断マーカーとして血中 AMH の有用性を評価した。はじめに、国内で広く流通しているヒト用 ELISA 測定系がウマの血中および卵胞液中 AMH を測定しうることを確かめた。さらに正常馬や類似疾患馬と比べて GCT 馬で有意に高値であったことから、血中 AMH が GCT の診断マーカーとして有用であることを示した。

第4章では雄における性腺異常として潜在精巣に注目し、特に HCUC 馬の診断マーカーとして血中 AMH の有用性を評価した。血中 AMH は正常馬と HCUC 馬で検出される一方で、騏馬からは検出されなかった。また、去勢術後における血中 AMH 濃度の低下および免疫組織化学染色における潜在精巣セルトリ細胞の AMH 発現から、潜在精巣は正常精巣と同様に AMH を分泌しており、血中 AMH が腹腔内に残存した精巣の存在を反映することを示した。以上のことから、血中 AMH は片側去勢した片側性潜在精巣症例馬においても腹腔内の精巣の存在を評価できることを示した。

本研究において、妊娠期の異常を早期に診断するための胎子超音波検査法を確立した。また胎盤炎自然発症例において、超音波検査やホルモン検査が早期診断で有用であることを明らかにした。未だ流産の早期発見を目的とした定期健診は臨床現場において普及には至っていないが、本成果は国内軽種馬生産界における今後の検査技術の発展において重要な基盤となる。また、国内で入手可能なヒト用 AMH 測定系がウマにおいても応用可能であり、その分泌動態から顆粒膜細胞腫や潜在精巣に対する、簡便で確実な診断マーカーであることを明らかとした。今回得られた知見は診断精度の向上のみならず、ウマの生産率向上に大きく貢献することが期待される。

謝辞

本研究の遂行ならびに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 博士に深く感謝すると共に，厚く御礼申し上げます。

また，本論文をご審査していただいた東京農工大学教授 渡辺 元 博士，岩手大学教授 佐藤 繁 博士，帯広畜産大学教授 山田 一孝 博士，ならびに岐阜大学教授 村瀬 哲磨 博士に深謝いたします。

乗用馬における検体を数多くご提供いただくとともに，乗馬界の現状をご教授いただいた大和高原動物診療所の齋藤 重明 獣医師，潜在精巢および顆粒膜細胞腫において多くの検体をご提供いただいた社台ホースクリニックの田上 正明 獣医師，鈴木 吏 獣医師，三石日高家畜農業共済組合の樋口 徹 博士，佐藤 正人 獣医師に深謝いたします。

日高育成牧場において，研究面で日ごろからご指導いただいた佐藤 文夫 博士，羽田 哲朗 博士，また研究室事務および研究補助をしていただいた駒澤 孝彦 氏，大野 ミキ 氏，天野 靖子 氏，加瀬 智美 氏，さらに普段の研究馬を飼育管理から研究の補助をしていただいた馬取職繁殖班の皆様に心より感謝いたします。

引用文献

- 1) Adams-Brendemuehl, C. and Pipers, F. S. (1987). Antepartum evaluations of the equine fetus. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 35, 565-573.
- 2) Akiba, T., Takeuchi, M., Yamanaka, M., Saga, N., Shibahara, T. and Kadota, K. (2005). Investigation of Causes of Equine Abortion/Stillbirth on 919 Cases in the Hidaka District of Hokkaido. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 58, 321-325.
- 3) Aksglaede, L., Sorensen, K., Boas, M., Mouritsen, A., Hagen, C. P., Jensen, R. B., Petersen, J. H., Linneberg, A., Andersson, A. M., Main, K. M., Skakkebaek, N. E. and Juul, A. (2010). Changes in anti-Mullerian hormone (AMH) throughout the life span: a population-based study of 1027 healthy males from birth (cord blood) to the age of 69 years. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 5357-5364.
- 4) Allen, W. R., Brown, L., Wright, M. and Wilsher, S. (2007). Reproductive efficiency of Flatrace and National Hunt Thoroughbred mares and stallions in England. *Equine Vet. J.* 39, 438-445.
- 5) Almeida, J., Ball, B. A., Conley, A. J., Place, N. J., Liu, I. K., Scholtz, E. L., Mathewson, L., Stanley, S. D. and Moeller, B. C. (2011). Biological and clinical significance of anti-Mullerian hormone determination in blood serum of the mare. *Theriogenology* 76, 1393-1403.
- 6) Arighi, M. (2011). Testicular Descent. *In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E. and Varner, D. D., [eds] Equine Reproduction, vol. 1, 2nd ed., pp. 1099-1106. Blackwell Publishing Ltd., West Sussex.*
- 7) Arighi, M. and Bosu, W. (1989). Comparison of hormonal methods for diagnosis in horses. *J. Equine Vet. Sci.* 9, 20-26.
- 8) Bailey, C. S., Heitzman, J. M., Buchanan, C. N., Bare, C. A., Sper, R. B., Borst, L. B., Macpherson, M., Archibald, K. and Whitacre, M. (2012). B-mode and Doppler

