

乳牛の黄体血流量に基づく  
新規受胎牛選定法と超早期妊娠診断法に関する研究

2016 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科  
(岩手大学)

金澤 朋美

## 目次

緒言	1
第1章 ホルスタイン種受胎牛における胚移植（ET）時の黄体血流量を用いた受胎牛選定	
1-1. 序論	6
1-2. 試験 1：ET 時の黄体血流面積（BFA）を用いた受胎牛選定方法の検討	7
1) 材料及び方法	7
2) 結果	13
1-3. 試験 2：ET 時の BFA を用いた受胎牛選定方法の再現性の検証	15
1) 材料及び方法	15
2) 結果	17
1-4. 考察	18
1-5. 小括	21
図表	22
第2章 ホルスタイン種受胎牛における ET 後の黄体血流量を用いた超早期妊娠診断	
2-1. 序論	39
2-2. 材料及び方法	39
2-3. 結果	42

2-4. 考察	43
2-5. 小括	46
図表	47
第3章 性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）製剤投与による黄体血流量と超早期妊娠診断精度への影響	
3-1. 序論	54
3-2. 材料及び方法	55
3-3. 結果	58
3-4. 考察	60
3-5. 小括	64
図表	65
第4章 総括	81
謝辞	88
参考文献	89

## 略語表

P <sub>4</sub>	:	Progesterone (プロジェステロン)
E <sub>2</sub>	:	Estradiol-17 $\beta$ (エストラジオール)
CL	:	Corpus luteum (黄体)
DF	:	Dominant follicle (主席卵胞)
GnRH	:	Gonadotropin-releasing hormone (性腺刺激ホルモン放出ホルモン)
hCG	:	Human chorionic gonadotropin (ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン)
FSH	:	Follicle stimulating hormone (卵胞刺激ホルモン)
LH	:	Luteinizing hormone (黄体形成ホルモン)
BFA	:	Blood flow area (血流面積)
TAMV	:	Time-averaged maximum velocity (時間平均最大血流速度)
VEGF	:	Vascular endothelial growth factor (血管内皮細胞増殖因子)
FGF	:	Basic fibroblast growth factor (線維芽細胞増殖因子)
BCS	:	Body condition scores (ボディーコンディションスコア)
ET	:	Embryo transfer (胚移植)
AI	:	Artificial insemination (人工授精)
EIA	:	Enzyme immune assay (酵素免疫測定法)
HRP	:	ペルオキシダーゼ
OPD	:	オルソフェニレンジアミン
PG	:	Prostaglandin (プロスタグランジン)

## 緒言

ウシは古くから世界中で食用や農耕に用いられ、2013 年の国際連合食糧農業機関（FAO）の統計では、世界で 14 億 6800 万頭が飼養されている。日本では、弥生時代から稲作が広まり、それとともに田畑を耕す際の貴重な労働力としてウシが重用された。明治時代以降、食肉文化の普及、定着に伴い、飼養頭数が増加し、2015 年の農林水産省の統計によれば、乳用牛 137 万頭、肉用牛 249 万頭が日本で飼養されている。主に、乳用牛としてホルスタイン種牛、肉用牛として黒毛和種牛が飼養され、生乳、乳製品と肉が生産されている。現代では、食糧に加え、牛皮が衣料として、糞尿が堆肥肥料の原料として利用され、ウシはヒトの生活には欠くことのできない重要な家畜である。

肉用牛繁殖農家では、雌牛を妊娠、分娩させ、その子牛を子牛市場で販売する。肉用牛肥育農家では購入した肥育素牛を 2 年間飼育後出荷し、肉を販売することで収益を得ている。また、酪農家においても、乳用牛が分娩することで初めて生乳を搾ることができ、生乳と生まれた子牛を販売することで収益を得ている。つまり、肉や生乳の生産のためには、雌牛が妊娠、分娩することが必要であり、雌牛が効率良く妊娠、分娩を繰り返し、1 年 1 産を実現することが経営上重要となる。日本においては、1950 年に家畜改良増殖法が制定され、人工授精（AI）普及の基礎が確立し、現在ではほとんどの乳用牛および肉用牛が AI によって生産されている（34）。しかしながら、近年、日本のみならず世界各地で AI の受胎率が年々低下し（42, 44）、肉用牛農家と酪農家の経済的な損失に繋がっている（32）。受胎率の低下の原因として、発情兆候の微弱化、発情発現時間の短縮（43）とそれに伴う発情発見率の低下、早期胚死滅（9,14）等が考えられている。特に、乳用牛では、高泌乳化とそれに伴う乾物摂取量の増加により肝臓への血流が増加し、肝臓のステロイド代謝

が亢進し (92, 98), 発情兆候が微弱化, 血中プロジェステロン ( $P_4$ ) 濃度が減少して受胎率の低下が引き起こされていると考えられている (42, 44)。

妊娠の成立と維持に重要な役割を果たしている  $P_4$  は, ヒトをはじめとした多くの哺乳類に広く存在し, 主に卵巢の黄体から分泌される。ウシにおいて, 妊娠の成立と継続には, 機能的な黄体が存在し  $P_4$  が維持されることが必要である (45, 57, 60)。実際, ウシでは  $P_4$  の生産母地である黄体を含む卵巢を妊娠早期に除去すると妊娠が継続できない (88)。そのため, 黄体機能の障害とそれに伴う子宮内  $P_4$  濃度の低下も受胎率の低下の原因の 1 つとして考えられている (46)。 $P_4$  を産生する黄体は, 生体内において最も血管に富んだ組織の 1 つであり (97), 卵巢動脈から分岐するらせん動脈が黄体を取り囲むように血管網を発達させている (40, 100)。排卵後内卵胞膜から発達した血管が排卵窩へと侵入して血管網を構築し, 黄体細胞へ血液を供給する。この血管新生は, 黄体細胞で  $P_4$  を生合成するために必要な基質の輸送と  $P_4$  を全身循環へ運搬するために必要である (11)。従って, 黄体の血管形成はウシの妊娠成立と維持に必要不可欠であり, 血管形成の多寡が黄体機能の維持, 妊娠の成否に関与していると考えられる。

ウシの生産性をより向上させる目的で, 1970 年代後半から胚移植 (ET) 技術が急速に実用化された (85)。近年では, 遺伝的改良や希少精液の有効利用, 性判別胚の効率的な生産等を目的として広く普及し (8, 86), ET は AI と同様に子牛の生産方法として一般的に行われている。具体的には, 肉質や産乳性が優れた雌牛に性腺刺激ホルモン剤の投与による過剰排卵誘起処置を行い, 優良な種雄牛を交配することで胚を生産する。回収された胚を他のウシに移植することで, 効率的に優良な遺伝形質を持つ後継牛を生産することができる。そのため, 採胚頭数, ET 頭数ともに年々増加しており, 2014 年の農林水産省の統計によると, 日本において採胚は 14000 頭, ET は 96000 頭で行われている。また, 近年性選別精液が開発され, 乳

用種の後継雌牛が安定的に生産できるようになった。さらに、黒毛和種子牛は、乳用種子牛や交雑種子牛に比較して 2～5 倍高値で販売されている。そのため、日本では酪農家において黒毛和種牛から生産された胚の移植が増加している。また、暑熱期においては、卵子の質の低下 (3), 受精率の低下 (70), 受精直後の胚の死滅 (17, 70) により AI の受胎率が低下する。これに対して、ET は暑熱期における受胎率が AI に比較して高いことから、暑熱期での利用も進められている (7)。しかしながら、ET の受胎率は 1980 年代から改善しておらず、凍結胚に比較して受胎率の高い新鮮胚においても約 50%である (27, 57)。特に、未經産牛に比較して経産牛の受胎率が低い (79, 82)。

以前より、ET の受胎に影響する要因の解析が進められ (12, 28, 57, 64),  $P_4$  はウシの ET においても受胎に影響を及ぼす主要な要因であるとされている (57, 64)。しかしながら、 $P_4$  の測定には時間と経費が掛かるため、臨床現場において血中  $P_4$  濃度を基準とした受胎牛の選定を行うことは困難である。黄体面積 (最大直径で測定した黄体断面積) は血中  $P_4$  濃度と相関しているため、超音波診断装置を用いて黄体面積を計測することで  $P_4$  の測定の代用になると言われている (4, 36, 65)。そのため、現在、ET 前に直腸検査や超音波診断装置によって計測された黄体面積は、受胎牛の選定基準となっている。しかしながら、黄体面積を指標とした受胎牛の選定では受胎率の向上に繋がっておらず、その利用には限界があると考えられる。子牛を効率的に生産するため、新たな黄体機能評価方法の確立と ET の受胎率の向上が求められている。

近年、新しい黄体機能の評価方法として、黄体の血流量が着目されている (30, 52)。黄体の血流量は超音波ドプラ法を用いて測定することができる。超音波ドプラ法は、ドプラ効果を利用し血流を視覚化することで、通常の Brightness (B) -モードで得られる組織の断面像に加えて、非侵襲的に血管の評価を行うことができる

(49, 76)。このことから、1990年代からウシやウマでの臨床診断技術への応用が試みられてきた(10, 49)。また、卵巢の血流を描出することができるため、排卵前の卵胞や形成期または退行期の黄体の血流動態が研究されてきた(1, 2, 30)。黄体形成期には黄体の成長とともに血流量が増加し(1, 30)、黄体退行期には一過性の激増とその後に速やかな減少が起こることが明らかとなっている(2)。また、黄体退行期において血中  $P_4$  濃度の低下は黄体面積の減少に先行する(30)。これに対して、黄体血流量と血中  $P_4$  濃度の消長は同調していることから、黄体機能の評価方法としての有用性が示唆されている(30, 52)。しかしながら、現在まで受胎牛における ET 前後の黄体血流量の変化や受胎との関連性は明らかになっておらず、黄体血流量は受胎牛選定の指標として使用されていない。

ところで、ウシにおける妊娠診断は、AI 後 40 日以降に直腸検査により胎膜スリップを確認することで行われてきた(90)。2000 年代に入り携帯型超音波診断装置が普及し、AI 後 25–29 日以降に黄体の存在や胎子および胎子心拍の確認に基づいて早期妊娠診断が行われるようになってきている(26, 87)。しかし、ウシの発情周期は平均 21 日であるため、現在の早期妊娠診断では不妊であった場合は次の発情を見落とす可能性があり、繁殖効率の低下の原因となっている。従って、発情周期の 21 日より前の妊娠診断(超早期妊娠診断)方法を確立することができれば発情発見率、授精率および受胎率の向上に繋がるものと考えられる。

一方、以前より AI 後または ET 前後に性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)製剤を投与し、受胎率を向上させる試みが行われてきた。GnRH は、生体内において視床下部で産生、分泌され、ウシの繁殖機能を制御する視床下部・脳下垂体・卵巢軸において重要な役割を果たしている(16)。GnRH は脳下垂体に作用し黄体形成ホルモン(LH)と卵胞刺激ホルモン(FSH)の産生と分泌を刺激し、これらが卵巢へと作用し卵胞発育、排卵および黄体形成を促進する(16)。そのため、GnRH 製



剤は、臨床現場において卵巣静止、排卵障害および卵胞嚢腫の治療に一般的に用いられている。AI 後または ET 前後の GnRH 製剤の投与による、受胎性や血中 P<sub>4</sub> 濃度に対する効果に関して数多くの研究がなされているが、その結果は一様ではない (31, 54, 62, 72, 73, 91)。GnRH 製剤の投与により LH が急増し、共存する直径 10 mm 以上の主席卵胞が排卵し、副黄体が形成される (69, 72, 73, 94)。それにより、血中 P<sub>4</sub> 濃度が増加するという報告 (72, 73) もあるが、増加しないという報告 (83) もある。また、受胎率が向上するという報告 (73, 83, 91) もあるが、受胎率の向上が認められないとする報告 (21) もある。また、LH の分泌が刺激されることから、既存の黄体機能を賦活すると考えられるが、黄体機能の維持に重要である黄体血流量に対する効果は全く明らかになっていない。

本研究では、妊娠の成立に必須である P<sub>4</sub> の産生には黄体の血管形成が重要であることから、黄体血流量の評価が受胎牛の妊娠予測つまり ET 前の受胎性の評価や ET 後の超早期妊娠診断に有用ではないかと考えた。そこで第 1 章では、受胎牛と不受胎牛における ET 前から ET 時の黄体血流量を比較し、黄体血流量が新たな受胎牛選定方法として有用であるかを検討し、従来から用いられている黄体面積や血漿 P<sub>4</sub> 濃度との精度の比較を行った。その結果、ET 時の黄体血流面積が受胎牛選定に有用であることが見い出された。第 2 章では、受胎牛と不受胎牛において ET から 7 日後の黄体血流量を比較し、超早期妊娠診断方法として有用であるかを検討した。その結果、ET7 日後の黄体血流面積と血流速度が超早期妊娠診断に有用であることが分かった。さらに第 3 章では、黄体機能を増強させる方法として以前より用いられている、ET 前の GnRH 製剤投与が黄体血流量および黄体血流量に基づく受胎牛選定と超早期妊娠診断の精度に及ぼす影響を検討した。その結果、黄体血流面積が増加し、第 1 章および第 2 章で得られた妊娠予測精度を向上させることが分かった。

## 第1章 ホルスタイン種受胎牛における胚移植 (ET) 時の黄体血流量を用いた受胎牛選定

### 1-1. 序論

ウシの妊娠の成立と維持には黄体から産生される  $P_4$  が必要不可欠であり (45, 57, 60), ET において血中  $P_4$  濃度が受胎に影響を及ぼす主要な要因であると考えられている (57, 64)。しかし、血中  $P_4$  濃度の測定には時間と経費がかかるため、受胎牛選定基準として用いることは困難である。血中  $P_4$  濃度と黄体面積には正の相関が見られることが分かっている (4, 36, 65)。このことから、受胎牛の選定時に直腸検査や超音波診断装置を用いて黄体直径や黄体面積を計測することで黄体機能の評価を行い、受胎牛の選定を行っている。また、ET の受胎率を向上させるために、受胎牛の黄体面積や血中  $P_4$  濃度だけではなく、共存する卵胞面積 (最大直径で計測した断面積) および血中エストラジオール ( $E_2$ ) 濃度に基づき受胎牛を選定する方法が研究されてきた (12, 28, 56, 64, 84)。しかし、受胎率の向上には繋がっておらず、黄体面積や卵胞面積を基準とした受胎牛の選定には限界があると考えられる。また、近年、超音波ドプラ法を用いて排卵前の卵胞や黄体形成期または退行期の黄体の血流動態の解析が行われている (1, 2, 30)。黄体血流量は血中  $P_4$  濃度と相関しており、黄体機能の評価方法としての有用性が示唆されている (30, 52) しかし、受胎牛の ET 前から ET 時の黄体血流量と受胎性との関連性は全く明らかとなっておらず、黄体血流量は受胎牛選定の基準として使用されていない。

そこで、本章では超音波ドプラ法を用いて受胎牛の ET 前から ET 時の黄体血流量の解析を行い、受胎牛と不受胎牛における黄体の形態と血流量の推移の比較を行った。さらに、黄体血流量が新たな妊娠予測方法つまり受胎牛選定方法と

して有用であるかを検討し、従来から用いられている黄体面積や血漿 P<sub>4</sub> 濃度と妊娠予測の精度の比較を行った。

## 1-2. 試験 1：ET 時の黄体血流面積（BFA）を用いた受胎牛選定方法の検討

### 1) 材料及び方法

#### 供試動物

臨床的に健康で、分娩後 50 日以上経過し正常な発情周期を有するホルスタイン種経産牛 65 頭（ $4.21 \pm 0.27$  歳， $2.50 \pm 0.23$  産，平均±標準誤差）を供試した。供試牛は宮城県内 1 酪農家のフリーストール牛舎にて乾草および濃厚飼料が混合された TMR が給与され、自由飲水できる状況で飼養されていた。全頭が 1 日 2 回搾乳され、平均乳量は  $28.29 \pm 2.42\text{kg/日}$ （平均 ± 標準誤差）であった。ボディーコンディションスコア（BCS）は Edmonson ら（20）の方法に基づき発情日に測定し、 $3.50 \pm 0.08$ （平均 ± 標準誤差）であった。

#### 実験方法

供試牛には自然に発情が発現したウシ（ $n = 34$ ）と発情同期化処置を行ったウシ（ $n = 31$ ）を使用した。発情発現日を Day 0 とし、Day 3, 5 および 7 に超音波画像診断装置を用いて黄体面積（最大直径での断面積）、黄体内腔面積（最大直径での黄体内腔の断面積）、黄体組織面積（黄体面積と黄体内腔面積の差）、主席卵胞面積（最大直径での断面積）、黄体血流面積（最大直径での血流面積；BFA）およびらせん動脈の黄体側基部の時間平均最大血流速度（TAMV）を測定した。また、超音波検査時に正中尾静脈より採血を行い、血漿 P<sub>4</sub> 濃度を測定した。Day

7に黄体直径が20mm以上であることを確認し、58頭のウシに黒毛和種牛の胚を1つ移植した。尚、Day 7の超音波検査および採血はET前に行った。Day 30に超音波画像診断装置を用いて妊娠診断を行った。試験1のプロトコールの模式図をFig. 1-1.に示した。

### 発情同期化方法

供試牛のうち34頭は発情同期化処置を行わず、自然に発情が発現したウシを使用した（自然発情群）。発情発現日をDay 0とした。同期化発情群（n = 31）はSiqueira ら（77）の方法に基づき、以下の方法で発情同期化処置を行った；Day -12に2mg エストラジオール安息香酸エステル製剤（EB；エストラジオール注「KS」；共立製薬株式会社，東京，日本）の筋肉内投与と膈内に1.9 g プロジェステロン膈内留置型徐放剤（CIDR 1900；ゾエティス・ジャパン株式会社，東京，日本）の挿入，Day -2にCIDR1900の抜去および500 µgのプロスタグランジン（PG）F<sub>2α</sub> 類縁体製剤（クロプロステノール；エストラメイト；ナガセ医薬品株式会社，兵庫，日本）の筋肉内投与，その24時間後（Day -1）に1mgEBの筋肉内投与を行った。発情同期化方法のプロトコールの模式図をFig. 1-2.に示した。

### ET

ホルスタイン種経産牛のDay 7における機能的黄体のサイズは直径19から28mmと報告されており（50, 93），直径20mm以上の黄体を持つ牛では20mm未満の牛に比較してETの受胎率が高いとされている（56）。従って，Day 7に黄体サイズが直径20mm以上である58頭に同一技術者がETを行った。過剰排卵誘起処置およびAIを行った黒毛和種牛から回収され，International

Embryo Transfer Society (<http://www.iets.org/>) の分類に基づき, quality grade 1 および developmental stage 4 の胚 (新鮮胚 ; n = 22, 凍結融解胚 ; n = 36) を使用した。移植器は動物用受精卵注入カテーテル (モ 4 号 ; ミサワ医科工業株式会社, 茨城, 日本) を使用し, 黄体側の子宮角深部に 1 つの胚を移植した。

### 妊娠診断

ET 後 23 日つまり Day 30 に, 7.5MHz リニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置 (Tringa V linear ; Esaote SpA, Genoa, Italy) を用いて胎子の存在および心拍を指標として行った。

### 卵巣の超音波検査

超音波検査は Day 3, 5 および 7 に行った。黄体と主席卵胞の形態は, 7.5MHz のリニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置 (MyLab five ; Esaote SpA, Genoa, Italy) を用いて B-モードにより観察した。プローブを手指とともに直腸内に挿入し, 左右両側卵巣の断層像を観察し, 主席卵胞または黄体の直径が最大になるように静止画を記録し, パソコン上に静止画を移動させ, 黄体面積、黄体内腔面積および主席卵胞面積を測定した。また, Day 7 において主席卵胞の位置を確認し, 同一卵巣内に黄体と共存する場合を同側群, 黄体が存在する卵巣とは反対側の卵巣に存在する場合を対側群とした。

黄体血流は, 7.5MHz のリニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置 (MyLab five ; Esaote SpA, Genoa, Italy) を用いて color-flow Doppler mapping mode により観察を行った。黄体血流の検査方法はプローブを手指とともに直腸内に挿入し, 黄体に直腸壁を介してプローブを密着させて断層像を観察した。黄体血流は黄体直径が最大になるような静止画を記録し, BFA を算

出した (Fig. 1-3.)。

黄体面積，黄体内腔面積，主席卵胞面積および BFA は，記録した画像をパソコン内に取り込み，Image J (version 1.49 ; the U.S. National Institutes of Health (<http://imagej.nih.gov/ij/>), USA) を用いて算出した。黄体組織面積は，黄体面積から黄体内腔面積を差し引いて算出した。

卵巣動脈から分岐し卵巣実質内を走行するらせん動脈の黄体側基部にプローブを合わせ，血流速度を測定し TAMV を算出した。血流速度測定部位を Fig. 1-4.に示した。

#### 血漿 P<sub>4</sub>濃度の測定

超音波検査時 (Day 3, 5 および 7) に 21G 採血針とヘパリン加真空採血管 (ベノジェクト II 真空採血管, TERUMO, 東京, 日本) を用い，尾静脈より 10ml の採血を行った。採血後直ちに氷冷し，30 分以内に血漿を 3,000g, 15 分間遠心分離後，P<sub>4</sub>測定まで -30℃で凍結保存した。

凍結保存された血漿を測定直前に室温にて融解し，酵素免疫測定法 (EIA) により血漿中 P<sub>4</sub>濃度を測定した。予め，96 穴プレートに抗ウサギ IgG 抗体 (Cappel, Cochranville, PA, USA) を吸着させることで，第二抗体固相化プレートを作製した。具体的には，第二抗体とした抗ウサギ IgG 抗体を第二抗体希釈液 (50 mM NaCO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>(pH9.6)) で，15 µg/mL に希釈し，希釈した第二抗体液をプレートの各ウェルに 100 µL ずつ分注した。第二抗体をプレートに吸着させ固相化させるため，プレートをシールして，4℃で 2 日間静置した。その後，各ウェルを 200 µL のブロッキング液 (20 mM Tris-HCl (pH7.2), 0.5% (w/v) 牛血清アルブミン(BSA), 2% (w/v) デキストリン，0.01% (w/v) チメロサール) でリンスした。リンス後，ブロッキング液を 250 µL 再度ウェルに分注し，使用するま