- ultrasonography in pony mares with experimentally induced ascending placentitis. *Equine. Vet. J. Suppl.*, 88-94.
- 9) Bailey, C. S., Macpherson, M. L., Pozor, M. A., Troedsson, M. H., Benson, S., Giguere, S., Sanchez, L. C., Leblanc, M. M. and Vickroy, T. W. (2010). Treatment efficacy of trimethoprim sulfamethoxazole, pentoxifylline and altrenogest in experimentally induced equine placentitis. *Theriogenology* 74, 402-412.
 - 10) Bailey, M. T., Troedsson, M. H. and Wheato, J. E. (2002). Inhibin concentrations in mares with granulosa cell tumors. *Theriogenology* 57, 1885-1895.
 - 11) Baker, M. L. and Hutson, J. M. (1993). Serum levels of mullerian inhibiting substance in boys throughout puberty and in the first two years of life. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76, 245-247.
 - 12) Ball, B. A., Conley, A. J., Grundy, S. A., Sabeur, K. and Liu, I. K. (2008). Expression of anti-Mullerian hormone (AMH) in the equine testis. *Theriogenology* 69, 624-631.
 - 13) Ball, B. A., Conley, A. J., MacLaughlin, D. T., Grundy, S. A., Sabeur, K. and Liu, I. K. (2008). Expression of anti-Mullerian hormone (AMH) in equine granulosa-cell tumors and in normal equine ovaries. *Theriogenology* 70, 968-977.
 - 14) Baschat, A. A. and Hecher, K. (2004). Fetal growth restriction due to placental disease. *Semin. Perinatol.* 28, 67-80.
 - 15) Behringer, R. R., Cate, R. L., Froelick, G. J., Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. (1990). Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing mullerian inhibiting substance. *Nature* 345, 167-170.
 - 16) Bergin, W. C., Gier, H. T., Frey, R. A. and Marion, G. B. (1967). Developmental horizons and measurements useful for age determination of equine embryos and fetuses. Annual Meeting of American Association of Equine Practitioners, New Orleans, pp. 179-196.
 - 17) Bergin, W. C., Gier, H. T., Marion, G. B. and Coffman, J. R. (1970). A developmental