で 4℃に保存することにより，第二抗体固相化プレートのブロッキングを行った。

EIA 解析は，作製した第二抗体固相化プレートを使用し，血漿中 P<sub>4</sub> とペルオキシダーゼ (HRP) 標識 P<sub>4</sub> (Cosmo Bio, FKA-301, 東京, 日本) を，抗 P<sub>4</sub> 抗体 (ウサギ由来, Cosmo Bio, 東京, 日本) で 競合認識させ，HRP の基質オルソフェニレンジアミン (OPD, Wako, 大阪, 日本) が HRP の反応により 492 nm に吸収極大を持つ性質を利用し検出し，血漿中 P<sub>4</sub> の定量を行った。具体的には，第二抗体固相化プレートからブロッキング溶液を取り除いた後，各ウェルを 250 μL の洗浄液 (10 mM Tris-HCl (pH7.5), 0.3 M NaCl, 0.1% (v/v) Tween20) で洗浄した。洗浄後の各ウェルに，予め，活性炭処理したウシ血清で希釈した標準液 (36, 12, 4.0, 1.33, 0.33 ng/mL) 及び血漿を各ウェルに 25 μL ずつ分注した。尚，標準液の作製には，シグマ社から購入した P<sub>4</sub> (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA) を用いた。引き続き，100 μL 反応液 (50 mM Tris 緩衝液 (pH7.5), 0.2% (w/v) BSA, 10% (w/v) チメロサル) を各ウェルに分注した。さらに，反応液で 80 万倍希釈した抗 P<sub>4</sub> 抗体 (ウサギ由来, FKA-302E, Cosmo Bio, 東京, 日本) 100 μL と Tris 緩衝液で 16 万倍希釈した HRP 標識 P<sub>4</sub> 100 μL を各ウェルに分注し，プレートをシールして，常温で 3 時間振盪インキュベートした。インキュベート後，プレートを 4 回洗浄した。洗浄後，100 μL の基質液 (0.2 M クエン酸緩衝液 (pH4.5), 0.03% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.05% (w/v) OPD) を各ウェルに分注し，暗所にて 30 分間インキュベートした。HRP による OPD の発色反応を停止させるために，3M の硫酸を 50 μL ずつ各ウェルに加えた。1 分間の振盪インキュベートの後，マイクロプレートリーダー (BioRad, Hercules, USA) を用いて，各ウェルの 492 nm の吸光度を測定した。



## 統計処理

結果はすべて平均値 ± 標準誤差で示した。新鮮胚と凍結融解胚の受胎率，自然発情群と同期化発情群の移植率と受胎率および主席卵胞の同側群と対側群の受胎率の比較を行うために，フィッシャーの直接確率計算法を用いた。受胎群と不受胎群において，黄体面積，黄体組織面積，主席卵胞面積，BFA，TAMV，BFA/黄体面積比，BFA/黄体組織面積比，Day 3 を基準とした BFA と TAMV の相対的变化および血漿 P<sub>4</sub> 濃度の平均値の 2 群間の差の検定を行うために，各水準の繰り返し回数が異なる二元配置分散分析を行い全体の変化の有意性を調べた。交互作用が有意であった場合，Day 毎に Bonferroni の多重比較検定を行った。また，主席卵胞の同側群と対側群における黄体面積，黄体組織面積，主席卵胞面積，BFA，TAMV および血漿 P<sub>4</sub> 濃度の平均値の 2 群間の差の検定を行うために，Student の t 検定を行った。統計処理には統計処理ソフトウェア SPSS 13 (SPSS Japan, 東京, 日本) を用いた。危険率 5%未満 ( $P < 0.05$ ) で有意差ありとした。Day 7 における妊娠予測因子としてどの因子が最も優れているかを調べるために，ロジスティック回帰分析を行った。従属変数は受胎の成否，独立変数には 10 因子（年齢，産歴，分娩後日数，BCS，主席卵胞面積，黄体面積，黄体組織面積，BFA，TAMV および血漿 P<sub>4</sub> 濃度）を用いた。

従来から用いられている 3 つの妊娠予測因子（黄体面積，黄体組織面積，血漿 P<sub>4</sub> 濃度）と新しい因子（BFA および TAMV）の妊娠予測精度の比較を行うために，receiver operating characteristics (ROC) 解析を行った。ROC 曲線を作成後，Perkins ら (61) の報告に基づき感度と特異度が 100%である左上隅との距離を解析し，その距離が最小となる点を最適なカットオフ値と決定した。



## 2) 結果

### 発情同期化方法，胚の種類および産歴の比較

自然発情群および同期化発情群における移植率および受胎率を Table 1-1. に示した。移植率，受胎率ともに両群において有意な差は認められなかった。また，新鮮胚と凍結融解胚の受胎率は各々 63.6% (14/22)，55.6% (20/36) であり，有意な差は認められなかった。従って，発情同期化方法と胚の種類による影響は考慮せず，全てまとめて解析を行った。

Day 30 における妊娠診断後，供試牛を受胎群 (n = 34) と不受胎群 (n = 24) に分類し，各項目を比較検討した。両群における年齢，産歴，分娩後日数および BCS を Table 1-2. に示した。全ての項目で両群において有意な差は認められなかった。

### 黄体血流量の推移

BFA の推移を Fig. 1-5. A に示した。試験期間中，両群において BFA は次第に増加し，Day 7 において受胎群が不受胎群に比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.01$ )。

TAMV の推移を Fig. 1-5. B に示した。試験期間中，両群において TAMV は次第に増加し有意な差は認められなかった。

Day 3 を基準とした BFA と TAMV の相対的变化を Fig. 1-6. に示した。BFA は Day 7 において受胎群が不受胎群に比較して有意に高い値を示したが ( $P < 0.05$ )，TAMV には両群間で有意な差は認められなかった。

BFA/黄体面積比および BFA/黄体組織面積比の推移を Fig. 1-7. に示した。

BFA/黄体面積比は Day 7 において受胎群が不受胎群に比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.01$ )。BFA/黄体組織面積比は試験期間中受胎群が不受胎群に比較して有意に高く推移した ( $P < 0.01$ )。

自然発情群および同期化発情群における BFA および TAMV の推移を Fig. 1-8. A と B に示した。BFA および TAMV は同様に推移し、両群間で有意な差は認められなかった。

#### 黄体、主席卵胞および血漿 P<sub>4</sub> 濃度の推移

受胎群および不受胎群における、黄体面積、黄体組織面積、主席卵胞面積および血漿 P<sub>4</sub> 濃度の推移を Fig. 1-9. に示した。試験期間中次第に増加し、受胎群および不受胎群で有意な差は認められなかった。

自然発情群および同期化発情群における、黄体面積、黄体組織面積、主席卵胞面積および血漿 P<sub>4</sub> 濃度の推移を Fig. 1-8. C-F に示した。両群間で同様に推移し、有意な差は認められなかった。

主席卵胞の同側群と対側群における主席卵胞面積、黄体面積、黄体組織面積、BFA、TAMV、血漿 P<sub>4</sub> 濃度および受胎率の比較を Table1-3. に示した。黄体面積、黄体組織面積、BFA、TAMV、血漿 P<sub>4</sub> 濃度および受胎率には両群間で有意な差は認められなかった。主席卵胞面積は同側群が対側群に比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。

#### 黄体血流量による妊娠予測

受胎の成否を従属変数、10 因子（年齢、産歴、分娩後日数、BCS、主席卵胞面積、黄体面積、黄体組織面積、BFA、TAMV および血漿 P<sub>4</sub> 濃度）を独立変数とした、512 通りのロジスティック回帰式を比較し、ベイズ情報量基準が最小の

ものを Table 1-4.に示した。Day 7において、BFA のみを予測因子とした単回帰式がその他の単回帰式や重回帰式と比較して最も優れていた。従来から用いられてきた黄体面積、黄体組織面積および血漿 P<sub>4</sub>濃度は妊娠予測に有用ではなく、Day 7における P値はそれぞれ 0.458, 0.620 および 0.715 であった。

ROC 解析の結果を Fig. 1-10.に示した。Day 7において、BFA が妊娠予測に最も優れた因子であることが分かった。さらに、Day 7における妊娠予測のためのカットオフ値の比較を Table 1-5.に示した。BFA のカットオフ値を 0.43 cm<sup>2</sup> に設定することで、高い感度（79.4%）と特異度（75.0%）を同時に得ることができた。

### 1-3. 試験 2：ET 時の BFA を用いた受胎牛選定方法の再現性の検証

#### 1) 材料及び方法

##### 供試動物

試験 1 と同様に、臨床的に健康で、分娩後 50 日以上経過し正常な発情周期を有するホルスタイン種経産牛 38 頭（4.02 ± 0.31 歳， 2.12 ± 0.20 産， 平均 ± 標準誤差）を供試した。供試牛は試験 1 と同一農場にて飼養され、飼養形態および給餌状況は同様であった。BCS は Edmonson ら（20）の方法に基づき発情日に測定し、3.41 ± 0.06（平均 ± 標準誤差）であった。

##### 実験方法

試験 1 と同様に、発情日発現日を Day 0 と定義した。Day 7 にカラードプラ超音波画像診断装置を用いて BFA の測定を行った。黄体直径が 20mm 以上で

あることを確認し ET を行い，Day 30 に経直腸超音波画像診断装置を用いて妊娠診断を行った。試験 2 のプロトコルの模式図を Fig. 1-11. に示した。

#### 卵巣の超音波検査

Day 7 における黄体直径および BFA は，7.5MHz のリニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置（MyLab five ; Esaote SpA, Genoa, Italy）を用いて color-flow Doppler mapping mode により観察を行った。BFA の検査方法は，プローブを手指とともに直腸内に挿入し，黄体の断層像を観察した。黄体直径が最大になるような静止画を記録し，試験 1 と同様の方法で BFA を算出した。

#### ET

試験 1 と同様に，Day 7 に黄体サイズが直径 20mm 以上であることを確認し同一技術者が ET を行った。過剰排卵誘起処置および AI を行った黒毛和種牛から回収され，quality grade 1 および developmental stage 4 の胚（新鮮胚 ; n = 18，凍結融解胚 ; n = 20）を使用した。移植器は動物用受精卵注入カテーテル（モ 4 号 ; ミサワ医科工業株式会社，茨城，日本）を使用し，黄体側の子宮角深部に 1 つの胚を移植した。

#### 妊娠診断

ET 後 23 日つまり Day 30 に 7.5MHz リニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置（Tringa V linear ; Esaote SpA, Genoa, Italy）を用いて胎子の存在および心拍を指標として行った。

### BFA の測定

試験 1 と同様に，黄体血流は 7.5MHz のリニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置（MyLab five ; Esaote SpA, Genoa, Italy）を用いて color-flow Doppler mapping mode により観察を行った。黄体血流の検査方法はプローブを手指とともに直腸内に挿入し，黄体に直腸壁を介してプローブを密着させて断層像を観察した。黄体血流は黄体直径が最大になるような静止画を記録し，BFA を算出した。BFA は，記録した画像をパソコン内に取り込み，Image J （ version 1.49 ; the U.S. National Institutes of Health (<http://imagej.nih.gov/ij/>), USA）を用いて算出した。

### 調査項目

試験 1 で設定した BFA のカットオフ値  $0.43 \text{ cm}^2$  以上のウシを検査陽性群（ $n = 15$ ）， $0.43 \text{ cm}^2$  未満のウシを検査陰性群（ $n = 23$ ）とした。陽性的中率（受胎すると判定したウシのうち実際に受胎したウシの割合），陰性的中率（受胎しないと判定したウシのうち実際に受胎しなかったウシの割合），感度（受胎するウシのうち受胎すると判定できる割合）および特異度（受胎しないウシのうち受胎しないと判定できる割合）を算出し，試験 1 の結果と比較した。

## 2) 結果

供試牛 38 頭中 16 頭が受胎し，受胎率は 42.1%であった。試験 1 で設定した BFA のカットオフ値  $0.43 \text{ cm}^2$  以上の検査陽性群は 15 頭， $0.43 \text{ cm}^2$  未満の検査陰性群は 23 頭であった。検査陽性群 15 頭中で実際に受胎したウシは 13 頭，不受胎であったウシは 2 頭であった。また，検査陰性群 23 頭中で受胎したウシは

3 頭, 不受胎であったウシは 20 頭であった。以上のことから, 陽性的中率 86.7 % (13/15), 陰性的中率 87.0 % (20/23), 感度 81.3 % (13/16) および特異度 90.9 % (20/22) であった (Table 1-6.)。

#### 1-4. 考察

本章では, 受胎群と不受胎群において ET 前から ET 時の黄体血流量の推移を比較した。受胎群は不受胎群に比較して, Day 7 において BFA, BFA/黄体面積比および BFA/黄体組織面積比が有意に高いことが明らかとなった。また, Day 7 においては従来の方法である黄体面積, 血漿 P<sub>4</sub> 濃度や TAMV と比較して BFA が妊娠予測に有用であり, カットオフ値を 0.43cm<sup>2</sup> に設定することで他の因子に比較して高い感度と特異度を同時に得ることができた。感度は受胎するウシのうち受胎すると判定できる割合, 特異度は受胎しないウシのうち受胎しないと判定できる割合であり, 感度と特異度がともに高いと精度が高いと言えることができる。従って, カラードプラ法による BFA の測定は受胎牛の受胎性の評価や受胎牛の選定に有用であると考えられた。

試験 1 より, 自然発情群および同期化発情群において移植率と受胎率に有意な差が認められなかった。また, 一般に新鮮胚に比較して凍結融解胚の受胎率は低いとされている (80) が, 本章において新鮮胚および凍結融解胚において受胎率に有意な差が認められなかった。このことから, 発情の種類や胚の種類による受胎への影響はないと考えられた。

過去の研究から, 黄体面積, BFA および血漿 P<sub>4</sub> 濃度は黄体の発育に伴い増加し, 黄体退行に伴い減少することが明らかとなっている (30, 49, 76)。また, 黄体退行期には血漿 P<sub>4</sub> 濃度の減少が黄体面積の減少に先行するのに対し (30), 血漿 P<sub>4</sub> 濃度と BFA の減少は同調しているため, 発情周期を通じて BFA は血漿

P<sub>4</sub>濃度つまり黄体機能の評価に有用であると示唆されている (30)。本章において、黄体面積、黄体組織面積、血漿 P<sub>4</sub>濃度、BFA および TAMV は、発情同期化方法や受胎・不受胎に関わらず Day 7 まで増加した。受胎群は不受胎群に比較して、黄体面積、黄体組織面積、血漿 P<sub>4</sub>濃度および TAMV に差が認められなかったが、BFA は Day 7 に有意に高い値を示した。また、ロジスティック回帰分析の結果から、従来から受胎牛の選定に用いられてきた黄体面積、主席卵胞面積や血漿 P<sub>4</sub>濃度ではなく、BFA が受胎に影響を及ぼす因子であることが明らかとなった。P<sub>4</sub> は黄体細胞より分泌され、着床に向けた子宮環境の調整に重要な役割を持ち (24)、胚の生存に必要不可欠である (15, 55)。P<sub>4</sub> の生成や全身循環への放出には黄体の血管形成が必要である (11, 97)。また、黄体のある卵巢と同側の卵管や子宮角の P<sub>4</sub>濃度は対側に比較して高いことが知られている (95, 96)。つまり、生体内で P<sub>4</sub>は一定の濃度で分布しておらず、全身循環に乗らず血管を介して卵巢と子宮間で局所循環する P<sub>4</sub>が存在すると考えられている (95, 96)。本章において、受胎群と不受胎群で血漿 P<sub>4</sub>濃度に差が認められず、Day 7 において受胎群の BFA が不受胎群に比較して有意に高いことがわかった。このことから、受胎群における黄体の高い血管形成つまり活発な血流が、黄体への栄養や P<sub>4</sub>の基質の供給量を増加し、局所循環を介して黄体側の子宮角の P<sub>4</sub>濃度を増加させるのではないかと考えられた。従って、黄体側つまり胚を移植する子宮角の P<sub>4</sub>濃度が増加することで胚の生存や着床が改善したと推測される。

試験 1 より、受胎群と不受胎群の黄体面積、黄体組織面積および血漿 P<sub>4</sub>濃度に差が認められなかった。過去の報告から、ホルスタイン種経産牛の Day 7 の黄体は直径 19-28 mm であり (50, 93)、黄体退行期を除いて黄体面積は血漿 P<sub>4</sub>濃度を反映しているとされている (36)。本章では Day 7 における黄体直径が 20 mm 以上のウシに ET を行った。そのため、黄体面積、黄体組織面積および血漿

P<sub>4</sub> 濃度の推移に差が認められなかったと推測された。また、主席卵胞面積についても受胎群と不受胎群で差が認められず、ロジスティック回帰分析の結果からも主席卵胞面積は受胎に影響しないことが示された。ET 時の主席卵胞面積と受胎性に関しては様々な報告がなされている (47, 56, 57)。主席卵胞面積や血漿 E<sub>2</sub> 濃度が受胎率に影響を及ぼし、主席卵胞面積が大きく血漿 E<sub>2</sub> 濃度が高いと受胎率が低下するという報告 (47, 57) と受胎に影響を与えないとする報告もある (56)。通常、ウシの発情周期において卵巣内では 2-3 回の卵胞群の発育が観察され、それぞれの卵胞群から排卵に至らない卵胞が 1-2 個発育する (71, 78)。つまり、発情周期を通じて黄体に共存する卵胞が観察される (71)。また、発情から 6-7 日後に第 1 卵胞波主席卵胞の直径は 12.0-15.0 mm に達し、それに伴い血中 E<sub>2</sub> 濃度も上昇する (5, 71)。従って、ET 時に直径 10mm 前後の主席卵胞が共存することは正常であり、本章の結果から、Day 7 の黄体直径が 20 mm 以上の牛を受胎牛として選択した場合、主席卵胞面積は受胎に影響せず、受胎性予測には有用ではないことが示された。また、Miura ら (51) は AI 後の第 1 卵胞波主席卵胞が黄体の存在する卵巣と同側に共存しているウシは、対側に存在しているウシに比較して、卵胞直径が大きく受胎率が低いと報告している。本章では、同側群は対側群に比較して主席卵胞面積は有意に高い値を示したが、受胎率には差が認められなかった。主席卵胞から産生される E<sub>2</sub> が局所循環によって同側の子宮や卵管に影響を与えることで AI の受胎率が低下すると考えられている (51)。本章では受胎率に差が認められなかったことから、主席卵胞から産生される E<sub>2</sub> により影響を受けるのは Day 7 以前の胚発生初期に限定されるのではないかと推測した。

試験 2 では、試験 1 で設定した BFA のカットオフ値に基づく受胎牛選定方法の再現性を検証した。供試牛 38 頭中 BFA のカットオフ値 0.43 cm<sup>2</sup> 以上の検査



陽性群は 15 頭,  $0.43 \text{ cm}^2$  未満の検査陰性群は 23 頭であった。妊娠診断の結果, 試験 1 と同様に高い感度と特異度を同時に得ることができた。このことから, 試験 1 で示した BFA のカットオフ値は, 受胎性予測に有用であり再現性が高いことが示された。

以上のことから, ET 前の受胎群と不受胎群の黄体面積, 黄体組織面積, 主席卵胞面積, BFA, TAMV および血漿  $P_4$  濃度の推移を比較し, 妊娠予測に有用な因子を解析したところ, 受胎群の Day 7 における BFA が不受胎群に比較して高く, 妊娠予測に最も有用であることが明らかとなった。また, BFA のカットオフ値を  $0.43 \text{ cm}^2$  と設定することで高い感度と特異度を同時に得ることができた。黄体機能評価方法として従来から用いられている血漿  $P_4$  濃度の測定にはコストと時間がかかるのに対し, BFA の測定は短時間で行うことが可能である。従って, 特に臨床現場において Day7 の BFA を測定することが受胎性の予測つまり受胎牛の選定に有用であると考えられた。

#### 1-5. 小括

ET 時に受胎牛の BFA を評価することは受胎性の評価に有用であり, 従来から用いられている黄体面積や血漿  $P_4$  濃度の測定に比較して精度が高いことが示された。また, 特に臨床現場においては血漿  $P_4$  濃度の測定は困難であり, 時間と経費のかからない BFA の測定は受胎牛の選定に有用であると考えられた。

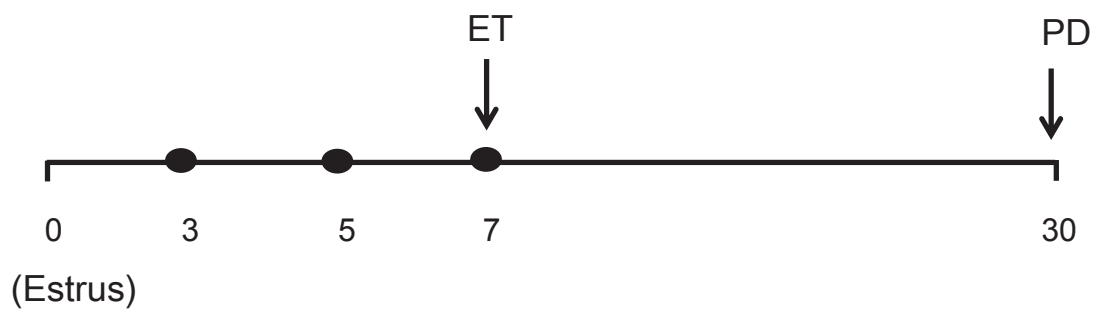


Fig. 1-1. Schematic views of ultrasound examinations and sampling schedules. The day on which the recipient cow had been observed to be in standing estrus was considered to be Day 0. Ultrasound examination of ovaries and blood samplings (●) were conducted on Day 3, 5, and 7. Embryo transfer (ET) and pregnancy diagnosis (PD) were conducted on Day 7 and 30, respectively.