- concept of equine cryptorchism. *Biol. Reprod.* 3, 82-92.
- 18) Betteridge, K. J., Eaglesome, M. D., Mitchell, D., Flood, P. F. and Beriault, R. (1982). Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. *J. Anat.* 135, 191-209.
 - 19) Bosh, K. A., Powell, D., Neibergs, J. S., Shelton, B. and 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.
 - 20) Brendemeuhl, J. P., Williams, M. A., Boosinger, T. R. and Ruffin, D. C. (1995). Plasma progestagens, triiodothyronine and cortisol concentrations in post date gestation foals exposed in utero to tall fescue endophyte *Acremonium coenophialum*. *Biol. Reprod. Mono.* 1, 53-59.
 - 21) Bruck, I., Anderson, G. A. and Hyland, J. H. (1993). Reproductive performance of thoroughbred mares on six commercial stud farms. *Aust. Vet. J.* 70, 299-303.
 - 22) Bucca, S. (2011). Ultrasonographic Monitoring of the Fetus. *In:* McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E. and Varner, D. D., [eds] *Equine Reproduction*, vol. 1, 2nd ed., pp. 39-54. Wiley-Blackwell, Iowa.
 - 23) Bucca, S., Fogarty, U., Collins, A. and Small, V. (2005). Assessment of feto-placental well-being in the mare from mid-gestation to term: transrectal and transabdominal ultrasonographic features. *Theriogenology* 64, 542-557.
 - 24) Canisso, I. C., Ball, B. A., Troedsson, M. H., Cray, C., Davolli, G. M., Squires, E. L. and Williams, N. M. (2014). Acute phase proteins and total leukocyte counts in blood of mares with experimentally induced ascending placentitis. *J. Equine Vet. Sci.* 34, 215.
 - 25) Canisso, I. F., Ball, B. A., Cray, C., Williams, N. M., Scoggin, K. E., Davolli, G. M., Squires, E. L. and Troedsson, M. H. (2014). Serum amyloid A and haptoglobin concentrations are increased in plasma of mares with ascending placentitis in the

- absence of changes in peripheral leukocyte counts or fibrinogen concentration. *Am. J. Reprod. Immunol.* 72, 376-385.
- 26) Card, C. E. (2011). Ovarian Neoplasia. *In: Angus O.McKinnon, Edward L.Squires, Wendy E.Vaala and Dickson D.Varner, [eds] Equine Reproduction, vol. 2, 2nd ed., pp. 2707-2715. Blackwell Publishing Ltd., West Sussex.*
- 27) Claes, A., Ball, B. A., Almeida, J., Corbin, C. J. and Conley, A. J. (2013). Serum anti-Mullerian hormone concentrations in stallions: developmental changes, seasonal variation, and differences between intact stallions, cryptorchid stallions, and geldings. *Theriogenology* 79, 1229-1235.
- 28) Cole, H. H., Hart, G. H., Lyons, W. R. and Catchpole, H. R. (1933). The development and hormonal content of fetal horse gonads. *Anat. Rec.* 56, 275-293.
- 29) Coutinho da Silva, M. A., Canisso, I. F., MacPherson, M. L., Johnson, A. E. and Divers, T. J. (2013). Serum amyloid A concentration in healthy periparturient mares and mares with ascending placentitis. *Equine Vet. J.* 45, 619-624.
- 30) Cox, J. E. (1975). Experiences with a Diagnostic Test for Equine Cryptorchidism. *Equine Vet. J.* 7, 179-183.
- 31) Cox, J. E., Redhead, P. H. and Dawson, F. E. (1986). Comparison of the measurement of plasma testosterone and plasma oestrogens for the diagnosis of cryptorchidism in the horse. *Equine Vet. J.* 18, 179-182.
- 32) Cox, J. E., Williams, J. H., Rowe, P. H. and Smith, J. A. (1973). Testosterone in normal, cryptorchid and castrated male horses. *Equine Vet. J.* 5, 85-90.
- 33) Cullinan, J. A., Hertzberg, B. S. and Lee, W. (2003). AIUM Practice Guideline for the performance of an antepartum obstetric ultrasound examination. *J. Ultrasound Med.* 22, 1116-1125.
- 34) Durlinger, A. L., Gruijters, M. J., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H. A., Nachtigal, M. W., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A. and Themmen, A. P. (2002).

- Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 143, 1076-1084.
- 35) Durlinger, A. L., Gruijters, M. J., Kramer, P., Karels, B., Kumar, T. R., Matzuk, M. M., Rose, U. M., de Jong, F. H., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A. and Themmen, A. P. (2001). Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 142, 4891-4899.
- 36) Durlinger, A. L., Kramer, P., Karels, B., de Jong, F. H., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A. and Themmen, A. P. (1999). Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 140, 5789-5796.
- 37) Evans, H. E. and Sack, W. O. (1973). Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. *Zentralbl Veterinarmed C* 2, 11-45.
- 38) Fanchin, R., Schonauer, L. M., Righini, C., Guibourdenche, J., Frydman, R. and Taieb, J. (2003). Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum. Reprod.* 18, 323-327.
- 39) Giles, R. C., Donahue, J. M., Hong, C. B., Tuttle, P. A., Petrites-Murphy, M. B., Poonacha, K. B., Roberts, A. W., Tramontin, R. R., Smith, B. and Swerczek, T. W. (1993). Causes of abortion, stillbirth, and perinatal death in horses: 3,527 cases (1986-1991). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203, 1170-1175.
- 40) Ginther, O. J. (1995). *Ultrasonic imaging and animal reproduction*. vol., Equiservices Publishing, Wisconsin.
- 41) Griesinger, G., Dafopoulos, K., Buendgen, N., Cascorbi, I., Georgoulas, P., Zavos, A., Messini, C. I. and Messinis, I. E. (2012). Elimination half-life of anti-Mullerian hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 2160-2163.
- 42) Grubb, D. K. and Paul, R. H. (1992). Amniotic fluid index and prolonged antepartum

- fetal heart rate decelerations. *Obstet. Gynecol.* 79, 558-560.
- 43) Guibourdenche, J., Lucidarme, N., Chevenne, D., Rigal, O., Nicolas, M., Luton, D., Leger, J., Porquet, D. and Noel, M. (2003). Anti-Mullerian hormone levels in serum from human fetuses and children: pattern and clinical interest. *Mol. Cell. Endocrinol.* 211, 55-63.
- 44) Hendriks, W. K., Colenbrander, B., van der Weijden, G. C. and Stout, T. A. (2009). Maternal age and parity influence ultrasonographic measurements of fetal growth in Dutch Warmblood mares. *Anim. Reprod. Sci.* 115, 110-123.
- 45) Henneke, D. R., Potter, G. D., Kreider, J. L. and Yeates, B. F. (1983). Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Vet. J.* 15, 371-372.
- 46) Hong, C. B., Donahue, J. M., Giles, R. C., Jr., Petrites-Murphy, M. B., Poonacha, K. B., Roberts, A. W., Smith, B. J., Tramontin, R. R., Tuttle, P. A. and Swerczek, T. W. (1993). Equine abortion and stillbirth in central Kentucky during 1988 and 1989 foaling seasons. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 560-566.
- 47) Hong, C. B., Donahue, J. M., Giles, R. C., Jr., Petrites-Murphy, M. B., Poonacha, K. B., Roberts, A. W., Smith, B. J., Tramontin, R. R., Tuttle, P. A. and Swerczek, T. W. (1993). Etiology and pathology of equine placentitis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 56-63.
- 48) Houghton, E., Holtan, D., Grainger, L., Voller, B. E., Rosedale, P. D. and Ousey, J. C. (1991). Plasma progestagen concentrations in the normal and dysmature newborn foal. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 44, 609-617.
- 49) Hutson, J. M. and Donahoe, P. K. (1986). The hormonal control of testicular descent. *Endocr Rev* 7, 270-283.
- 50) Jann, H. W. and Rains, J. R. (1990). Diagnostic ultrasonography for evaluation of cryptorchidism in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196, 297-300.
- 51) Josso, N., Cate, R. L., Picard, J. Y., Vigier, B., di Clemente, N., Wilson, C., Imbeaud,

- S., Pepinsky, R. B., Guerrier, D., Boussin, L., Legeal, L. and Carreousebe, D. (1993). Anti-mullerian hormone: the Jost factor. *Recent Prog. Horm. Res.* 48, 1-59.
- 52) Jost, A. (1953). Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Prog. Horm. Res.* 8, 379-418.
- 53) Jost, A., Vigier, B. and Prepin, J. (1972). Freemartins in cattle: the first steps of sexual organogenesis. *J Reprod Fertil* 29, 349-379.
- 54) Kasman, L. H., Hughes, J. P., Stabenfeldt, G. H., Starr, M. D. and Lasley, B. L. (1988). Estrone sulfate concentrations as an indicator of fetal demise in horses. *Am. J. Vet. Res.* 49, 184-187.
- 55) Kotoyori, Y., Yokoo, N., Ito, K., Murase, H., Sato, F., Korosue, K. and Nambo, Y. (2012). Three-dimensional ultrasound imaging of the equine fetus. *Theriogenology* 77, 1480-1486.
- 56) LeBlanc, M. M. (2010). Ascending placentitis in the mare: an update. *Reprod. Domest. Anim.* 45 Suppl 2, 28-34.
- 57) LeBlanc, M. M., Giguere, S., Lester, G. D., Brauer, K. and Paccamonti, D. L. (2012). Relationship between infection, inflammation and premature parturition in mares with experimentally induced placentitis. *Equine. Vet. J. Suppl.*, 8-14.
- 58) Lee, M. M., Donahoe, P. K., Hasegawa, T., Silverman, B., Crist, G. B., Best, S., Hasegawa, Y., Noto, R. A., Schoenfeld, D. and MacLaughlin, D. T. (1996). Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 571-576.
- 59) Lee, M. M., Donahoe, P. K., Silverman, B. L., Hasegawa, T., Hasegawa, Y., Gustafson, M. L., Chang, Y. C. and MacLaughlin, D. T. (1997). Measurements of serum mullerian inhibiting substance in the evaluation of children with nonpalpable gonads. *N. Engl. J. Med.* 336, 1480-1486.
- 60) Lee, M. M., Misra, M., Donahoe, P. K. and MacLaughlin, D. T. (2003). MIS/AMH in

- the assessment of cryptorchidism and intersex conditions. *Mol. Cell. Endocrinol.* 211, 91-98.
- 61) Lee, M. M., Seah, C. C., Masiakos, P. T., Sottas, C. M., Preffer, F. I., Donahoe, P. K., MacLaughlin, D. T. and Hardy, M. P. (1999). Mullerian-inhibiting substance type II receptor expression and function in purified rat Leydig cells. *Endocrinology* 140, 2819-2827.
- 62) Macpherson, M. L. (2005). Treatment strategies for mares with placentitis. *Theriogenology* 64, 528-534.
- 63) Masiakos, P. T., MacLaughlin, D. T., Maheswaran, S., Teixeira, J., Fuller, A. F., Jr., Shah, P. C., Kehas, D. J., Kenneally, M. K., Dombkowski, D. M., Ha, T. U., Preffer, F. I. and Donahoe, P. K. (1999). Human ovarian cancer, cell lines, and primary ascites cells express the human Mullerian inhibiting substance (MIS) type II receptor, bind, and are responsive to MIS. *Clin. Cancer. Res.* 5, 3488-3499.
- 64) Matsui, K., Sugano, S. and Masuyama, I. (1985). Changes in the fetal heart rate of thoroughbred horse through the gestation. *Nihon Juigaku Zasshi* 47, 597-601.
- 65) McCue, P. M. (1992). Equine granulosa cell tumors. Annual Meeting of the American Association of Equine Practitioners, Orlando, FL, USA, pp. 587-593.
- 66) McCue, P. M. (1998). Neoplasia of the female reproductive tract. *Vet. Clin. North. Am. Equine Pract.* 14, 505-515.
- 67) McCue, P. M. (1998). Review of Ovarian Abnormalities in the Mare. Annual Meeting of the American Association of Equine Practitioners, Baltimore, Maryland, USA, pp. 125-133.
- 68) McCue, P. M., Roser, J. F., Munro, C. J., Liu, I. K. and Lasley, B. L. (2006). Granulosa cell tumors of the equine ovary. *Vet. Clin. North. Am. Equine Pract.* 22, 799-817.
- 69) Meagher, D. M., Wheat, J. D., Hughes, J. P., Stabenfeldt, G. H. and Harris, B. A. (1977). Granulosa cell tumors in mares -a review of 78 cases. Annual Meeting of the