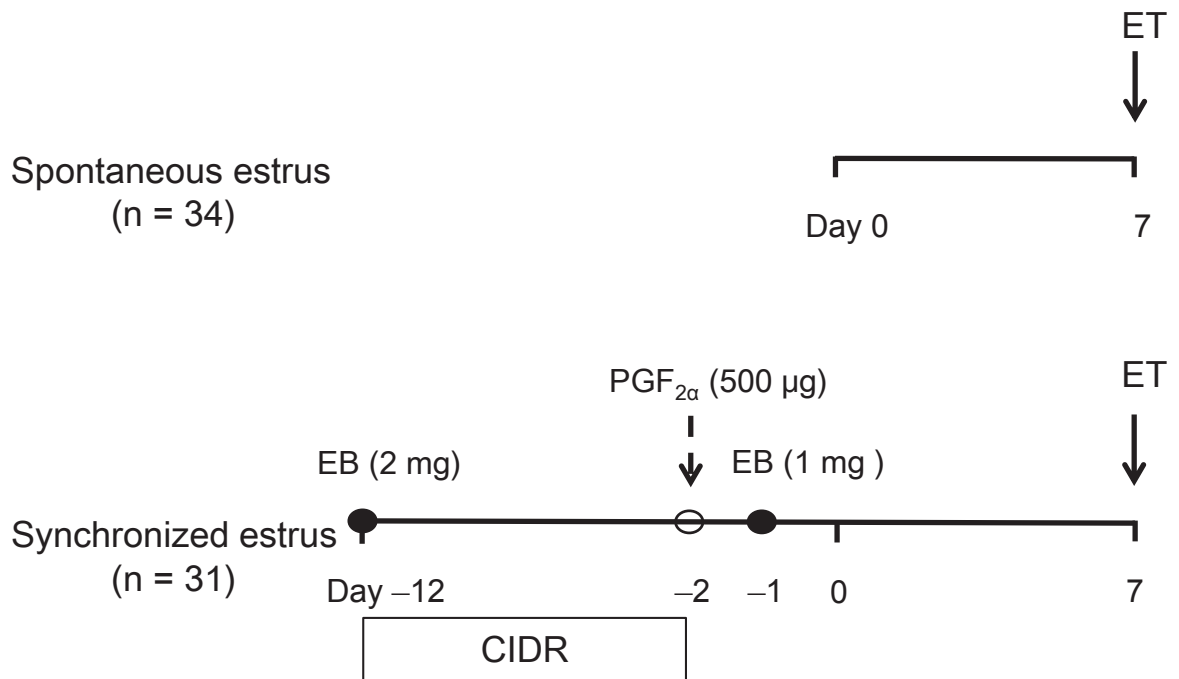


Fig. 1-2. Schematic views of treatments for estrus synchronization. The estrus of cows in the spontaneous estrus group (n = 34) was detected without synchronization. Cows in the synchronized group (n = 31) were treated with the following protocol; estradiol benzoate (EB, 2 mg, i.m.) with a simultaneous insertion of an intravaginal progesterone (P<sub>4</sub>)-releasing device containing 1.9 g of P<sub>4</sub> (CIDR 1900) on Day -12, prostaglandin-F<sub>2α</sub> analogue (PGF<sub>2α</sub>, 500 µg, i.m.) and CIDR 1900 removal on Day -2, and a second administration of EB (1 mg, i.m.) on Day -1. The day on which the recipient cow had been observed to be in standing estrus was considered to be Day 0.

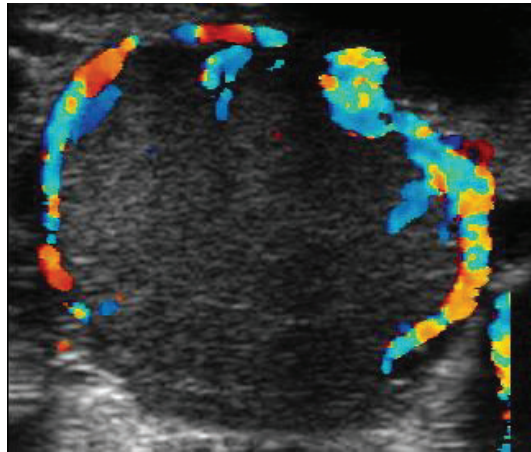


Fig. 1-3. Image of the corpus luteum (CL) using color Doppler ultrasonography. The colored area was measured as BFA.

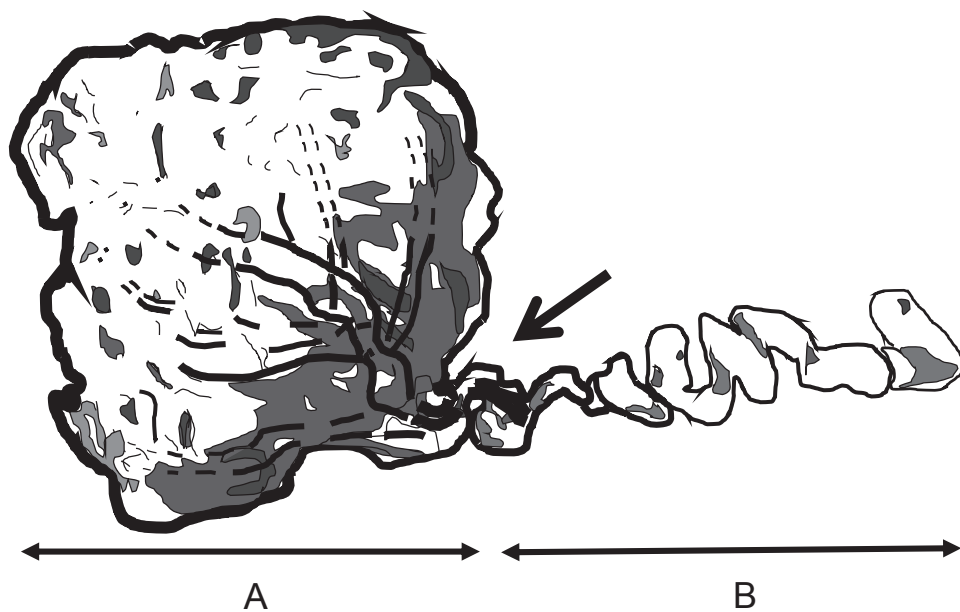


Fig. 1-4. Schematic model of the corpus luteum and the spiral artery in cows illustrated by according to Yamada et al. (1995). A: The corpus luteum, B: The spiral artery. The arrow indicates the point where blood flow velocity was measured (the basement of the spiral artery).

Table 1-1. Effect of estrus type on fertility rates.

	Total	Spontaneous estrus	Synchronized estrus	<i>P</i> -value
Number	65	34	31	
Selected number for recipients <sup>a</sup>	58	31	27	
Selection rate (%) <sup>b</sup>	89.2 (58/65)	91.2 (31/34)	87.1 (27/31)	0.70
Pregnancy rate (%) <sup>c</sup>	58.6 (34/58)	58.1 (18/31)	59.3 (16/27)	1.00

Synchronized = Estradiol benzoate (EB, 2 mg, i.m.) with a simultaneous insertion of an intravaginal progesterone (P<sub>4</sub>)-releasing device containing 1.9 g of P<sub>4</sub> (CIDR 1900) on Day – 12, prostaglandin-F2 $\alpha$  analogue (PGF2 $\alpha$ , 500  $\mu$ g, i.m.) and CIDR 1900 removal on Day –2, and a second administration of EB (1 mg, i.m.) on Day –1.

<sup>a</sup>Number of recipients selected by a corpus luteum size  $\geq$  20 mm diameter on Day 7.

<sup>b</sup>Transferred-to-estrus detected rate.

<sup>c</sup>Pregnant-to-transferred rate.

Table 1-2. Summary of variables in the current study<sup>a</sup>.

	Total	Pregnant group	Non-pregnant group	<i>P</i> -value
Number	58	34	24	
Age	4.21 ± 0.27	4.41 ± 0.35	3.92 ± 0.39	0.37
Lactation number	2.50 ± 0.23	2.65 ± 0.29	2.29 ± 0.36	0.45
Days after calving	131.59 ± 10.80	143.38 ± 16.00	114.88 ± 12.15	0.20
BCS	3.50 ± 0.08	3.25 ± 0.00	3.75 ± 0.00	0.62
Fresh embryo	22	14	8	
Frozen embryo	36	20	16	

<sup>a</sup>All data are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation: BCS; Body condition scores.

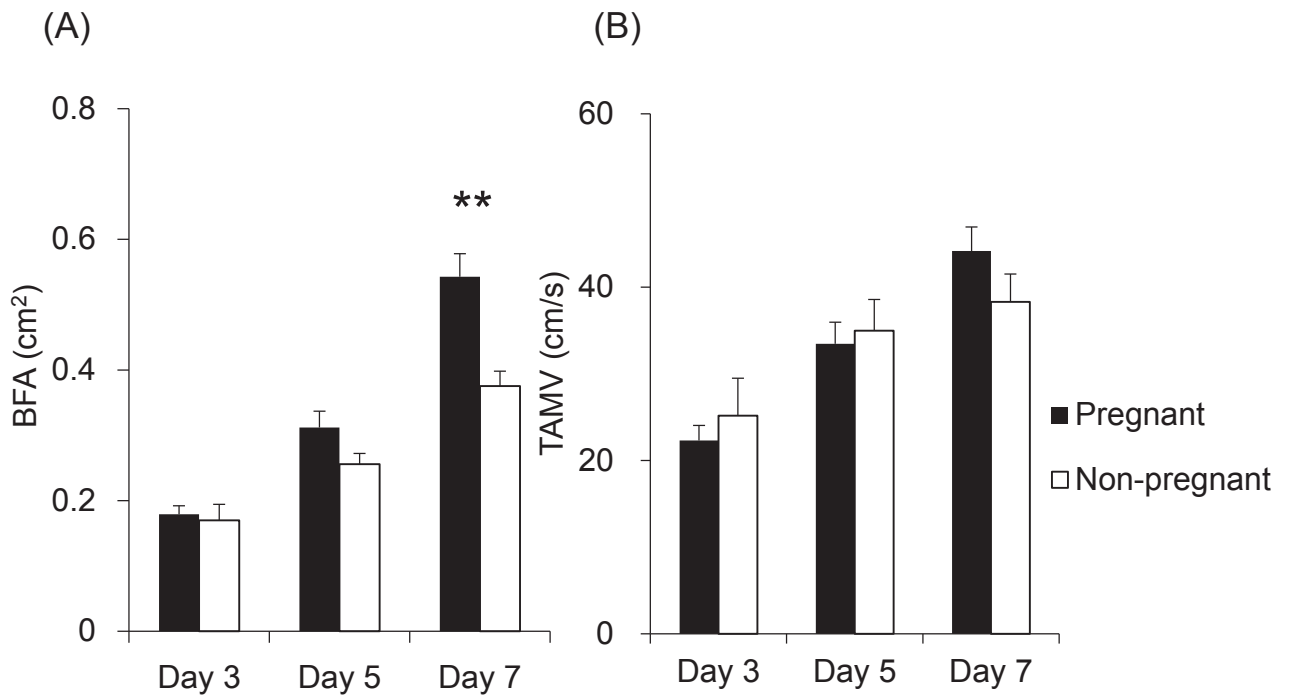
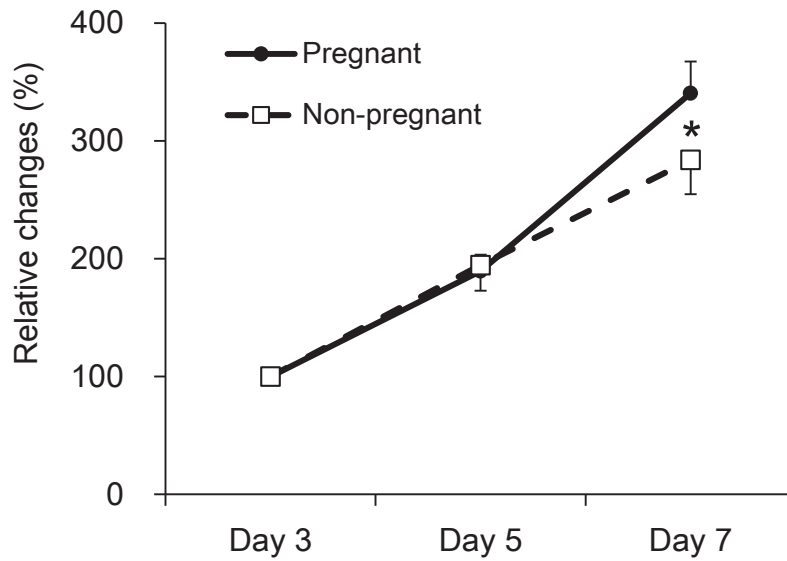


Fig. 1-5. Changes in the blood flow area (BFA) of the corpus luteum (A) and the time-averaged maximum velocity (TAMV) of the spiral artery (B). Black bars represent the pregnant group (n = 34). White bars show the non-pregnant group (n = 24). Data points show the mean  $\pm$  SEM for each day. The BFA of the pregnant group was significantly higher than those of the non-pregnant group on Day 7. The TAMV did not differ among these groups.

\*\* Difference between the two groups ( $P < 0.01$ ) on the day indicated.



(A) BFA



(B) TAMV

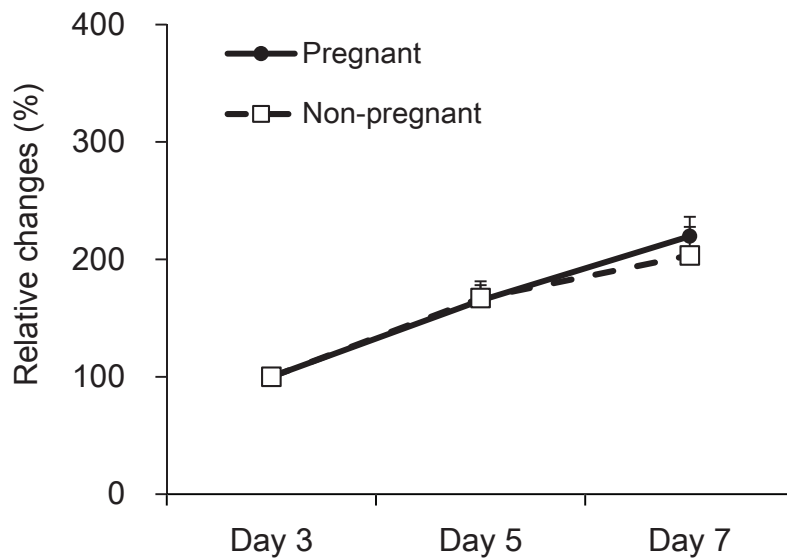
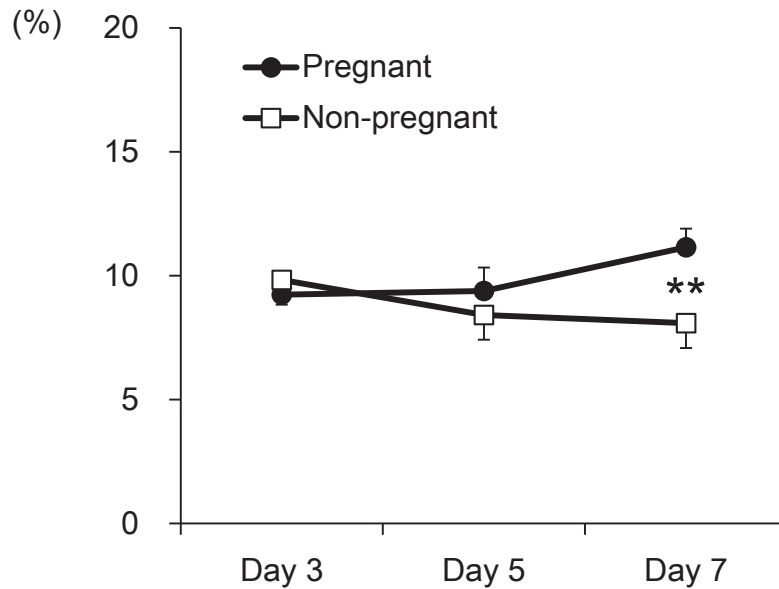


Fig. 1-6. Relative changes of the blood flow area (BFA) (A) and the time-averaged maximum velocity (TAMV) (B) (% of respective values on Day 3). Data points show the mean  $\pm$  SEM for each day. The relative changes of BFA in the pregnant group was significantly higher than those in the non-pregnant group on Day 7. The relative changes of TAMV did not differ among these groups.

\* Difference between the two groups ( $P < 0.05$ ) on the day indicated.

(A) BFA/CL area



(B) BFA/CL tissue area

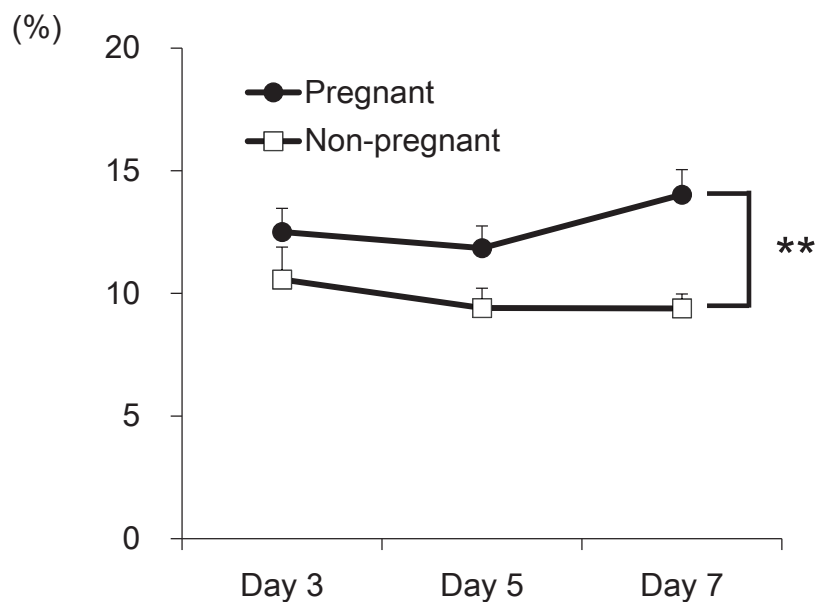


Fig. 1-7. Relative changes in the blood flow area (BFA) expressed as the percentage of the corpus luteum (CL) area (A) and the CL tissue area (B) . Data points show the mean  $\pm$  SEM for each day. The BFA/CL area of the pregnant group was significantly higher than those of the non-pregnant group on Day 7. The BFA/CL tissue area of the pregnant group was significantly higher than those of the non-pregnant group throughout the experimental period.

\*\* Difference between the two groups ( $P < 0.01$ ) indicated.

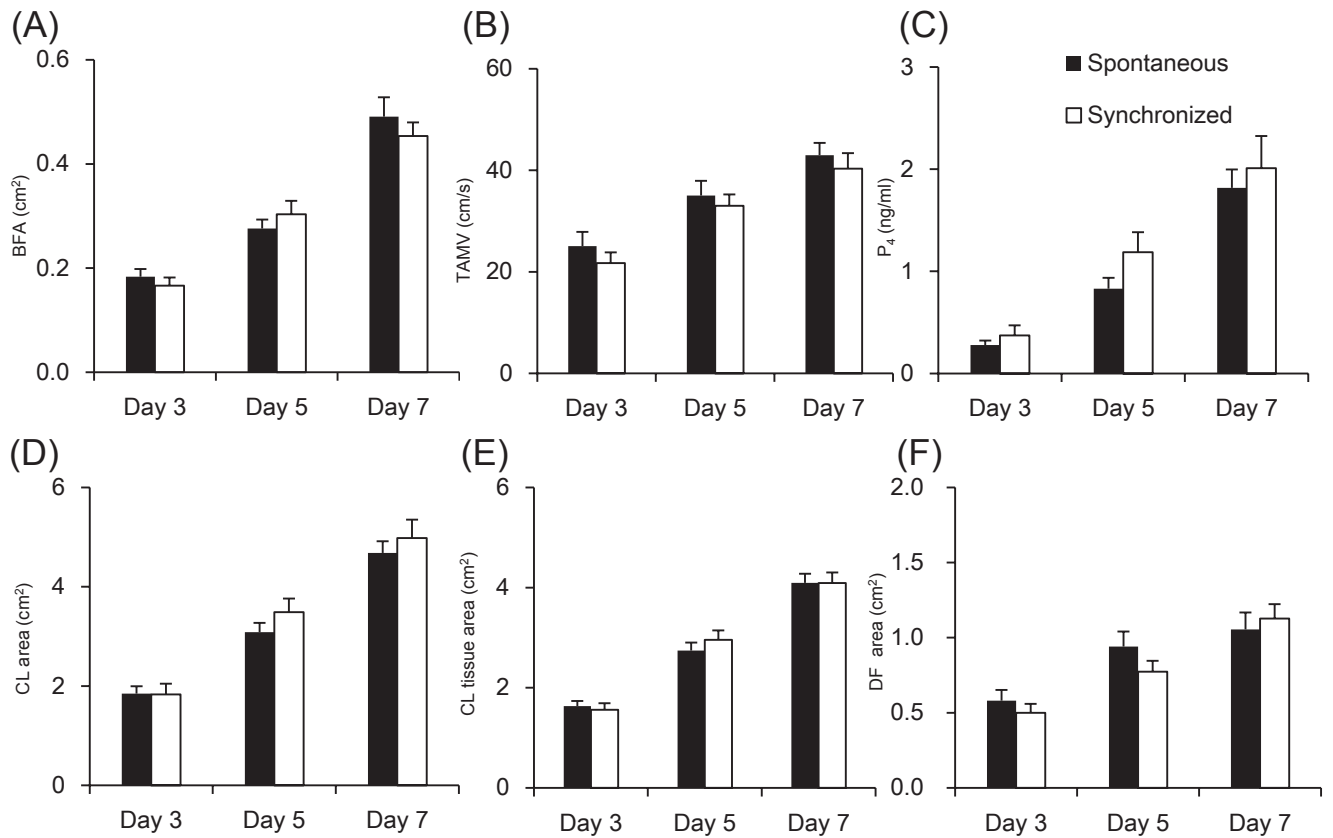


Fig. 1-8. Changes in the blood flow area (BFA) (A), the time-averaged maximum velocity (TAMV) (B), plasma P<sub>4</sub> concentrations (C), corpus luteum (CL) area (D), CL tissue area (E), and dominant follicle (DF) area (F). Black bars represent the spontaneous estrus group (n = 34). White bars show the synchronized estrus group (n = 31). Data points show mean  $\pm$  SEM for each day. There were no significant differences between the spontaneous estrus group and the synchronized estrus group.

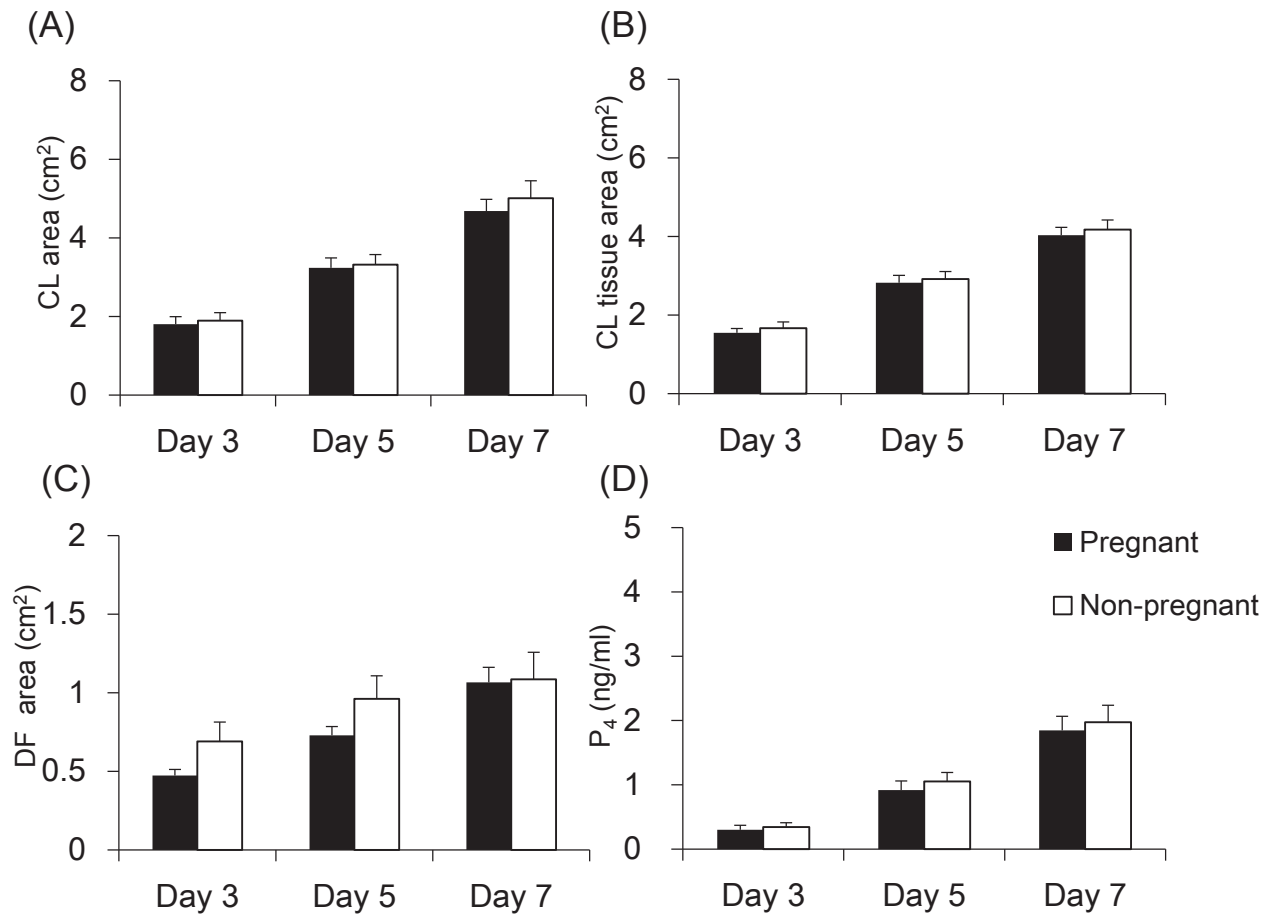


Fig. 1-9. Changes in the corpus luteum (CL) area (A), CL tissue area (B), dominant follicle (DF) area (C), and plasma P<sub>4</sub> concentrations (D). Black bars represent the pregnant group (n = 34). White bars show the non-pregnant group (n = 24). Data points show the mean  $\pm$  SEM for each day. In both groups, these trait values gradually increased during the experimental period and did not differ between the groups.

Table 1-3. Effects of dominant follicle (DF) location on the morphology and vascularity of the CL, plasma concentration, and pregnancy rate<sup>a</sup>.

	Location of the DF on Day 7 <sup>b</sup>		P-value <sup>c</sup>
	Ipsilateral (n = 21)	Contralateral (n = 37)	
DF area (cm <sup>2</sup> )	1.23 ± 0.13	0.91 ± 0.15	0.04
CL area (cm <sup>2</sup> )	4.59 ± 0.25	4.98 ± 0.21	0.39
CL tissue area (cm <sup>2</sup> )	3.89 ± 0.21	4.26 ± 0.16	0.21
BFA of the CL (cm <sup>2</sup> )	0.48 ± 0.08	0.48 ± 0.07	0.97
TAMV (cm/s)	44.35 ± 0.78	40.09 ± 0.61	0.30
P <sub>4</sub> concentration (ng/ml)	1.64 ± 0.22	1.93 ± 0.18	0.41
Pregnancy rate (%)	61.9 (13/21)	56.8 (21/37)	0.79

<sup>a</sup>All data represent the mean ± SEM.

<sup>b</sup>The location of the DF in the ovary was ipsilateral or contralateral to the CL on Day 7. Abbreviations: DF, dominant follicle; CL, corpus luteum; BFA, blood flow area; TAMV, time-averaged mean velocity; P<sub>4</sub>, progesterone.

<sup>c</sup>P-values were obtained using t-tests (items other than the pregnancy rate) or Fisher's exact test (pregnancy rate).

Table 1-4. Coefficients for regression models with the lowest Bayesian Information Criteria on Day 7.

	Estimate	Standard error	z-statistic	<i>P</i> -value
Intercept	- 3.80	1.23	- 3.08	0.002
BFA on Day 7	9.31	2.78	3.35	< 0.001

Abbreviation: BFA ; blood flow area.

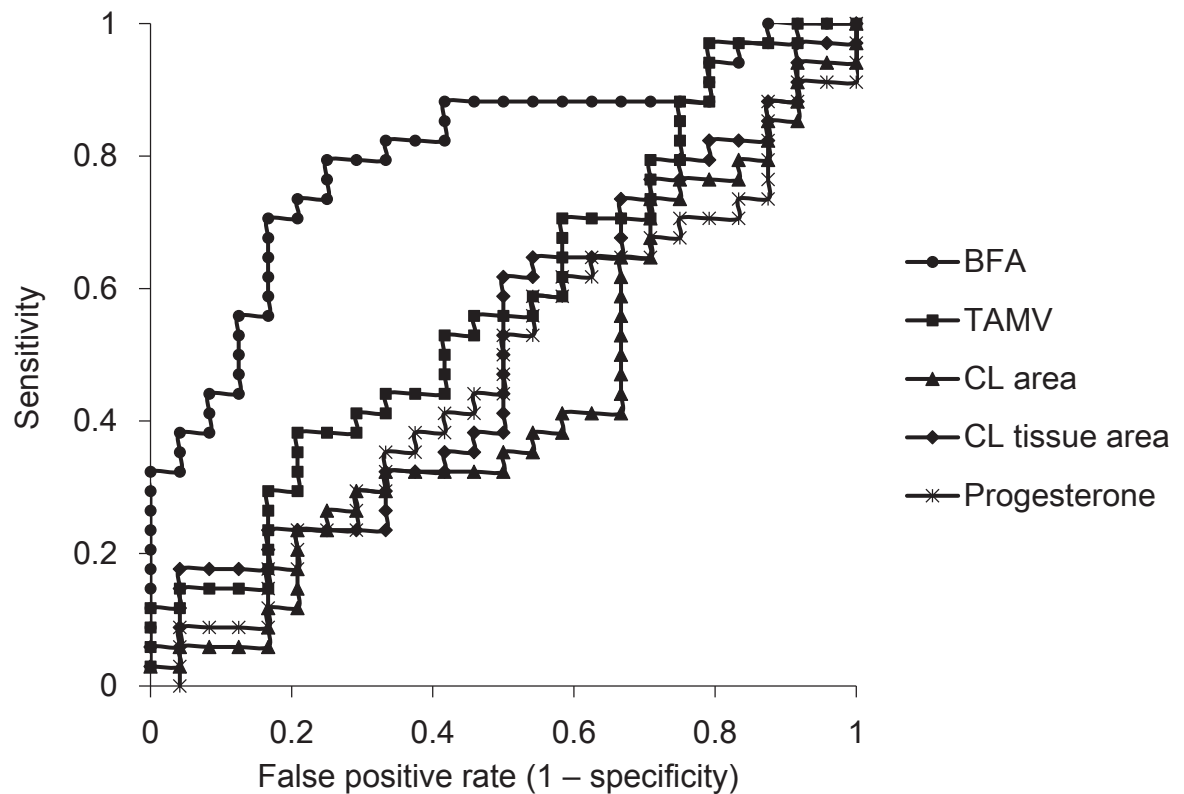


Fig. 1-10. Receiver operating characteristic (ROC) curves of the five pregnancy predictors on Day 7. The horizontal and vertical axes are a false positive rate (1 - specificity) and sensitivity, respectively. Thus, the upper left corner is the ideal point of 100% sensitivity and 100% specificity. The BFA provided the most appropriate prediction of pregnancy among the other four single predictors.

Abbreviations: BFA; blood flow area, TAMV; time-averaged maximum velocity, CL; corpus luteum.

Table 1-5. Summary of the ROC analyses of five independent variables on Day 7.

	Cutoff value	Sensitivity	Specificity
BFA (cm <sup>2</sup> )	0.43	0.794	0.750
TAMV (cm/s)	41.83	0.533	0.583
CL area (cm <sup>2</sup> )	5.12	0.324	0.667
CL tissue area (cm <sup>2</sup> )	3.86	0.618	0.500
P <sub>4</sub> concentrations (ng/ml)	1.32	0.588	0.458

Abbreviations: ROC; Receiver operating characteristic, BFA; blood flow area, TAMV; time-averaged mean velocity, CL; corpus luteum.



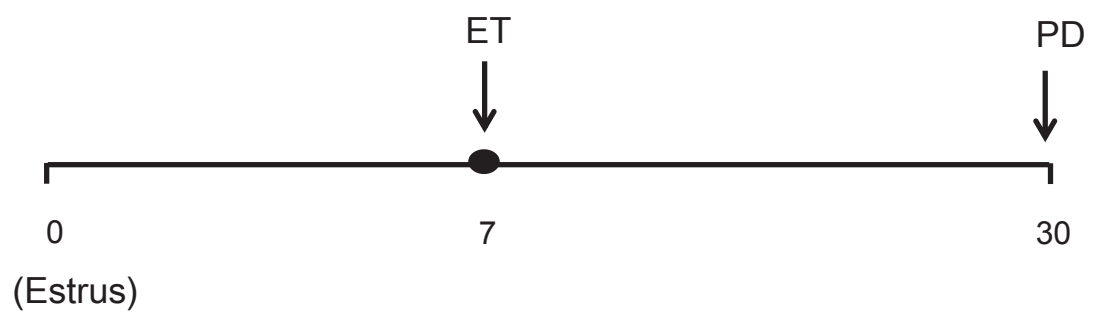


Fig. 1-11. Schematic views of ultrasound examinations and sampling schedules. The day on which the recipient cow had been observed to be in standing estrus was considered to be Day 0. Ultrasound examination of ovaries (●) was conducted on Day 7. Embryo transfer (ET) and pregnancy diagnosis (PD) were conducted on Day 7 and 30, respectively.

Table 1-6. Pregnancy diagnosis sensitivity, specificity, and predictive probabilities for ultrasound examination based on BFA on Day 7.

Pregnancy diagnosis on Day 30					
		Positive	Negative	Total	
Pregnancy prediction based on BFA <sup>a</sup>	Positive	13	2	15	Positive predictive value (%) 86.7
	Negative	3	20	23	Negative predictive value (%) 87.0
Total		16	22	38	
		Sensitivity (%)	Specificity (%)		
		81.3	90.9		

<sup>a</sup> Positive; BFA  $\geq 0.43$  cm<sup>2</sup>, Negative; BFA < 0.43 cm<sup>2</sup>.

Abbreviation: BFA; blood flow area.

## 第2章 ホルスタイン種受胎牛における ET 後の黄体血流量を用いた超早期妊娠診断

### 2-1. 序論

ウシにおける妊娠診断は、直腸検査によって行う場合は AI 後 40 日以降に子宮角の太さや胎膜スリップの有無に基づいて行われてきた (90)。近年、携帯型超音波診断装置が一般的に普及してきたことから、AI 後 25–29 日以降に黄体の存在や胎子および胎子心拍の確認に基づいて早期妊娠診断が行われるようになった (26, 87)。しかし、ウシの発情周期は平均 21 日であり、現在の早期妊娠診断では、不妊であった場合に次回の発情を見落とすか発見が遅れる可能性がある。このことが、授精率や受胎率の低下を招いている。従って、発情周期の 21 日より前の妊娠診断（超早期妊娠診断）方法を確立することができれば発情発見率、授精率および受胎率の向上に繋がるものと考えられる。

そこで、本章では、ET から 7 日後つまり Day 14 の受胎牛の黄体血流量を解析し、受胎牛と不受胎牛における黄体の形態と血流量の比較を行い、ET 後の黄体血流量が超早期妊娠診断に有用であるかを検討した。

### 2-2. 材料及び方法

#### 供試動物

第 1-2. 章で ET を行った 58 頭を供試した。

#### 実験方法

発情発現日を Day 0 とし、Day 7 に黄体直径が 20mm 以上であることを確認し、黒毛和種牛の胚を 1 つ移植した。Day 14 に超音波画像診断装置を用いて黄体面積、

黄体組織面積，主席卵胞面積，BFA およびらせん動脈の黄体側基部の TAMV を測定した。また，超音波検査時に正中尾静脈より採血を行い，血漿 P<sub>4</sub> 濃度を測定した。Day 30 に超音波画像診断装置を用いて妊娠診断を行った。プロトコールの模式図を Fig. 2-1. に示した。

## ET

第 1・2. 章と同様に，Day 7 に黄体サイズが直径 20mm 以上である 58 頭に同一技術者が ET を行った。過剰排卵誘起処置および AI を行った黒毛和種牛から回収され，quality grade 1 および developmental stage 4 の胚（新鮮胚；n = 22，凍結融解胚；n = 36）を使用した。移植器は動物用受精卵注入カテーテル（モ 4 号；ミサワ医科工業株式会社，茨城，日本）を使用し，黄体側の子宮角深部に 1 つの胚を移植した。

## 妊娠診断

ET 後 23 日つまり Day 30 に，7.5MHz リニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置（Tringa V linear；Esaote SpA, Genoa, Italy）を用いて胎子の存在および心拍を基準として行った。

## 卵巣の超音波検査

超音波検査は Day 14 に行い，黄体と主席卵胞の形態は，7.5MHz のリニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置（MyLab five；Esaote SpA, Genoa, Italy）を用いて B モードにより観察した。主席卵胞または黄体の直径が最大になるように静止画を記録し，黄体面積、黄体内腔面積および主席卵胞面積を測定した。

黄体血流は，7.5MHz のリニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置

(MyLab five ; Esaote SpA, Genoa, Italy) を用いて color-flow Doppler mapping mode により観察を行った。黄体直径が最大になるような静止画を記録し、BFA を算出した。

黄体面積、黄体内腔面積、主席卵胞面積および BFA は、Image J を用いて算出した。黄体組織面積は、黄体面積から黄体内腔面積を差し引いて算出した。

卵巣動脈から分岐し卵巣実質内を走行するらせん動脈の黄体側基部の血流速度を測定し、TAMV を算出した。

#### 血漿 P<sub>4</sub> 濃度の測定

Day 14 に 21G 採血針とヘパリン加真空採血管（ベノジェクト II 真空採血管，TERUMO，東京，日本）を用い、尾静脈より 10ml の採血を行った。採血後直ちに氷冷し、30 分以内に 3,000g、15 分間遠心分離後、P<sub>4</sub> 測定まで -30℃ で凍結保存した。測定直前に室温にて融解し、第 1-2. 章と同様に EIA 法により血漿 P<sub>4</sub> 濃度を測定した。

#### 統計処理

結果はすべて平均値 ± 標準誤差で示した。受胎群と不受胎群において、黄体面積、黄体組織面積、主席卵胞面積、BFA、TAMV、Day 7 を基準とした BFA と TAMV の相対的变化および血漿 P<sub>4</sub> 濃度の平均値を比較するため、Student の t 検定を行った。統計処理には統計処理ソフトウェア SPSS 13 (SPSS Japan, 東京, 日本) を用いた。危険率 10%未満 ( $P < 0.1$ ) を傾向ありとし、危険率 5%未満 ( $P < 0.05$ ) で有意差ありとした。Day 14 における妊娠予測因子としてどの因子が最も優れているかを調べるために、ロジスティック回帰分析を行った。従属変数は受胎の成否、独立変数には 10 因子（年齢、産歴、分娩後日数、BCS、主席卵胞面積、黄体面積、

黄体組織面積，BFA，TAMV および血漿 P<sub>4</sub>濃度）を用いた。

従来から用いられている 3 つの妊娠予測因子（黄体面積，黄体組織面積および血漿 P<sub>4</sub>濃度）と新しい因子（BFA および TAMV）の妊娠予測精度の比較とカットオフ値を算出するために，ROC 解析を行った。ROC 曲線を作成後，Perkins ら（61）の報告に基づき感度と特異度が 100%である左上隅との距離を解析し，その距離が最小となる点を最適なカットオフ値と決定した。

## 2-3. 結果

### 黄体血流量の比較

BFA の比較を Fig. 2-2. A に示した。Day 14 における BFA は受胎群が不受胎群に比較して有意に高い値を示した（ $P < 0.01$ ）。

TAMV の比較を Fig. 2-2. B に示した。Day 14 における TAMV は受胎群が不受胎群に比較して有意に高い値を示した（ $P < 0.01$ ）。

Day 7 を基準とした BFA と TAMV の相対的変化を Fig. 2-3. に示した。BFA は両群間で有意な差は認められなかった。TAMV は受胎群が不受胎群比較して高い傾向を示した（ $P < 0.1$ ）。

### 黄体面積、主席卵胞面積および血漿 P<sub>4</sub>濃度の比較

受胎群および不受胎群における，黄体面積，黄体組織面積，主席卵胞面積および血漿 P<sub>4</sub>濃度の比較を Fig. 2-4. に示した。受胎群および不受胎群で全ての項目に有意な差は認められなかった。

## 黄体血流量による妊娠予測

受胎の成否を従属変数, 10 因子 (年齢, 産歴, 分娩後日数, BCS, 主席卵胞面積, 黄体面積, 黄体組織面積, BFA, TAMV および血漿 P<sub>4</sub> 濃度) を独立変数とした, 512通りのロジスティック回帰式を比較し, ベイズ情報量基準が最小のものを Table 2-1.に示した。Day 14 において BFA ( $P < 0.001$ ) と TAMV ( $P = 0.002$ ) が優れた妊娠予測因子であることが分かった。従来から用いられてきた黄体面積, 黄体組織面積および血漿 P<sub>4</sub> 濃度は妊娠予測に有用ではなく, Day 14 における  $P$  値はそれぞれ 0.807, 0.230 および 0.758 であった。

ROC 解析の結果を Fig. 2-5.に示した。Day 7 と同様に, Day 14 においても単一因子で妊娠予測を行う場合には BFA が最も優れた因子であることが分かった。また, ベイズ情報量基準で評価した場合, Day 14 においては, BFA のみを使用するよりも BFA と TAMV の 2 因子を考慮した重回帰式による妊娠予測が最も優れていた。

Day 14 における妊娠予測のためのカットオフ値の比較を Table 2-2.に示した。BFA のカットオフ値を 0.56 cm<sup>2</sup> に設定することで, 高い感度 (88.2%) と特異度 (79.2%) を同時に得ることができた。また, BFA と TAMV を組み合わせた場合, ロジスティック回帰式から予測される妊娠確率が 60%である BFA 0.63 cm<sup>2</sup> かつ TAMV 50.60 cm/s をカットオフ値に設定することでさらに高い感度 (85.3%) と特異度 (91.7%) を同時に得ることができた。

## 2-4. 考察

本章では, 受胎群と不受胎群において ET から 7 日後の黄体血流量を比較した。受胎群は不受胎群に比較して, Day 14 における BFA と TAMV が有意に高く, Day 7 を基準とした TAMV の相対的変化が高い傾向を示した。また, Day 14 において

は黄体面積や血漿 P<sub>4</sub> 濃度と比較して BFA と TAMV が妊娠予測に有用であり、ロジスティック回帰式から予測される妊娠確率が 60%である BFA 0.63 cm<sup>2</sup> かつ TAMV 50.60 cm/s をカットオフ値に設定することで最も高い感度 (85.3%) と特異度 (91.7%) を同時に得ることができた。従って、カラードプラ法による BFA と TAMV の測定は受胎牛の超早期妊娠診断に有用であると考えられた。

受胎群では不受胎群に比較して、Day 14 における BFA と TAMV が有意に高いことが示された。さらに、ロジスティック回帰分析の結果からも、受胎に影響を及ぼす因子は BFA と TAMV であり、黄体面積や血漿 P<sub>4</sub> 濃度は回帰式に含まれないことが明らかとなった。これらのことから、ET 後の黄体の豊富な血管形成や黄体に血液を供給しているらせん動脈の高速な血流が受胎に強い影響を及ぼしているものと考えられた。受胎群で Day 14 における BFA と TAMV が高い原因として、Day 7 において血管形成の多い黄体がその後も安定して血管形成を増加したことが考えられる。また、Interferon tau (IFN $\tau$ ) のような胚からのシグナルによって血流量が増加した可能性も考えられる。Day 7 を基準とした相対的变化は、BFA に有意な差は認められなかったが、TAMV は受胎群が不受胎群に比較して高い傾向を示した。このことから、両者ともに黄体血流量増加の原因となっていると推測した。ヒツジにおいて妊娠 12 日目以前、ウシにおいては 13 日から 14 日目に子宮から胚を除去すると黄体が退行し発情が回帰するが、13 日目以降の除去では黄体の寿命が延長される (53)。また、ヒツジに妊娠 14 日から 16 日目のヒツジ胚抽出物を子宮内投与すると、黄体の退行が抑制される (48)。これらのことから、この時期が母体の妊娠認識時期とされ、胚の栄養膜細胞から産生される IFN $\tau$  が妊娠認識物質として同定された (25, 38, 48, 67, 81)。IFN $\tau$  とその mRNA (*IFNT*) は後期桑実胚から初期胚盤胞の時期から検出され (33, 38)、妊娠牛においては Day 14-15 から *IFNT* mRNA 量と IFN $\tau$  産生量が劇的に増加する (18, 19)。しかし、胚が子宮に