- American Association of Equine Practitioners, Vancouver, British Columbia, pp. 133-143.
- 70) Monniaux, D., Baril, G., Laine, A. L., Jarrier, P., Poulin, N., Cognie, J. and Fabre, S. (2011). Anti-Mullerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. *Reproduction* 142, 845-854.
- 71) Moore, T. R. and Cayle, J. E. (1990). The amniotic fluid index in normal human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 162, 1168-1173.
- 72) Morresey, P. R. (2011). The Placenta. *In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E. and Varner, D. D., [eds] Equine Reproduction, vol. 1, 2nd ed., pp. 84-95. Wiley-Blackwell, Iowa.*
- 73) Morris, S., Kelleman, A. A., Stawicki, R. J., Hansen, P. J., Sheerin, P. C., Sheerin, B. R., Paccamonti, D. L. and LeBlanc, M. M. (2007). Transrectal ultrasonography and plasma progesterin profiles identifies fetoplacental compromise in mares with experimentally induced placentitis. *Theriogenology* 67, 681-691.
- 74) Nagel, C., Aurich, J. and Aurich, C. (2010). Determination of heart rate and heart rate variability in the equine fetus by fetomaternal electrocardiography. *Theriogenology* 73, 973-983.
- 75) Nambo, Y., Hashimoto, K., Nakai, R., Asai, Y., Watanabe, G. and Taya, K. (2006). Biological significance of follicular fluid discharged into the peritoneal cavity at ovulation in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 94, 228-231.
- 76) Newnham, J. P., Patterson, L. L., James, I. R., Diepeveen, D. A. and Reid, S. E. (1990). An evaluation of the efficacy of Doppler flow velocity waveform analysis as a screening test in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 162, 403-410.
- 77) Ousey, J. C. (2006). Hormone profiles and treatments in the late pregnant mare. *Vet. Clin. North. Am. Equine Pract.* 22, 727-747.
- 78) Ousey, J. C., Houghton, E., Grainger, L., Rosedale, P. D. and Fowden, A. L. (2005).

- Progesterone profiles during the last trimester of gestation in Thoroughbred mares with normal or compromised pregnancies. *Theriogenology* 63, 1844-1856.
- 79) P.O.E.mueller and A.H.Parks (1999). Cryptorchidism in horses. *Equine Vet. Educ.* 11, 77-86.
- 80) Pashen, R. L., Sheldrick, E. L., Allen, W. R. and Flint, A. P. (1982). Dehydroepiandrosterone synthesis by the fetal foal and its importance as an oestrogen precursor. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 32, 389-397.
- 81) Pipers, F. S. and Adams-Brendemuehl, C. S. (1984). Techniques and applications of transabdominal ultrasonography in the pregnant mare. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 185, 766-771.
- 82) Platt, H. (1975). Infection of the horse fetus. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 605-610.
- 83) Platt, H. (1978). Growth and maturity in the equine fetus. *J. R. Soc. Med.* 71, 658-661.
- 84) Platt, H. (1984). Growth of the equine foetus. *Equine Vet. J.* 16, 247-252.
- 85) Racine, C., Rey, R., Forest, M. G., Louis, F., Ferre, A., Huhtaniemi, I., Josso, N. and di Clemente, N. (1998). Receptors for anti-mullerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 594-599.
- 86) Raeside, J. I., Gofton, N., Liptrap, R. M. and Milne, F. J. (1982). Isolation and identification of steroids from gonadal vein blood of the fetal horse. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 32, 383-387.
- 87) Raeside, J. I., Liptrap, R. M., McDonell, W. N. and Milne, F. J. (1979). A precursor role for DHA in a feto-placental unit for oestrogen formation in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 493-497.
- 88) Reef, V. B. (1998). Fetal ultrasonography. *In*: Reef, V. B., [eds] *Equine diagnostic ultrasound*. pp. 425-445. Saunders, Philadelphia.

- 89) Reef, V. B., Vaala, W. E., Worth, L. T., Sertich, P. L. and Spencer, P. A. (1996). Ultrasonographic assessment of fetal well-being during late gestation: development of an equine biophysical profile. *Equine Vet. J.* 28, 200-208.
- 90) Reef, V. B., Vaala, W. E., Worth, L. T., Spencer, P. A. and Hammett, B. (1995). Ultrasonographic evaluation of the fetus and intrauterine environment in healthy mares during late gestation. *Vet. Radiol. Ultrasound* 36, 533-541.
- 91) Renaudin, C. D., Gillis, C. L., Tarantal, A. F. and Coleman, D. A. (2000). Evaluation of equine fetal growth from day 100 of gestation to parturition by ultrasonography. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 651-660.
- 92) Renaudin, C. D., Troedsson, M. H., Gillis, C. L., King, V. L. and Bodena, A. (1997). Ultrasonographic evaluation of the equine placenta by transrectal and transabdominal approach in the normal pregnant mare. *Theriogenology* 47, 559-573.
- 93) Rey, R., Lukas-Croisier, C., Lasala, C. and Bedecarras, P. (2003). AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 211, 21-31.
- 94) Roser, J. F., McCue, P. M. and Hoye, E. (1994). Inhibin activity in the mare and stallion. *Domest. Anim. Endocrinol.* 11, 87-100.
- 95) Rossdale, P. D., McGladdery, A. J., Ousey, J. C., Holdstock, N., Grainger, L. and Houghton, E. (1992). Increase in plasma progestagen concentrations in the mare after foetal injection with CRH, ACTH or betamethasone in late gestation. *Equine Vet. J.* 24, 347-350.
- 96) Rossdale, P. D., Ousey, J. C., Cottrill, C. M., Chavatte, P., Allen, W. R. and McGladdery, A. J. (1991). Effects of placental pathology on maternal plasma progestagen and mammary secretion calcium concentrations and on neonatal adrenocortical function in the horse. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 44, 579-590.
- 97) Salhi, I., Cambon-Roques, S., Lamarre, I., Laune, D., Molina, F., Pugniere, M.,

- Pourquier, D., Gutowski, M., Picard, J. Y., Xavier, F., Pelegrin, A. and Navarro-Teulon, I. (2004). The anti-Mullerian hormone type II receptor: insights into the binding domains recognized by a monoclonal antibody and the natural ligand. *Biochem. J.* 379, 785-793.
- 98) Shikichi, M., Iwata, K., Ito, K., Murase, H., Sato, F., Korosue, K., Nagata, S. and Nambo, Y. (2015). Diagnosis of abnormal pregnancy by serum progestins and estrogens in late pregnant mares. *J. Equine Vet. Sci.* 34, 231-233.
- 99) Smith, K. C., Blunden, A. S., Whitwell, K. E., Dunn, K. A. and Wales, A. D. (2003). A survey of equine abortion, stillbirth and neonatal death in the UK from 1988 to 1997. *Equine Vet. J.* 35, 496-501.
- 100) Stawicki, R. J., Ruebel, H., Hansen, P. J., Sheerin, B. R., O'Donnell, L. J., Lester, G. D., Paccamonti, D. L. and LeBlanc, M. M. (2002). Endocrinological findings in an experimental model of ascending placentitis in the mare. *Theriogenology* 58, 849-852.
- 101) Stickle, R. L. and Fessler, J. F. (1978). Retrospective study of 350 cases of equine cryptorchidism. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172, 343-346.
- 102) Stuart, B., Drumm, J., FitzGerald, D. E. and Duignan, N. M. (1980). Fetal blood velocity waveforms in normal pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 87, 780-785.
- 103) Sundberg, J. P., Burnstein, T., Page, E. H., Kirkham, W. W. and Robinson, F. R. (1977). Neoplasms of Equidae. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 170, 150-152.
- 104) Takahashi, M., Koide, S. S. and Donahoe, P. K. (1986). Mullerian inhibiting substance as oocyte meiosis inhibitor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 47, 225-234.
- 105) Taketo, T., Saeed, J., Nishioka, Y. and Donahoe, P. K. (1991). Delay of testicular differentiation in the B6.YDOM ovotestis demonstrated by immunocytochemical staining for mullerian inhibiting substance. *Dev Biol* 146, 386-395.
- 106) Troedsson, M. H. and Macpherson, M. L. (2011). Placentitis. *In: McKinnon, A. O.,*