接着を開始する（妊娠 18 から 20 日頃）とその産生は減少する（6, 22）。その作用は、着床前後の卵巢機能の制御、胚の発育や伸長、子宮内膜の機能の調節である（19）。妊娠認識時期に子宮内に IFN $\tau$  が存在することで、子宮内膜上皮上のオキシトシンレセプターの発現が抑制され、黄体退行が阻害される（29, 66, 88）。本章において試験を行った Day 14 は IFN $\tau$  産生量が急増する時期であることから、受胎群における黄体の豊富な血管形成と高速な血流は胚から産生された IFN $\tau$  による影響もあると推測された。この活発な血流が、黄体への栄養や P<sub>4</sub> の基質の供給を増加させ、P<sub>4</sub> 産生と分泌の増加をもたらしたのではないかと考えた。しかし、本章において、受胎群と不受胎群で Day 14 の血漿 P<sub>4</sub> 濃度に有意な差は認められなかった。黄体のある卵巢と同側の卵管や子宮角の P<sub>4</sub> 濃度は対側に比較して高く（95, 96）、卵巢と子宮間で局所循環する P<sub>4</sub> が存在すると考えられている（95, 96）。従って、活発な血管形成に伴う P<sub>4</sub> の産生と分泌の増加は、末梢血中の P<sub>4</sub> 濃度には影響を与えないが、黄体と同側の子宮角内の P<sub>4</sub> 濃度を増加させるのではないかと考えられた。さらに、母体の P<sub>4</sub> 濃度は胚の発育と胚からの IFN $\tau$  産生に影響を与え、母体の P<sub>4</sub> 濃度が高いと IFN $\tau$  の産生が増加することが示唆されている（37）。従って、子宮内の P<sub>4</sub> 濃度が高いことが胚の発育を促し、IFN $\tau$  産生量が増加し、さらに胚の発育と着床に適した環境となったのではないかと推測された。

近年、携帯型超音波診断装置を用いた AI 後 25－29 日以降の早期妊娠診断が一般的に行われている（26, 87）。さらに、超音波ドプラ法を用いた早期妊娠診断が試みられている（77, 89）。AI 後 20 および 21 日において、受胎牛では不受胎牛に比較して黄体血流量が多く、黄体血流量の視覚的評価は早期妊娠診断、特に不受胎牛の摘発に有用であると報告されている（77）。その一方で、受胎牛については、受胎牛の Day 19 における BFA が不受胎牛に比較して高いが、BFA 単独では感度と特異度が低いため早期妊娠診断には不十分であると報告されている（89）。本章では、

Day 14 における妊娠予測精度の比較を行うために ROC 解析を行った。その結果、BFA と TAMV の 2 因子を考慮した重回帰式による妊娠予測が最も優れていた。また、ロジスティック回帰式から予測される妊娠確率が 60%である BFA  $0.63 \text{ cm}^2$  かつ TAMV  $50.60 \text{ cm/s}$  をカットオフ値に設定することで最も高い感度と特異度を同時に得ることができた。これらのことから、Day 14 における妊娠予測には BFA と TAMV を組み合わせる方法が最適であると考えられた。従って、Day 14 に BFA 単独ではなく BFA と TAMV を評価することで、過去の報告よりも早期で尚且つ精度の高い超早期妊娠診断が可能となることが明らかになった。

以上のことから、Day 14 において、受胎群と不受胎群の黄体面積、黄体組織面積、主席卵胞面積、BFA、TAMV および血漿  $P_4$  濃度を比較し、妊娠予測に有用な因子を解析したところ、受胎群の BFA および TAMV が不受胎群に比較して高く、BFA と TAMV の組み合わせが妊娠予測に最も有用であることが明らかとなった。また、BFA  $0.63 \text{ cm}^2$  かつ TAMV  $50.60 \text{ cm/s}$  をカットオフ値に設定することで高い感度と特異度を同時に得ることができた。従って、Day 14 における BFA と TAMV の測定が超早期妊娠診断に有用であると考えられた。また、従来の方法より早期で尚且つ次回発情周期以前に妊娠診断を行うことで、不受胎牛の次回の発情発見率および AI 率または ET 率の向上に繋がるものと考えられた。

## 2-5. 小括

ET から 7 日後に受胎牛の BFA および TAMV を評価することは超早期妊娠診断に有用であることが示された。また、従来から行われている妊娠診断よりも早期で次回発情周期以前に実施することが可能であるため、不受胎の場合には発情発見率および AI 率または ET 率の向上に繋がるものと推測された。

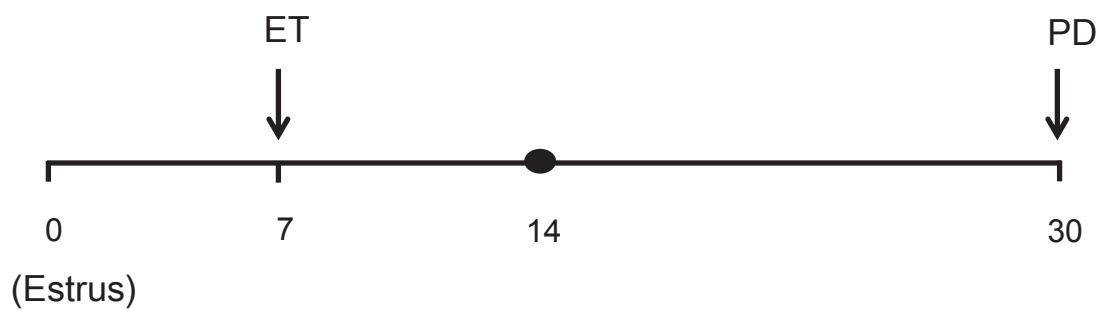


Fig. 2-1. Schematic views of treatments, ultrasound examinations, and sampling schedules. The day on which the recipient cow had been observed to be in standing estrus was considered to be Day 0. Ultrasound examination of ovaries and blood samplings (●) were conducted on Day 14. Embryo transfer (ET) and pregnancy diagnosis (PD) were conducted on Day 7 and 30, respectively.

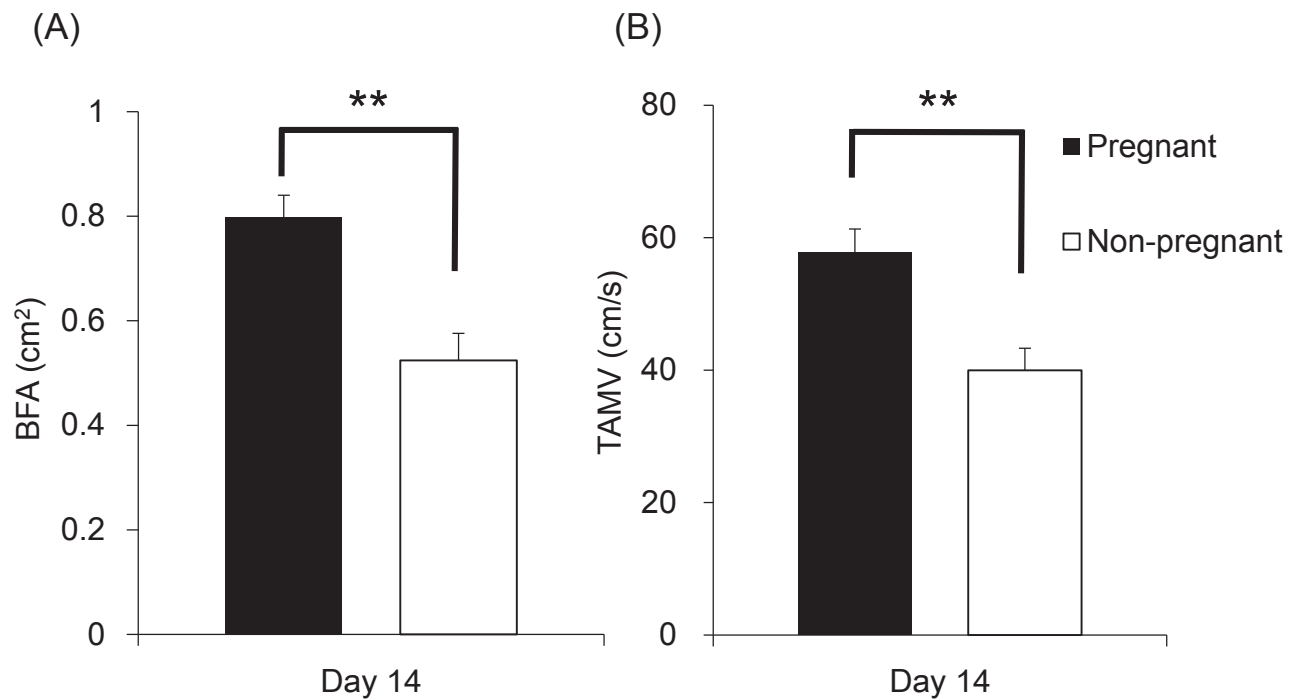


Fig. 2-2. The blood flow area (BFA) of the corpus luteum (A) and the time-averaged maximum velocity (TAMV) of the spiral artery (B) on Day 14. Black bars represent the pregnant group (n = 34). White bars show the non-pregnant group (n = 24). Data points show the mean  $\pm$  SEM for each day. The BFA and TAMV of the pregnant group were significantly higher than those of the non-pregnant group on 14.

\*\* Difference between the two groups ( $P < 0.01$ ) indicated.

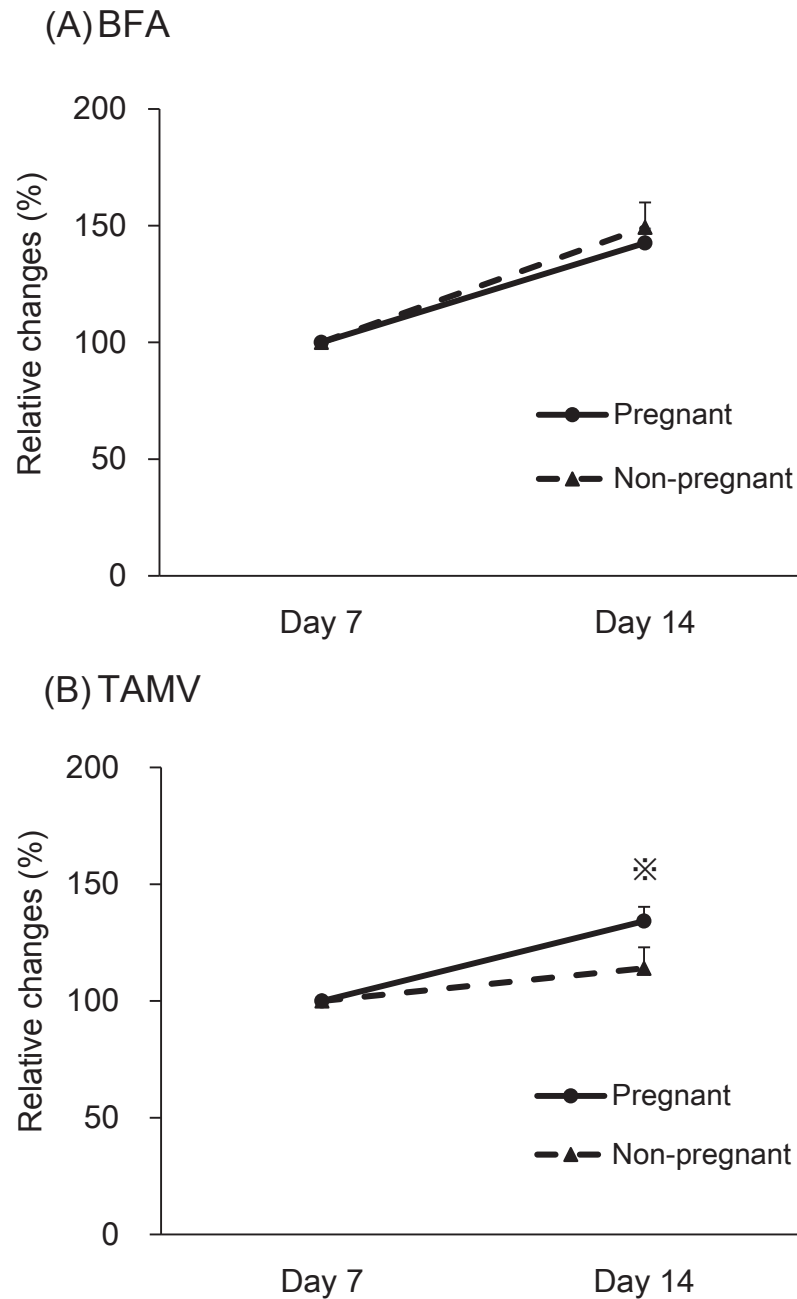


Fig. 2-3. Relative changes of the blood flow area (BFA) (A) and the time-averaged maximum velocity (TAMV) (B) (% of respective values on Day 7). Data points show the mean  $\pm$  SEM for each day. The relative change of BFA did not differ among these groups. The relative change of TAMV in the pregnant group tended to be higher than that in the non-pregnant group.

※ Difference between the two groups ( $P < 0.1$ ) on the day indicated.

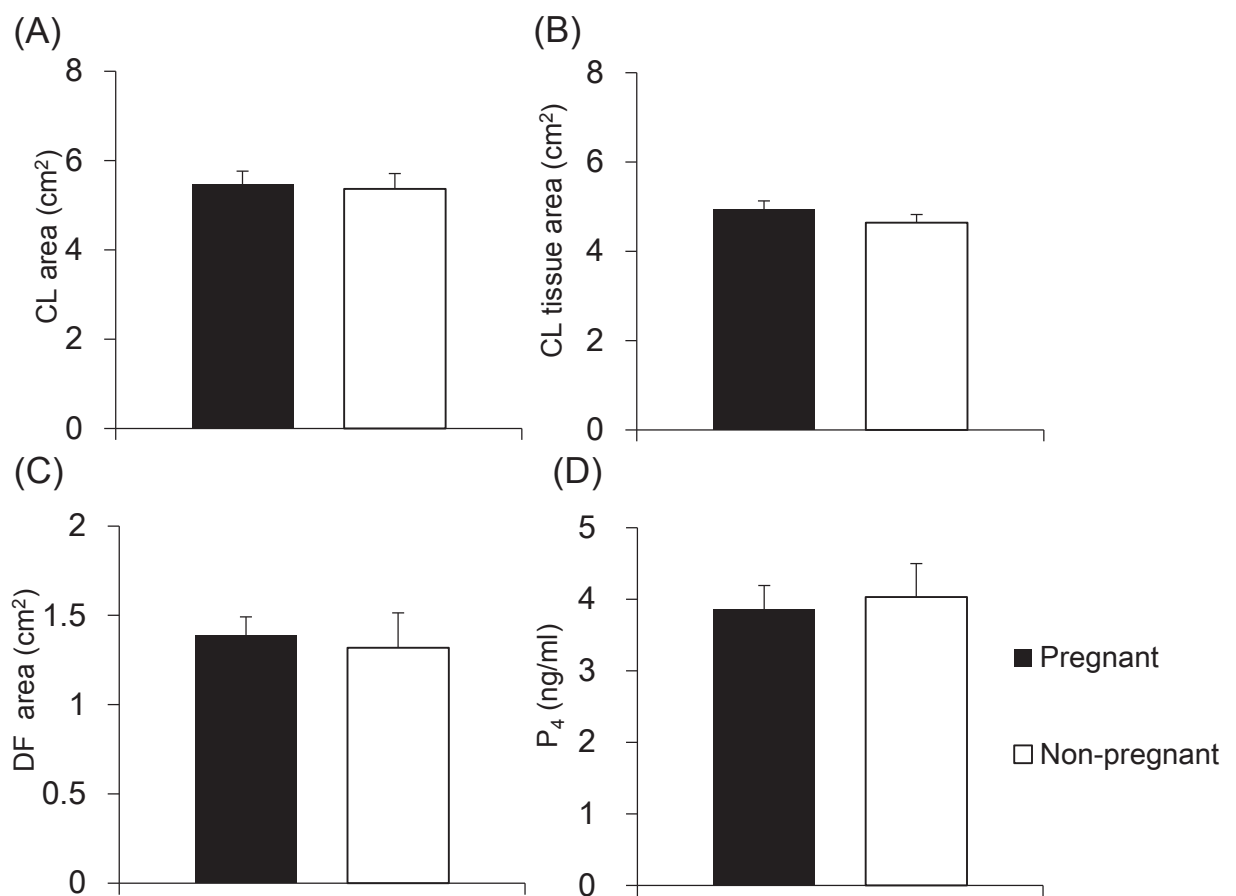


Fig. 2-4. The corpus luteum (CL) area (A), CL tissue area (B), dominant follicle (DF) area (C), and plasma P<sub>4</sub> concentrations (D) on Day 14. Black bars represent the pregnant group (n = 34). White bars show the non-pregnant group (n = 24). Data points show the mean  $\pm$  SEM for each day. In both groups, these trait values did not differ between the groups.

Table 2-1. Coefficients for regression models with the lowest Bayesian Information Criteria on Day 14.

	Estimate	Standard error	z-statistic	<i>P</i> -value
Intercept	- 9.09	2.55	- 3.57	< 0.001
BFA on Day 14	8.05	2.42	3.33	< 0.001
TAMV on Day 14	0.0872	0.0276	3.16	0.002

Abbreviations: BFA; blood flow area, TAMV; time-averaged maximum velocity.

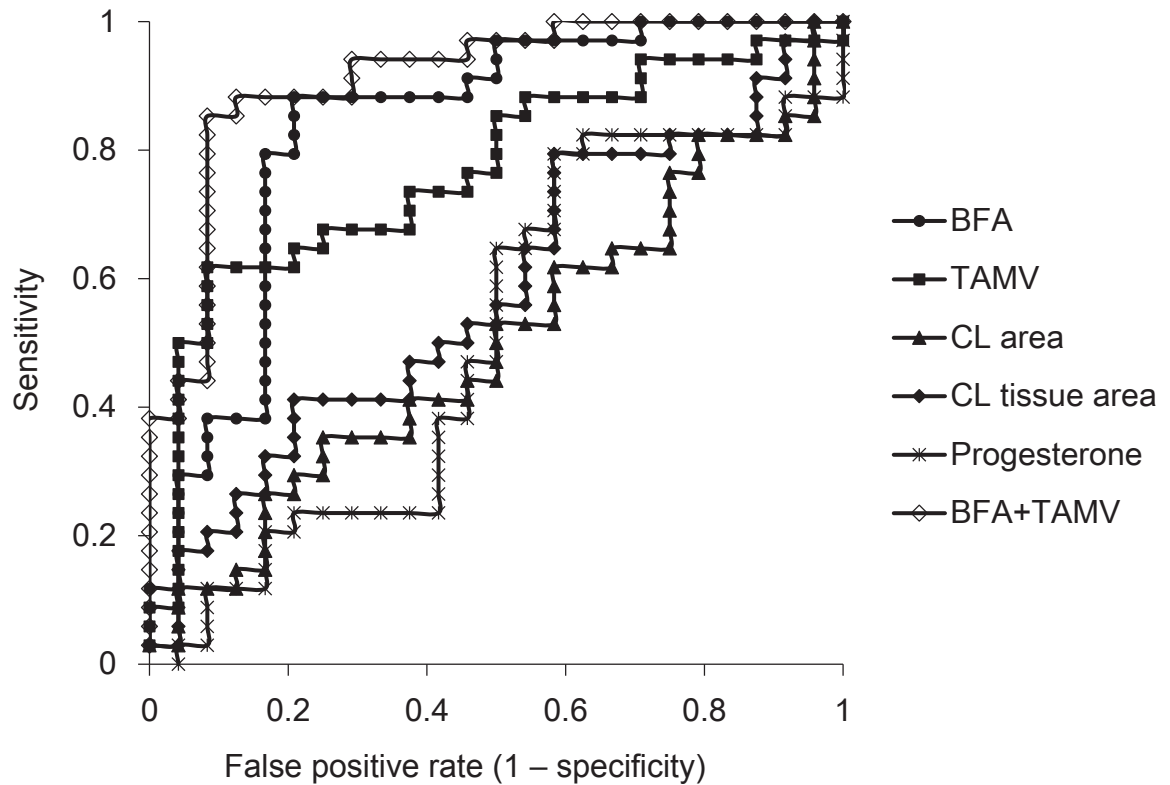


Fig. 2-5. Receiver operating characteristic (ROC) curves of the five pregnancy predictors on Day 14. The horizontal and vertical axes are a false positive rate (1 - specificity) and sensitivity, respectively. Thus, the upper left corner is the ideal point of 100% sensitivity and 100% specificity. The paired BFA and TAMV were the most appropriate predictors among the other predictors. Abbreviations: BFA; blood flow area, TAMV; time-averaged maximum velocity, CL; corpus luteum.



Table 2-2. Summary of the ROC analyses of five independent variables on Day 14.

	Cutoff value	Sensitivity	Specificity
BFA and TAMV	0.60 <sup>a</sup>	0.853	0.917
BFA (cm <sup>2</sup> )	0.56	0.882	0.792
TAMV (cm/s)	52.8	0.618	0.917
CL area (cm <sup>2</sup> )	5.11	0.529	0.500
CL tissue area (cm <sup>2</sup> )	4.28	0.794	0.417
P <sub>4</sub> concentrations (ng/ml)	3.21	0.647	0.500

<sup>a</sup> The cutoff value at pregnancy probability 60.0% ; BFA 0.63 cm<sup>2</sup> and TAMV 50.60 cm/s.

Abbreviations: ROC; Receiver operating characteristic, BFA; blood flow area, TAMV; time-averaged mean velocity, CL; corpus luteum.

### 第3章 性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）製剤投与による黄体血流量と超早期妊娠診断精度への影響

#### 3-1. 序論

GnRH は、視床下部から分泌される神経ペプチドであり、哺乳類において繁殖機能の制御の中心的役割を担っている（16）。以前より、AI 後または ET 前後の様々な時期の GnRH 製剤の投与が、受胎性や血中 P<sub>4</sub> 濃度に及ぼす影響が解析されている（31, 54, 62, 72, 73, 92）。GnRH 製剤の投与により LH が急増し（16）、共存する直径 10mm 以上の卵胞が排卵し副黄体が形成される（69, 72, 73, 94）。それに伴い、血中 P<sub>4</sub> 濃度が増加するという報告と（72, 73）、増加しないとする報告がある（83）。また、血中 P<sub>4</sub> 濃度が増加することで受胎率が向上する（73, 91）という報告もあるが、受胎率の向上が認められない（21）とする報告もある。つまり、血中 P<sub>4</sub> 濃度と受胎への効果は未だ十分には分かっていない。また、黄体は様々な血管新生因子を産生することで血管形成を制御している（74）。血管新生因子の産生には LH と FSH が関与していることが知られている（39, 99）。従って、GnRH 製剤の投与により LH と FSH が増加することで血管形成が変化する可能性がある。しかしながら、黄体血流量に対する GnRH 製剤の投与効果は全く明らかになっていない。さらに、第 1 章および第 2 章より、Day 7 において BFA、Day 14 において BFA と TAMV の組み合わせが妊娠予測に有用であることが示された。そのため、GnRH 製剤の投与が妊娠予測精度にも影響を及ぼすのではないかと考えた。

そこで、本章では、Day 5 に GnRH 製剤投与牛と非投与牛の ET 前から ET 後の黄体や卵胞の形態、血漿 P<sub>4</sub> 濃度および黄体血流量を解析し、Day 5 における GnRH

製剤の投与が黄体血流量および妊娠予測精度に及ぼす影響を検討した。

### 3-2. 材料及び方法

#### 供試動物

臨床的に健康で、分娩後 50 日以上経過し正常な発情周期を有するホルスタイン種経産牛 120 頭 ( $4.20 \pm 0.17$  歳,  $2.48 \pm 0.14$  産, 平均  $\pm$  標準誤差) を供試した。供試牛は宮城県内 1 酪農家のフリーストール牛舎にて乾草および濃厚飼料が混合された TMR が給与され, 自由飲水できる状況で飼養されていた。全頭が 1 日 2 回搾乳され, 平均乳量は  $28.29 \pm 2.42\text{kg/日}$  (平均  $\pm$  標準誤差) であった。BCS は Edmonson ら (20) の方法に基づき発情日に測定し,  $3.24 \pm 0.04$  (平均  $\pm$  標準誤差) であった。

#### 実験方法

供試牛を無作為に对照群 ( $n = 63$ ) と GnRH 投与群 ( $n = 57$ ) に分類した。GnRH 投与群は, Day 5 (発情発現日 = Day 0) の超音波検査直後に GnRH 製剤 ( $100\mu\text{g}$ ; 酢酸フェルチレリン, コンセラル; ナガセ医薬品株式会社, 兵庫, 日本) を筋肉内投与した。また, Day 3, 5, 7, および 14 に超音波画像診断装置を用いて黄体面積, 黄体組織面積, 主席卵胞面積, BFA およびらせん動脈の黄体側基部の TAMV を測定した。超音波検査時に正中尾静脈より採血を行い, 血漿  $\text{P}_4$  濃度を測定した。尚, GnRH 投与群では, Day 5 の超音波検査および採血は GnRH 製剤投与前に行った。Day 7 に, 黄体直径が 20mm 以上であることを確認し, 黒毛和種牛の胚を 1 つ移植した。尚, Day 7 の超音波検査および採血は ET 前に行った。Day 30 に超音波画像診断装置を用いて妊娠診断を行った。プロトコルの模式図を Fig. 3-1. に示

した。

## ET

第 1-2. および 2-2. 章と同様に, Day 7 に黄体サイズが直径 20mm 以上であることを確認し同一技術者が ET を行った。過剰排卵誘起処置および AI を行った黒毛和種牛から回収され, quality grade 1 および developmental stage 4 の胚 (新鮮胚; n = 48, 凍結融解胚; n = 72) を使用した。移植器は動物用受精卵注入カテーテル (モ 4 号; ミサワ医科工業株式会社, 茨城, 日本) を使用し, 黄体側の子宮角深部に 1 つの胚を移植した。

## 妊娠診断

ET 後 23 日つまり Day 30 に, 7.5MHz リニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置 (Tringa V linear; Esaote SpA, Genoa, Italy) を用いて胎子の存在および心拍を指標として行った。

## 卵巣の超音波検査

超音波検査は Day 3, 5, 7 および 14 に行った。第 1-2. および 2-2. 章と同様に, 7.5MHz のリニアプローブが付属した経直腸超音波画像診断装置 (MyLab five; Esaote SpA, Genoa, Italy) を用いて B モードにより黄体面積, 黄体内腔面積および主卵胞面積を算出した。黄体面積と黄体内腔面積の差を黄体組織面積とした。尚, GnRH 投与群では, Day 14 における副黄体の形成の有無も調査した。また, color-flow Doppler mapping mode を使用し, Day 7 から存在している黄体の BFA およびらせん動脈の黄体側基部の TAMV を測定した。

### 血漿 P<sub>4</sub> 濃度の測定

超音波検査時 (Day 3, 5, 7 および 14) に 21G 採血針とヘパリン加真空採血管 (ベノジェクト II 真空採血管, TERUMO, 東京, 日本) を用い, 尾静脈より 10ml の採血を行った。採血後直ちに氷冷し, 30 分以内に 3,000g, 15 分間遠心分離後, P<sub>4</sub> 測定まで -30℃ で凍結保存した。測定直前に室温にて融解し, 第 1・2 章と同様に EIA 法により血漿中 P<sub>4</sub> 濃度を測定した。

### 統計処理

結果はすべて平均値 ± 標準誤差で示した。対照群と GnRH 投与群で受胎率の比較を行うために, フィッシャーの直接確率計算法を用いた。対照群 (受胎群および不受胎群) と GnRH 投与群 (受胎群および不受胎群) において, 黄体面積, 黄体組織面積, 主席卵胞面積, BFA, TAMV および血漿 P<sub>4</sub> 濃度の平均値の差の検定を行うために, Bonferroni の多重比較検定を行った。統計処理には統計処理ソフトウェア SPSS 13 (SPSS Japan, 東京, 日本) を用いた。危険率 5%未満 ( $P < 0.05$ ) で有意差ありとした。さらに, 対照群と GnRH 投与群それぞれで, 従来から用いられている 3 つの妊娠予測因子 (黄体面積, 黄体組織面積, 血漿 P<sub>4</sub> 濃度) と新しい因子 (BFA および TAMV) の Day 7 および 14 における妊娠予測精度の比較を行うために, ROC 解析を行った。ROC 曲線を作成後, Perkins ら (61) の報告に基づき感度と特異度が 100%である左上隅との距離を解析し, その距離が最小となる点を最適なカットオフ値と決定した。

また, 対応のない DeLong 検定 (13, 68) を用いて対照群と GnRH 群の ROC 曲線下面積 (AUC) の比較を行った。GnRH 製剤の投与は妊娠予測能を向上させるという仮定に基づき片側検定を用いた。

### 3-3. 結果

#### 胚の種類および産歴の比較

新鮮胚と凍結融解胚の受胎率は、54.2% (26/48) と 62.5% (45/72) で受胎率に差が認められなかった。従って、胚の種類による影響は考慮せず、全てまとめて解析を行った。対照群および GnRH 群における年齢、産歴、分娩後日数および BCS を Table 3-1. に示した。全ての項目で両群において有意な差が認められなかった ( $P > 0.1$ )。

Day 30 における妊娠診断後、供試牛を対照-受胎群 ( $n = 35$ )、対照-不受胎群 ( $n = 28$ )、GnRH-受胎群 ( $n = 36$ ) および GnRH-不受胎群 ( $n = 21$ ) の 4 群に分類し、各項目を比較検討した。4 群の年齢、産歴、分娩後日数および BCS を Table 3-2. に示した。全ての項目において 4 群間で有意な差が認められなかった ( $P > 0.1$ )。

#### 黄体血流量、黄体と主席卵胞の形態および血漿 $P_4$ 濃度に対する GnRH 製剤の投与効果

BFA および TAMV の推移を Fig. 3-2. に示した。試験期間中、対照群および GnRH 投与群ともに、BFA は次第に増加し Day 7 および 14 において GnRH 投与群が対照群に比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.01$ )。TAMV は両群ともに次第に増加し、有意な差は認められなかった。

黄体面積、黄体組織面積、血漿  $P_4$  濃度および主席卵胞面積の推移を Fig. 3-3. に示した。試験期間中、黄体面積、黄体組織面積および血漿  $P_4$  濃度は両群ともに次第に増加し、2 群間で有意な差は認められなかった ( $P > 0.1$ )。主席卵胞面積は、Day 7 および 14 において、GnRH 投与群が対照群に比較して有意に低値を示した ( $P < 0.01$  および  $P < 0.05$ )。また、GnRH 投与群において、Day 14 の副黄体形成率は

96.5% (55/57) であった。

#### 受胎率の比較

対照群と GnRH 投与群の受胎率は、それぞれ 55.6% (35/63) と 63.2% (36/57) であり有意な差は認められなかった ( $P > 0.1$ )。

#### 受胎牛と不受胎牛における黄体血流量の比較

Day 3 および 5 における受胎群および不受胎群の BFA と TAMV の比較を Fig. 3-4. に示した。Day 5 において受胎群が不受胎群に比較して BFA が有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。

対照-受胎群、対照-不受胎群、GnRH-受胎群および GnRH-不受胎群の 4 群における BFA の比較を Fig. 3-5. (Day 7) および 3-6. (Day 14) に示した。Day 7 および 14 において、ホルモン処置に関わらず、受胎群は不受胎群に比較して BFA が有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。さらに、GnRH-受胎群の BFA は対照-受胎群に比較して、Day 7 および 14 において有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。

4 群における TAMV の比較を Fig. 3-7. に示した。Day 7 において、GnRH-受胎群の TAMV は GnRH-不受胎群に比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。また、Day 14 においては、ホルモン処置に関わらず、受胎群は不受胎群に比較して TAMV が有意に高い値を示した ( $P < 0.01$ )。

4 群における黄体面積および黄体組織面積の推移の比較を Fig. 3-8. に示した。黄体面積、黄体組織面積ともに 4 群間で有意な差は認められなかった ( $P > 0.1$ )。

#### 妊娠予測精度の比較

ROC 解析の結果を Fig. 3-9. (Day 7) および Fig. 3-10. (Day 14) に示した。Day

7 および Day 14 において、対照群、GnRH 投与群ともに単一因子では BFA が妊娠予測に最も優れた因子であることが示された。さらに、Day 7 では上記の BFA 単一因子による予測が、その他の因子による予測や複数因子による予測と比較して最も優れていた。一方、Day 14 では、対照群と同様に GnRH 投与群においても、BFA のみを使用するよりも BFA と TAMV を組み合わせた方が妊娠予測に有用であることが示された。

GnRH 投与群の Day 7 における妊娠予測のためのカットオフ値の比較を Table 3-3 に示した。BFA のカットオフ値を  $0.52 \text{ cm}^2$  に設定することで、高い感度 (83.3%) と特異度 (90.5%) を同時に得ることができた。また、GnRH 投与群の Day 14 における妊娠予測のためのカットオフ値の比較を Table 3-4 に示した。BFA と TAMV を組み合わせた場合、ロジスティック回帰式から予測される妊娠確率が 58.3% である BFA  $0.94 \text{ cm}^2$  かつ TAMV  $44.93 \text{ cm/s}$  をカットオフ値に設定することでさらに高い感度 (97.1%) と特異度 (100%) を同時に得ることができた。Day 7 においては BFA、Day 14 においては BFA と TAMV のペアによる妊娠予測精度の比較を行うために、対照群と GnRH 投与群の ROC 曲線を Fig. 3-11 に示した。Day 7 および 14 ともに、GnRH 投与群の曲線は対照群に比較して左上方に描かれ、GnRH 投与群の妊娠予測精度は対照群に比較して優れていることが示された。また、AUC の比較を Table 3-5 に示した。Day 7 において、GnRH 投与群の BFA の AUC は、対照群に比較して 0.084 広がった ( $P=0.126$ )。Day 14 において、GnRH 投与群の BFA と TAMV の 2 因子を考慮した予測の AUC は、対照群に比較して 0.058 広がった ( $P<0.05$ )。

#### 3-4. 考察

本章では、ET 前の GnRH 製剤投与が ET 前後の黄体血流量と妊娠予測精度に及



ばす影響について検討した。Day 7において、GnRH 投与群の BFA は対照群に比較して有意に高値を示した。さらに、GnRH-受胎群では、対照群および GnRH-不受胎群に比較して Day 7 の BFA が高値を示した。しかし、GnRH 投与群と対照群で TAMV に差は認められなかった。また、ROC 解析の結果から、GnRH 投与群においても Day 7 では BFA が最も優れた妊娠予測因子であることが示された。BFA のカットオフ値を  $0.52 \text{ cm}^2$  に設定することで、高い感度と特異度を同時に得ることができた。第 1-2 章で得られた予測精度と比較すると、GnRH 投与により妊娠予測の精度が向上することが示唆された（感度 3.9%および特異度 15.5%）。さらに、対応のない DeLong 検定の結果から、GnRH 投与群の BFA の AUC は、対照群に比較して 0.084 広いことが示されたが、有意な差ではなかった。

Day 14 においても、GnRH 投与群の BFA は対照群に比較して有意に高値を示した。さらに、GnRH-受胎群では、対照群および GnRH-不受胎群に比較して Day 14 の BFA が高値を示した。また、ROC 解析の結果から、GnRH 投与群においても Day 14 では BFA と TAMV の 2 因子を考慮した重回帰式による妊娠予測が最も優れていた。ロジスティック回帰式から予測される妊娠確率が 58.3%である BFA  $0.94 \text{ cm}^2$  かつ TAMV  $44.93 \text{ cm/s}$  をカットオフ値に設定することで高い感度と特異度を同時に得ることができた。第 2 章で得られた予測精度と比較すると、GnRH 投与により Day 14 における妊娠予測の精度が向上することが示唆された（感度 11.8%および特異度 8.3%）。さらに、対応のない DeLong 検定の結果から、GnRH 投与群における BFA と TAMV の 2 因子を考慮した予測の AUC は、対照群に比較して有意に広いことが示された。従って、GnRH 製剤の投与により、Day 14 における妊娠予測精度が有意に向上することが示された。この妊娠予測精度の向上は、GnRH 製剤の投与により Day 14 における受胎群と不受胎群の BFA の差が拡大することに起因していると考えられた。

GnRH は、視床下部から分泌され、脳下垂体からの LH と FSH の産生と分泌を刺激する (16)。GnRH 製剤は、牛群の繁殖管理を行うには必要不可欠であり、生体内で産生される GnRH に比較して半減期が長く GnRH レセプターに対する親和性が高いことが知られている (35)。また、黄体は、小型黄体細胞、大型黄体細胞、血管内皮細胞、pericyte といった多様な細胞で構成されている (59)。ウシの黄体を構成する細胞のうち 50%以上が血管内皮細胞、約 30%が黄体細胞であり (41, 59)、正常な黄体の発育には十分な血管形成が必要である。この血管形成を制御しているのは、黄体細胞から産生される血管新生因子である (74)。血管新生因子のうち、血管内皮細胞増殖因子 A (VEGFA) と線維芽細胞増殖因子 (FGF2) が中心となって血管形成を制御している (74)。また、FSH と LH は血管新生因子を制御し、黄体の血管形成に関与している (39, 99)。Fátima らは、FSH が VEGFA と FGF2 の産生と黄体細胞や顆粒層細胞における VEGFA と FGF2 レセプターの発現を増加すると示唆している (23)。従って、GnRH 製剤の投与により上昇した FSH または LH によって VEGFA と FGF2 の産生が増加し、Day 7 および 14 の BFA が増加したと推測した。しかし、これらの性腺刺激ホルモンにより直接的に引き起こされるのか、または他の要因により引き起こされるのかは、今後追及する必要があると考える。

また、Day 7 および 14 における主席卵胞面積は、GnRH 投与群が対照群に比較して有意に低値を示した。さらに、GnRH 投与群の Day 14 における副黄体形成率は 96.5% (55/57) であった。これらの結果は、副黄体形成率が 93%であるとする過去の報告と一致していた (73)。GnRH 製剤投与後、LH 濃度が急激に上昇し (LH サージ)、26-34 時間後に排卵に至る (1)。Day 5 または 6 に GnRH 製剤を投与すると、LH の急増に伴い第 1 卵胞波の直径 10 mm 以上の主席卵胞が排卵し、副黄体が形成されることが知られている (69, 72, 73, 94)。従って、本章における GnRH

投与群における主席卵胞面積の減少は、GnRH 製剤投与後に発生した LH サージにより、第 1 卵胞波の主席卵胞が排卵した結果であると考えた。

以前より、AI 後または ET 前にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)または GnRH 製剤の投与により、受胎性を向上させる試みが行われてきた(31, 54, 58, 62, 63, 72, 73, 75, 91)。hCG は半減期が長く強い LH 作用を持つため、Day 4 から 7 に投与すると黄体機能賦活作用に加えて、副黄体が形成されることで血中 P<sub>4</sub> 濃度が増加する(58, 63, 73)。そのため、hCG 投与により受胎率が向上するという報告もある(58, 75)が、向上しないという報告(73)もある。その一方で、GnRH 製剤についても Day 5 または 7 の投与により受胎率が向上するという報告もあるが(73, 83, 91)、Ellington ら(21)は、受胎率は向上しないと報告している。本章では、対照群と GnRH 投与群の受胎率は、それぞれ 55.6 %と 63.2 %であり有意な差は認められなかった。Day 7 における黄体直径が 20 mm 以上であるウシのみを供試しているため、GnRH 製剤による受胎率向上効果が認められなかった可能性がある。一般的に、受胎率が劣るとされている直径 20 mm 未満の個体に対しては、受胎率が向上する可能性があるかと推測した。

黄体面積と黄体組織面積は、対照群と GnRH 投与群において有意な差は認められなかった。この結果は、Day 5 に GnRH 製剤を投与したウシと非投与のウシでは、その後の黄体重量に差がないという過去の報告(72)と一致している。また、発情 5 日後の GnRH 製剤投与により Day 11 から 16 の血漿 P<sub>4</sub> 濃度が上昇するという報告がある(72, 73)。その一方で、Sterry ら(83)は、AI 後 5 日の GnRH 投与は AI 後 5 から 19 日の血漿 P<sub>4</sub> 濃度に影響を与えないと報告している。本章においては、GnRH 投与による血漿 P<sub>4</sub> 濃度の上昇は認められなかった。本章においては、Day 7 における黄体直径が 20 mm 以上であるウシのみを供試した。そのため、対照群、GnRH 投与群のどちらも元々の P<sub>4</sub> 産生能が高かったと考えられる。GnRH

投与群では、GnRH 製剤投与により新たな副黄体が形成されたが、元々の P<sub>4</sub> 濃度が高いため顕著な P<sub>4</sub> 濃度の上昇が見られなかったと推測される。Day 7 の黄体直径が 20 mm 未満のウシに関しては、元々の P<sub>4</sub> 産生能が低いことが推察されるので、GnRH 製剤投与による血漿 P<sub>4</sub> 濃度の上昇効果が得られる可能性があると考えた。

以上のことから、Day 5 における GnRH 製剤の投与により Day 7 と 14 の BFA が増加し、Day 14 における BFA と TAMV に基づく妊娠予測の精度が向上することが示された。従って、Day 5 に GnRH 製剤投与後、ET を行い Day 14 に黄体血流量を評価することで、超早期妊娠診断の精度が向上することが示された。

### 3-5. 小括

Day 5 に GnRH 製剤を投与することで、Day 14 の受胚牛の BFA および TAMV に基づく超早期妊娠診断の精度が向上することが示された。

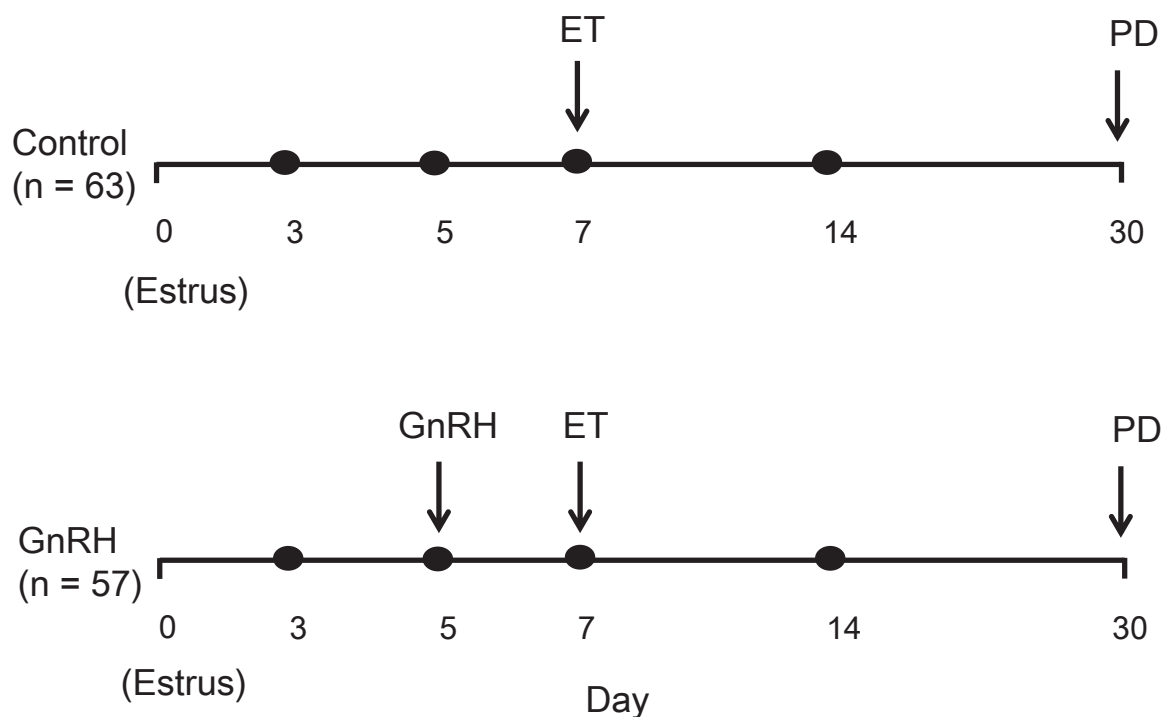


Fig. 3-1. Schematic views of treatments, ultrasound examinations, and sampling schedules. The day on which the recipient cow had been observed to be in standing estrus was considered to be Day 0. Ultrasound examinations of ovaries and blood samplings (●) were conducted on Day 3, 5, 7, and 14. Embryo transfer (ET) and pregnancy diagnosis (PD) were conducted on Day 7 and 30, respectively. Cows in the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) group received GnRH analogs (100 µg, i.m.) on Day 5 after ultrasound examination and blood sampling.

Table 3-1. Summary of the animals used in the current study.

	Total	Control	GnRH	<i>P</i> -value
Number	120	63	57	
Age	4.20 ± 0.17	4.16 ± 0.25	4.25 ± 0.22	0.80
Lactation number	2.48 ± 0.14	2.51 ± 0.21	2.46 ± 0.17	0.85
Days after calving	137.58 ± 7.17	127.06 ± 10.14	149.19 ± 9.89	0.13
BCS	3.24 ± 0.04	3.21 ± 0.05	3.28 ± 0.06	0.40
Fresh embryo	48	27	21	
Frozen embryo	72	36	36	

All data are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation: BCS; Body condition scores.

Table 3-2. Details of animals in the four groups categorized based on their pregnancy diagnosis on Day 30.

	Control		GnRH	
	Pregnant	Non-pregnant	Pregnant	Non-pregnant
Number	35	28	36	21
Age	4.37 ± 0.35	3.89 ± 0.34	4.08 ± 0.25	4.52 ± 0.40
Lactation number	2.63 ± 0.28	2.36 ± 0.31	2.31 ± 0.19	2.71 ± 0.32
Days after calving	141.20 ± 15.69	109.39 ± 10.76	138.75 ± 12.59	167.10 ± 15.21
BCS	3.25 ± 0.08	3.16 ± 0.06	3.22 ± 0.07	3.38 ± 0.09

All data are presented as the mean ± SEM.