- Squires, E. L., Vaala, W. E. and Varner, D. D., [eds] Equine Reproduction, vol. 2, 2nd ed., pp. 2359-2367. Wiley-Blackwell, Iowa.
- 107) Trudinger, B. J., Cook, C. M., Giles, W. B., Ng, S., Fong, E., Connelly, A. and Wilcox, W. (1991). Fetal umbilical artery velocity waveforms and subsequent neonatal outcome. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 98, 378-384.
- 108) Tsuji, M., Shima, H., Yonemura, C. Y., Brody, J., Donahoe, P. K. and Cunha, G. R. (1992). Effect of human recombinant mullerian inhibiting substance on isolated epithelial and mesenchymal cells during mullerian duct regression in the rat. *Endocrinology* 131, 1481-1488.
- 109) Turner, R. M., McDonnell, S. M., Feit, E. M., Grogan, E. H. and Foglia, R. (2006). Real-time ultrasound measure of the fetal eye (vitreous body) for prediction of parturition date in small ponies. *Theriogenology* 66, 331-337.
- 110) Ueno, S., Manganaro, T. F. and Donahoe, P. K. (1988). Human recombinant mullerian inhibiting substance inhibition of rat oocyte meiosis is reversed by epidermal growth factor in vitro. *Endocrinology* 123, 1652-1659.
- 111) Ueno, S., Takahashi, M., Manganaro, T. F., Ragin, R. C. and Donahoe, P. K. (1989). Cellular localization of mullerian inhibiting substance in the developing rat ovary. *Endocrinology* 124, 1000-1006.
- 112) Vaala, W. E. (2011). Monitoring the High-Risk Pregnancy. *In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E. and Varner, D. D., [eds] Equine Reproduction, vol. 1, 2nd ed., pp. 16-24. Wiley-Blackwell, Iowa.*
- 113) van Rooij, I. A., Broekmans, F. J., Scheffer, G. J., Looman, C. W., Habbema, J. D., de Jong, F. H., Fauser, B. J., Themmen, A. P. and te Velde, E. R. (2005). Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil. Steril.* 83, 979-987.
- 114) van Rooij, I. A., Broekmans, F. J., te Velde, E. R., Fauser, B. C., Bancsi, L. F., de Jong,

- F. H. and Themmen, A. P. (2002). Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum. Reprod.* 17, 3065-3071.
- 115) van Rooij, I. A., Tonkelaar, I., Broekmans, F. J., Looman, C. W., Scheffer, G. J., de Jong, F. H., Themmen, A. P. and te Velde, E. R. (2004). Anti-mullerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. *Menopause* 11, 601-606.
- 116) Vigier, B., Watrin, F., Magre, S., Tran, D. and Josso, N. (1987). Purified bovine AMH induces a characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it in vitro. *Development* 100, 43-55.
- 117) Wallace, A. M., Faye, S. A., Fleming, R. and Nelson, S. M. (2011). A multicentre evaluation of the new Beckman Coulter anti-Mullerian hormone immunoassay (AMH Gen II). *Ann. Clin. Biochem.* 48, 370-373.
- 118) Watson, E. D., Heald, M., Leask, R., Groome, N. P. and Riley, S. C. (2002). Detection of high circulating concentrations of inhibin pro- and -alphaC immunoreactivity in mares with granulosa-theca cell tumours. *Equine Vet. J.* 34, 203-206.
- 119) Williams, W. L. (1943). *Diseases of the genital organs of domestic animals*. vol., 3rd ed., Ethel Williams Plimpton Publishing Co., Massachusetts.
- 120) 南保泰雄 (2011). 生産地疾病等調査研究—繁殖牝馬の早期胚死滅に関する研究—報告書 (2007年から2009年). *馬の科学* 48, 240-246.