Abbreviation: BCS; Body condition scores.

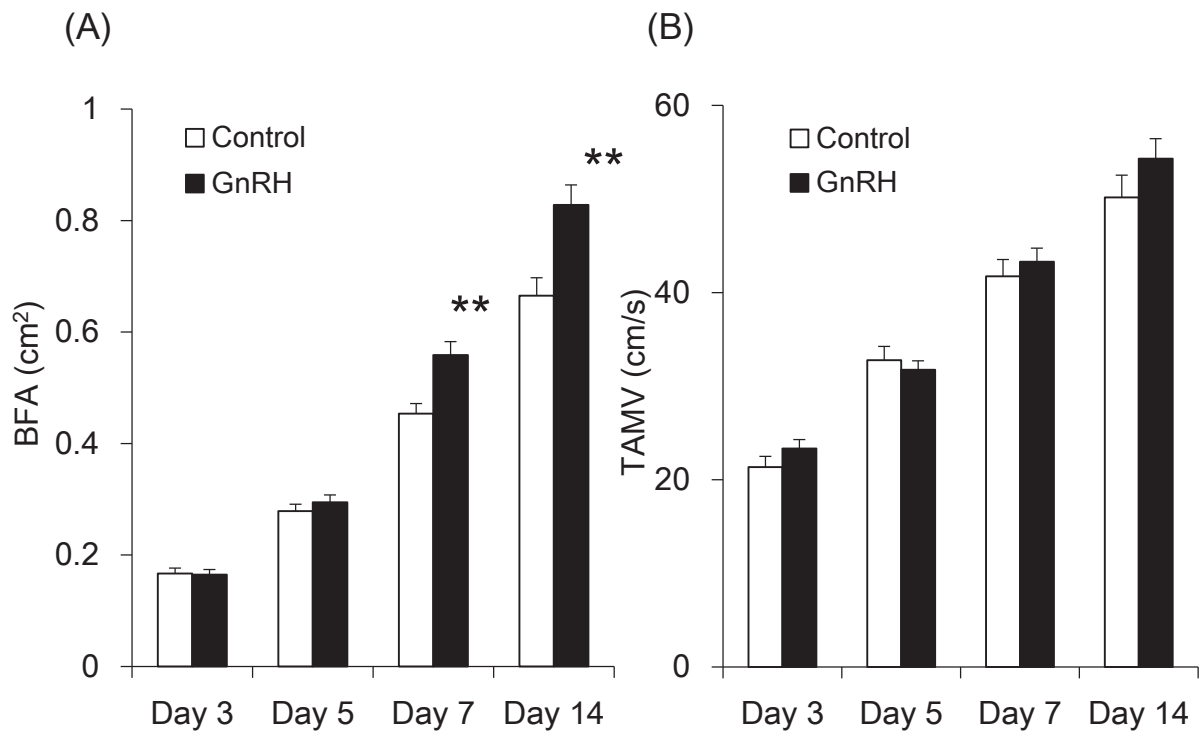


Fig. 3-2. Changes in the blood flow area (BFA) of the corpus luteum (A) and the time-averaged maximum velocity (TAMV) of the spiral artery (B). White and black bars represent the control group ( $n = 63$ ) and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) group ( $n = 57$ ), respectively. Data points show the mean  $\pm$  SEM for each day. The BFAs of the GnRH group were significantly higher than those of the control group on Day 7 and 14. The TAMV did not differ among these groups.

\*\* Difference between the two groups ( $P < 0.01$ ) on the day indicated.



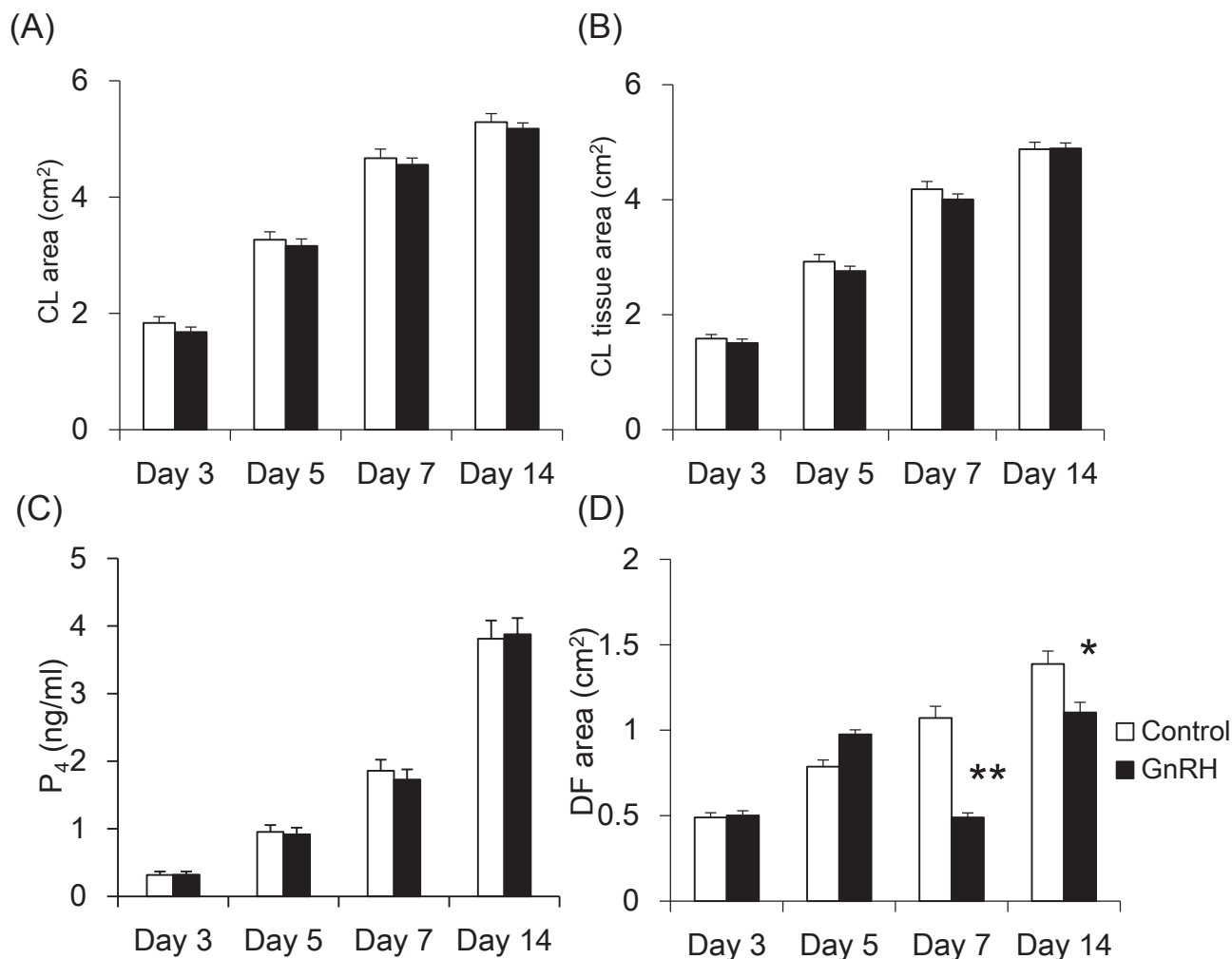


Fig. 3-3. Changes in the corpus luteum (CL) area (A), CL tissue area (B), plasma P<sub>4</sub> concentrations (C), and dominant follicle (DF) area (D). Black bars represent gonadotropin-releasing hormone (GnRH) group (n = 57). White bars show the control group (n = 63). Data points show the mean  $\pm$  SEM for each day. The CL area, CL tissue area and plasma P<sub>4</sub> concentrations did not differ among these groups. The DF areas of the GnRH group were significantly lower than those of the control group on Days 7 and 14.

\*, \*\* Difference between the two groups (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ) on the day indicated.

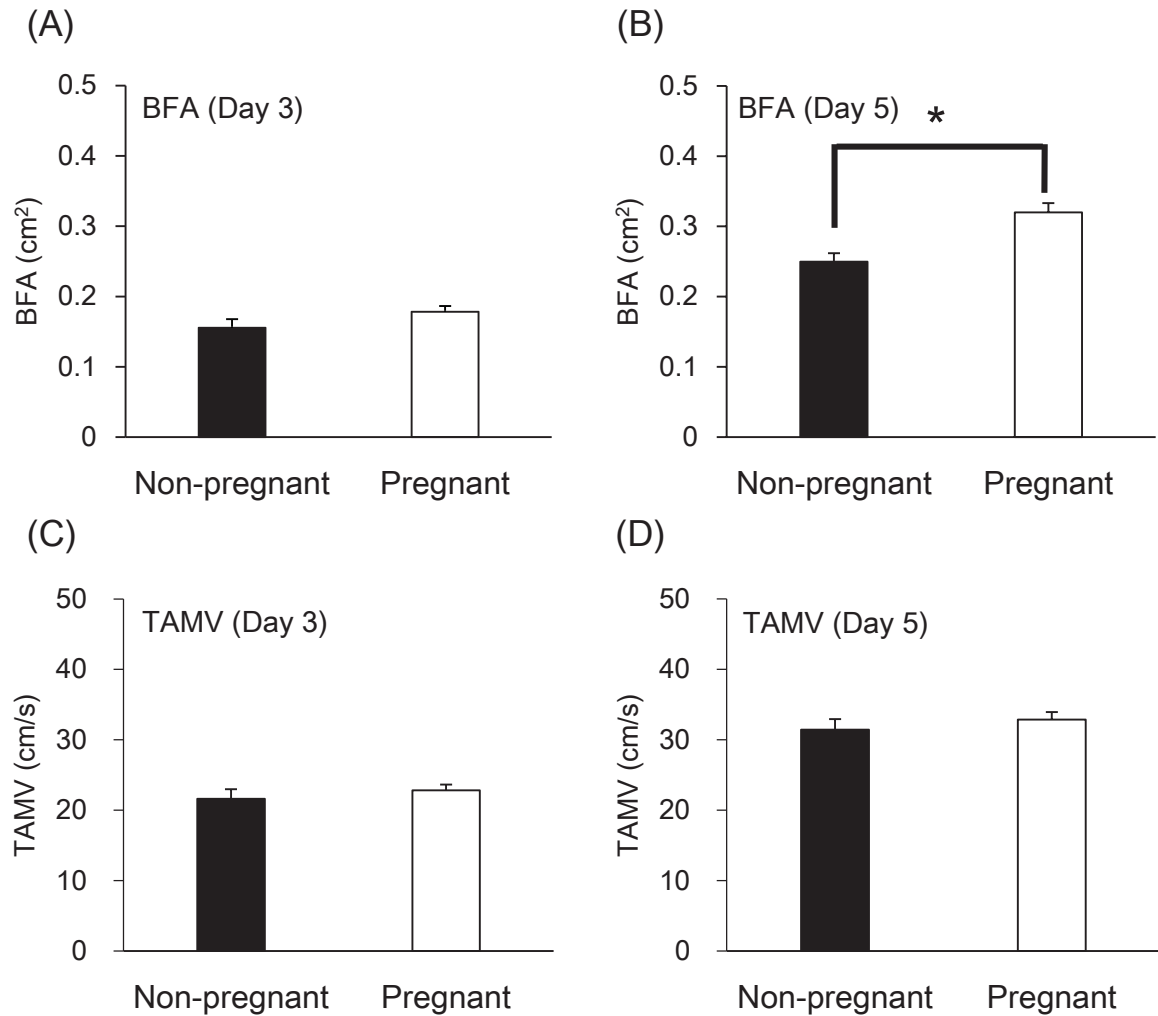


Fig. 3-4. Blood flow area (BFA) in the corpus luteum (A; Day 3, B; Day 5) and the time-averaged maximum velocity (TAMV) of the spiral artery (C; Day 3, D; Day 5) in the pregnant and non-pregnant groups. Black and white bars represent the non-pregnant group ( $n = 49$ ) and pregnant group ( $n = 71$ ), respectively. Data points represent the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) for each group. The BFA of the pregnant group was significantly higher than those of the non-pregnant group on Day 5. The TAMV did not differ among these groups.

\* Difference between the two groups ( $P < 0.05$ ) indicated.

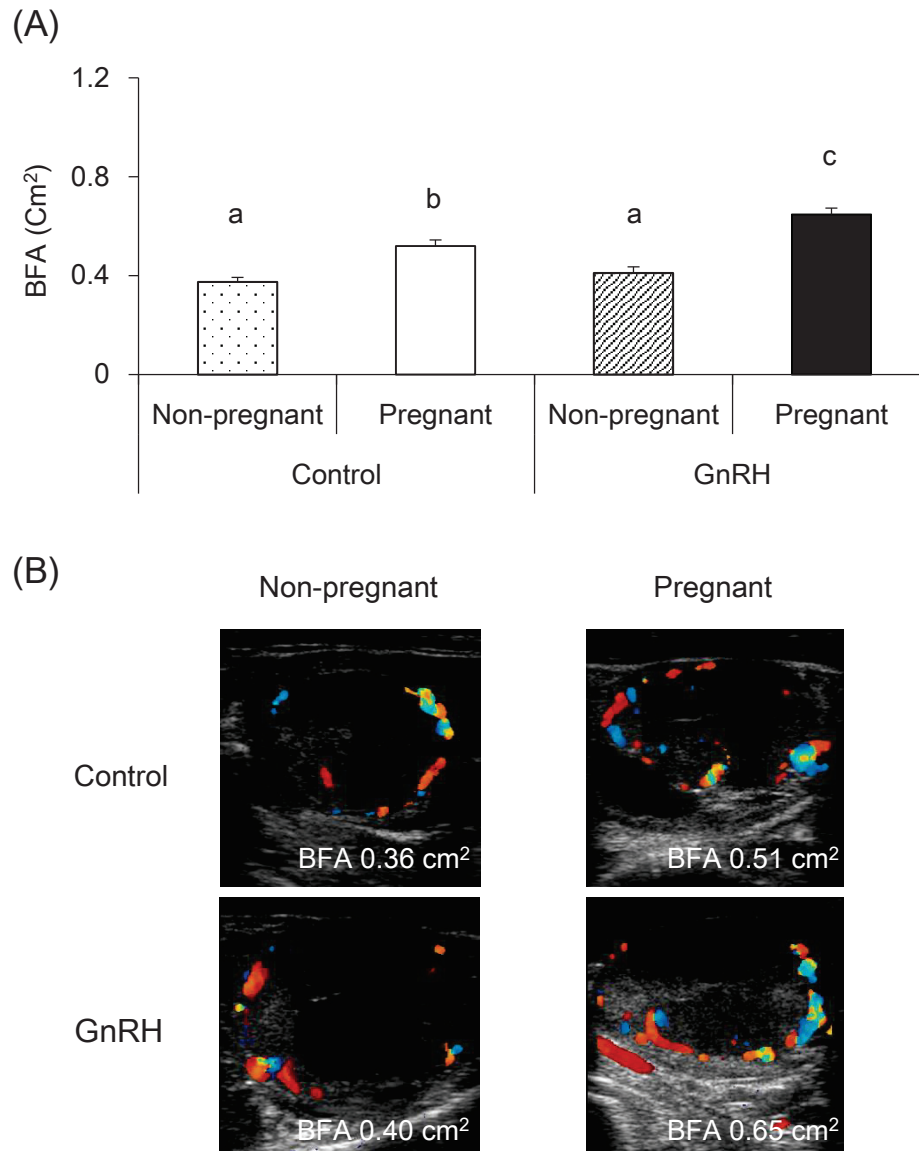


Fig. 3-5. The blood flow area (BFA) of the corpus luteum (CL) in the control (non-pregnant “dotted column” and pregnant “white column”) and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) (non-pregnant “slanted-line column” and pregnant “black column”) groups (A) and the representative image of each group on Day 7 (B). The BFAs summed the colored areas in the CL in the images, respectively (B). Data points show the mean  $\pm$  SEM for each group. Letters ( $P < 0.05$ ) indicate significant differences determined by t-tests with Bonferroni's multiple comparison correction.

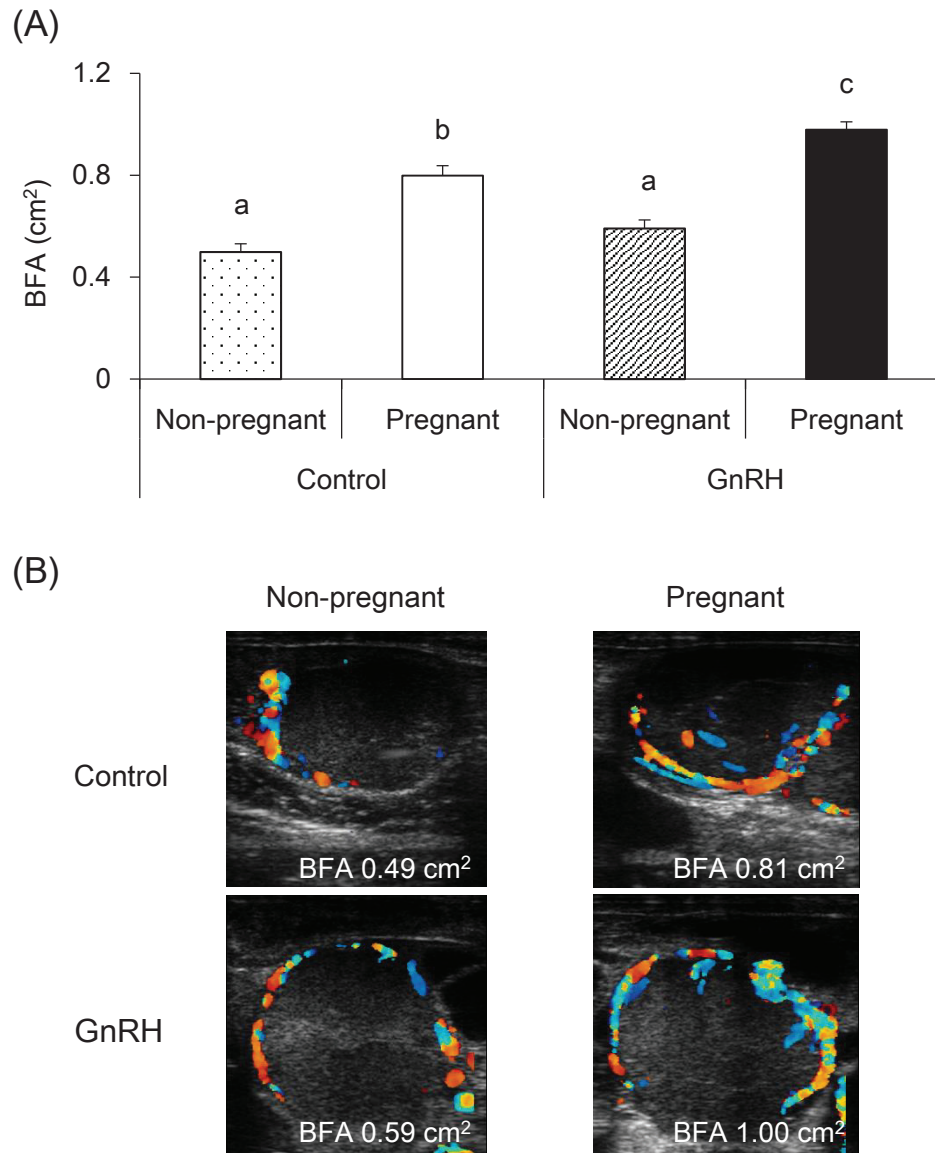


Fig. 3-6. The blood flow area (BFA) of the corpus luteum (CL) in the control (non-pregnant “dotted column” and pregnant “white column”) and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) (non-pregnant “slanted-line column” and pregnant “black column”) groups (A) and the representative image of each group on Day 14 (B). The BFAs summed the colored areas in the CL in the images, respectively (B). Data points show the mean  $\pm$  SEM for each group. Letters ( $P < 0.05$ ) indicate significant differences determined by t-tests with Bonferroni's multiple comparison correction.

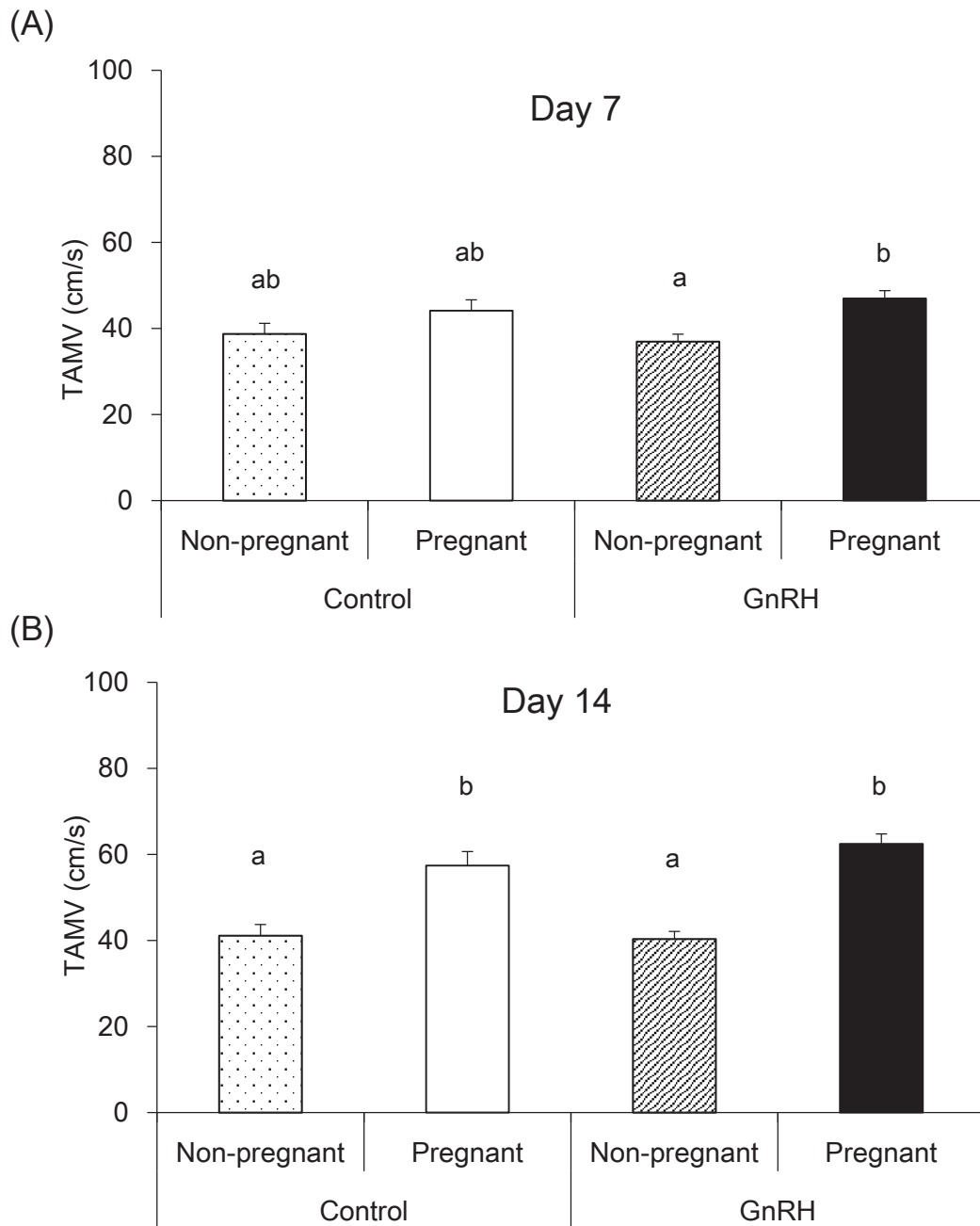


Fig. 3-7. The time-averaged maximum velocity (TAMV) of the spiral artery in the control (non-pregnant “dotted column” and pregnant “white column”) and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) (non-pregnant “slanted-line column” and pregnant “black column”) groups on Day 7 (A) and 14 (B). Data points show the mean  $\pm$  SEM for each group. Different letters ( $P < 0.05$ ) indicate significant differences determined by t-tests with Bonferroni's multiple comparison correction.

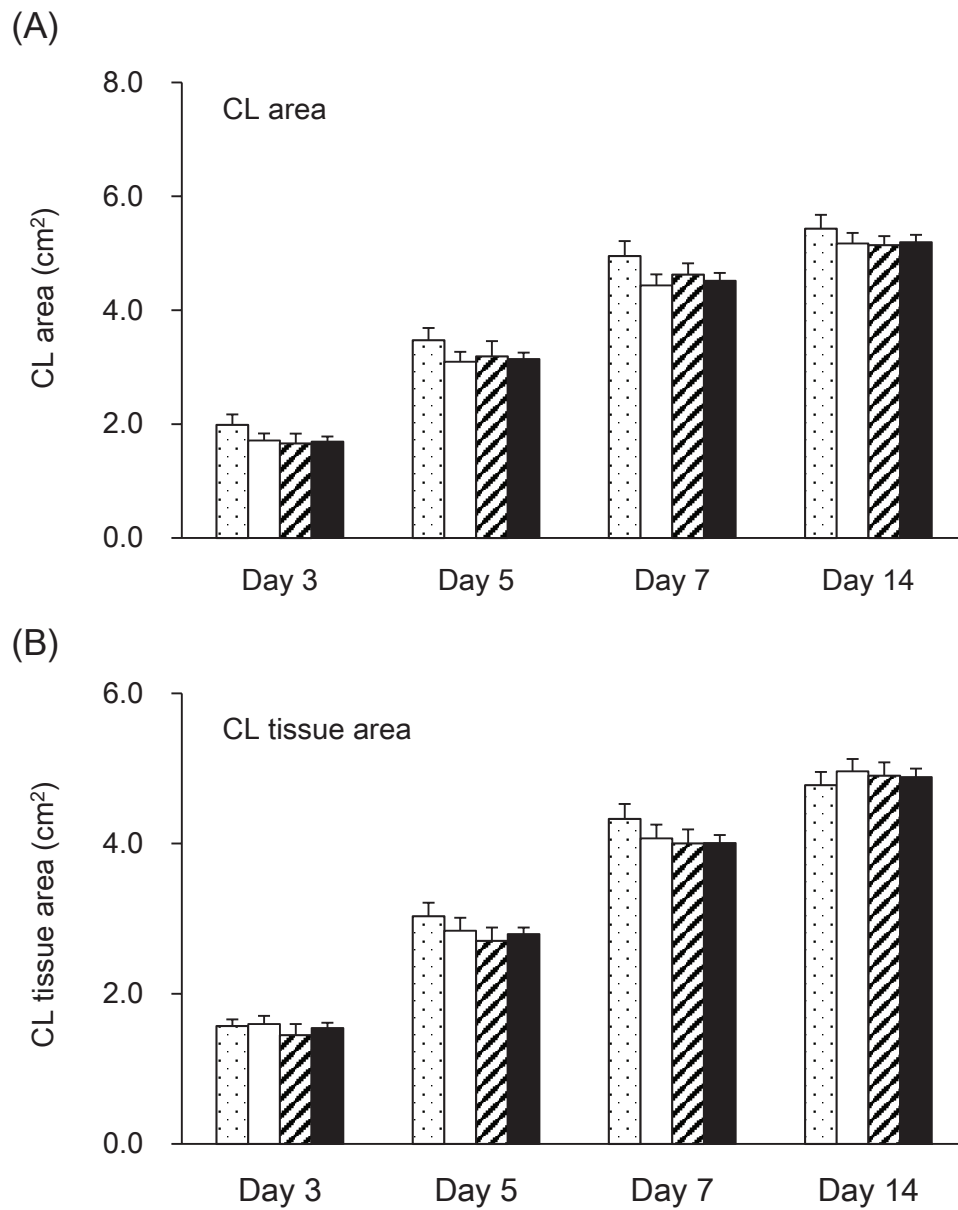


Fig. 3-8. Changes in the corpus luteum (CL) area (A) and CL tissue area (B) in the control (non-pregnant “dotted column” and pregnant “white column”) and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) (non-pregnant “slanted-line column” and pregnant “black column”) groups. Data points represent the mean  $\pm$  SEM for each day. The values of these trait did not differ among the four groups by *t*-tests with Bonferroni's multiple comparisons correction ( $P > 0.05$ ).

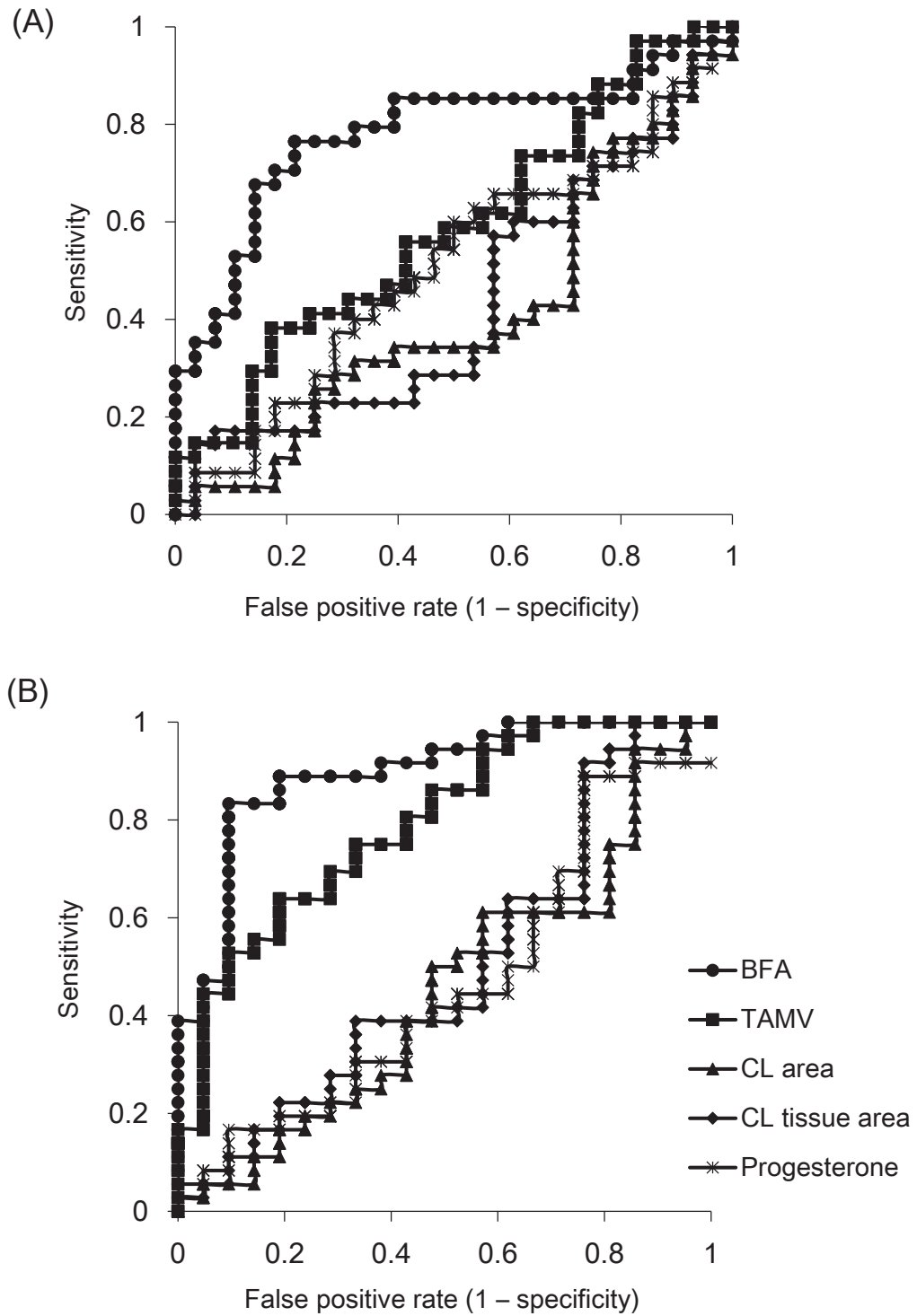


Fig. 3-9. Receiver Operating Characteristic (ROC) curves of the five predictors of pregnancy in the control (A) and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) (B) groups on Day 7. The horizontal and vertical axes are the false positive rate (1 - specificity) and sensitivity, respectively, and thus, the left upper corner is the ideal point of 100% sensitivity and 100% specificity. Abbreviations: BFA; blood flow area, TAMV; time-averaged maximum velocity, CL; corpus luteum.

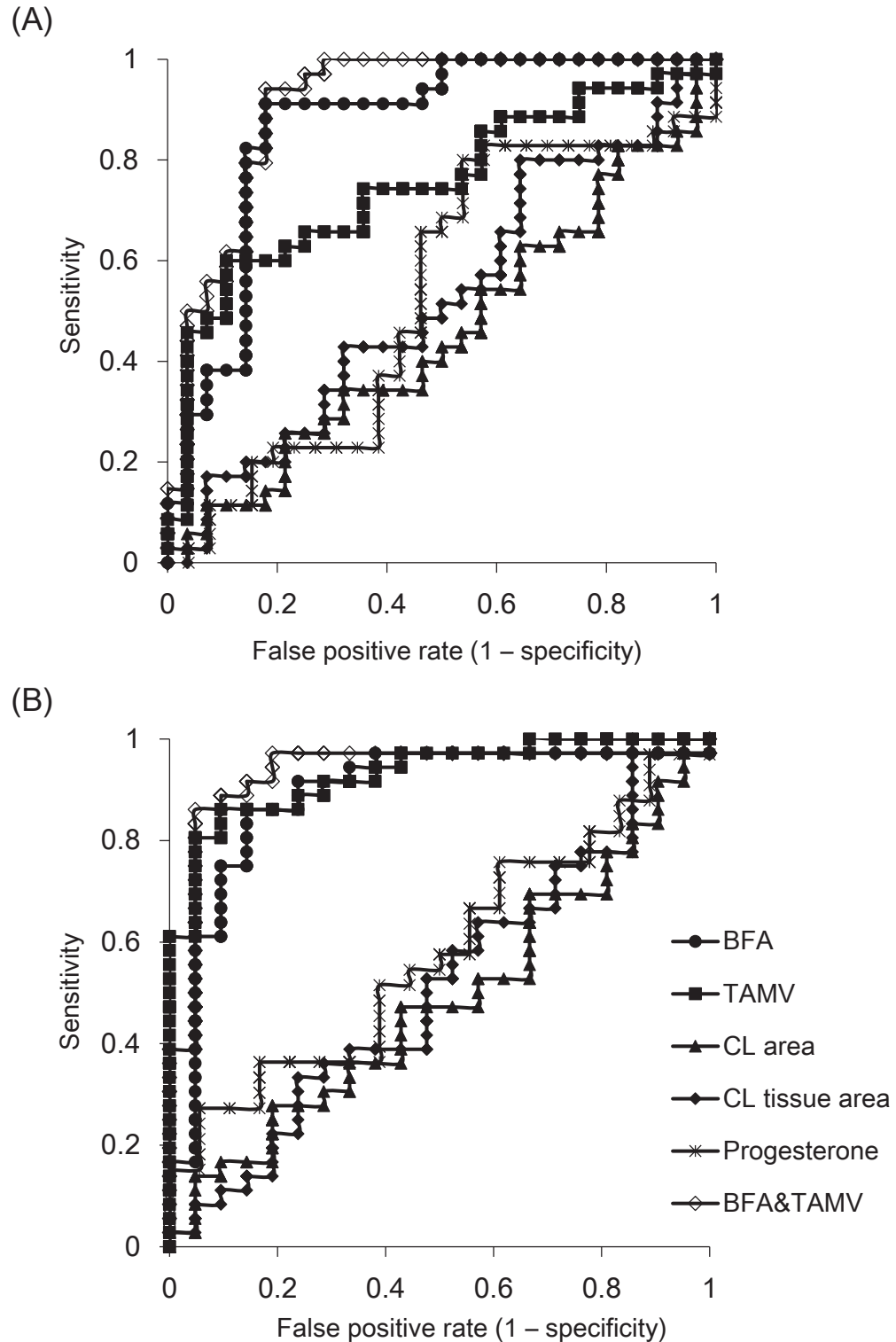


Fig. 3-10. Receiver Operating Characteristic (ROC) curves of the five predictors of pregnancy in the control (A) and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) (B) groups on Day 14. The horizontal and vertical axes are the false positive rate (1 - specificity) and sensitivity, respectively, and thus, the left upper corner is the ideal point of 100% sensitivity and 100% specificity. Abbreviations: BFA; blood flow area, TAMV; time-averaged maximum velocity, CL; corpus luteum.



Table 3-3. Summary of the ROC analyses of five independent variables in the GnRH group on Day 7.

	GnRH		
	Cutoff value	Sensitivity	Specificity
BFA (cm <sup>2</sup> )	0.52	0.833	0.905
TAMV (cm/s)	43.10	0.639	0.810
CL area (cm <sup>2</sup> )	4.45	0.500	0.524
CL tissue area (cm <sup>2</sup> )	4.19	0.389	0.667
P <sub>4</sub> concentrations (ng/ml)	1.60	0.438	0.667

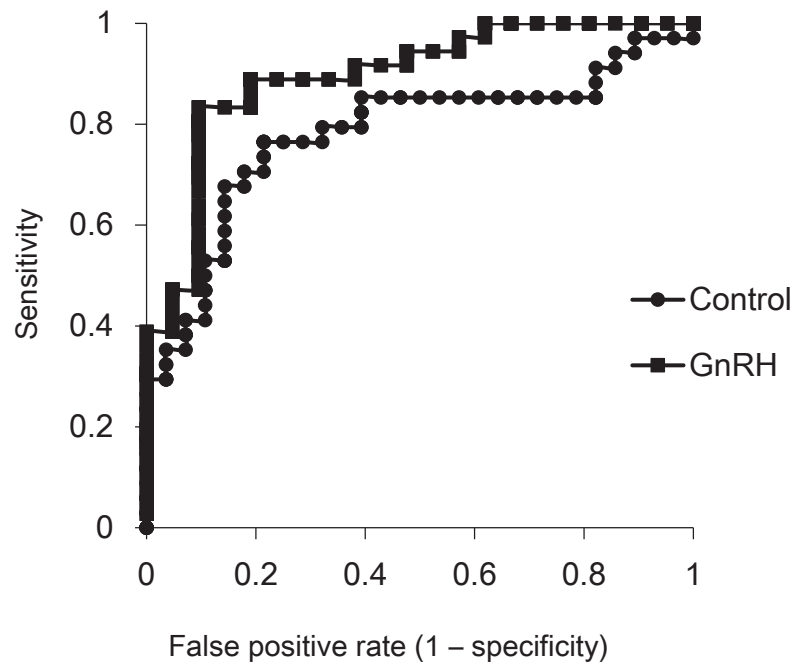
Abbreviations: ROC; Receiver Operating Characteristic, GnRH; Gonadotropin-releasing hormone, BFA; blood flow area, TAMV; time-averaged mean velocity, CL; corpus luteum, P<sub>4</sub>, progesterone.

Table 3-4. Summary of the ROC analyses of five independent variables in the GnRH group on Day 14.

	GnRH		
	Cutoff value	Sensitivity	Specificity
BFA (cm <sup>2</sup> )	0.77	0.861	0.857
TAMV (cm/s)	50.73	0.861	0.905
BFA and TAMV	0.583 <sup>a</sup>	0.971	1.000
CL area (cm <sup>2</sup> )	5.20	0.472	0.571
CL tissue area (cm <sup>2</sup> )	4.72	0.583	0.476
P <sub>4</sub> concentrations (ng/ml)	3.48	0.515	0.611

<sup>a</sup> The cutoff value at pregnancy probability 58.3% ; BFA 0.94 cm<sup>2</sup> and TAMV 44.93 cm/s. Abbreviations: ROC; Receiver Operating Characteristic, GnRH; Gonadotropin-releasing hormone, BFA; blood flow area, TAMV; time-averaged mean velocity, CL; corpus luteum, P<sub>4</sub>; progesterone.

(A) BFA (Day 7)



(B) BFA + TAMV (Day 14)

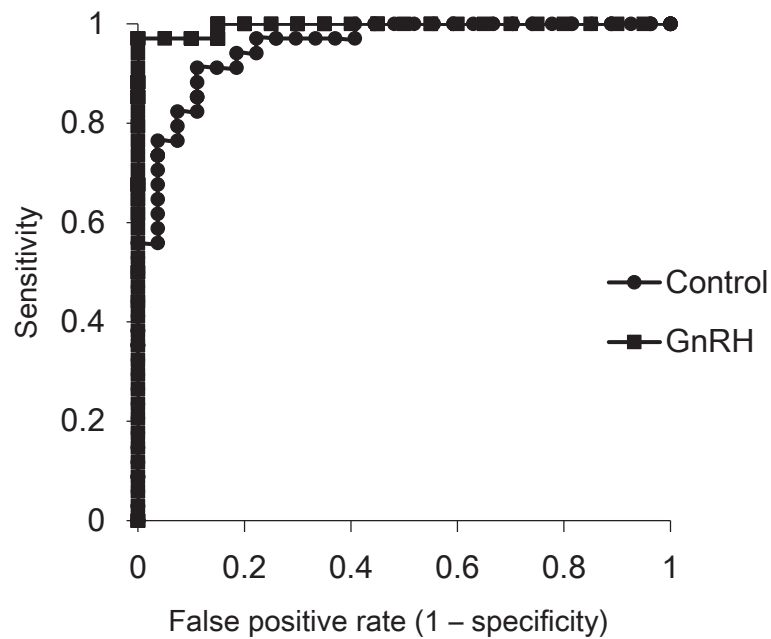


Fig. 3-11. Receiver Operating Characteristic (ROC) curves of the blood flow area (BFA) of the corpus luteum on Day 7 (A) and the paired BFA and TAMV of the spiral artery (B) on Day 14. The horizontal and vertical axes are the false positive rate (1 - specificity) and sensitivity, respectively, and thus, the left upper corner is the ideal point of 100% sensitivity and 100% specificity.

Table 3-5. Summary of the AUC analyses.

	AUC		P-value for unpaired DeLong test (one-sided)
	Control	GnRH	
ROC for BFA (Day 7)	0.807	0.891	$P = 0.126$
ROC for BFA and TAMV (Day 14)	0.938	0.996	$*P = 0.0273$

Abbreviations: AUC; Area Under Curve, ROC; Receiver Operating Characteristic, GnRH; Gonadotropin-releasing hormone, BFA; blood flow area, TAMV; time-averaged mean velocity.

\*  $P < 0.05$

## 第4章 総括

ウシの ET は、遺伝的改良、希少精液の有効利用および性判別胚の生産等を目的として行われている。日本においては黒毛和種子牛の販売価格の高騰、凍結胚の流通の活発化を背景として、採胚頭数、ET 頭数ともに年々増加している。しかし、その受胎率は向上しておらず、特に未経産牛に比較して経産牛では低い。このことが生産性の低下を招き、空胎期間延長に伴う過肥が周産期疾病の原因として問題となっている。また、ウシの妊娠の成立には黄体から産生される  $P_4$  が必要不可欠であり、現在、黄体サイズ（黄体直径、黄体面積および体積）が  $P_4$  産生能の指標として用いられている（4, 36, 65）。そのため、ET を行う際には、直腸検査または超音波画像診断装置により測定した黄体サイズに基づいて受胚牛の選定が行われている。しかし、受胎率の向上には至っておらず、その診断には限界があると考えられる。近年、超音波ドプラ法を用いて測定した黄体血流量が新しい黄体機能の評価方法として脚光を浴びている（30, 52）。しかしながら、ET 前後の黄体血流量の変化や受胎との関連性は明らかとなっていない。そこで、本研究では受胚牛、特にホルスタイン種経産牛における ET 前後の黄体血流動態の解析と受胎との関連性を検討するとともに、黄体血流量が妊娠予測つまり受胚牛選定と超早期妊娠診断に有用であるかを検討した。

第1章では、ET 前から ET 時の黄体血流動態の解析と ET 時の黄体血流量が受胚牛選定に有用であるかを検討した。試験1では、Day 3, 5 および 7 に、黄体面積、黄体組織面積、主席卵胞面積、血漿  $P_4$  濃度、BFA および TAMV を測定し、受胎群と不受胎群で比較を行った。その結果、受胎群では不受胎群に比較して Day 7 の BFA が有意に高値を示したが、他の項目では有意な差が認められなかった。黄体は様々な細胞で構成されているが、そのうち 52.3%を血管内皮細胞が占め 36.7%が

P<sub>4</sub> 産生細胞である小型、大型黄体細胞、10%が線維芽細胞や pericyte である (41, 59)。排卵後、黄体細胞とともに血管も急速に増殖し、黄体全体に網の目のように隙間なく分布する (11)。この血管が黄体機能維持のための血液運搬経路となり、また黄体細胞で産生、分泌された P<sub>4</sub> の輸送経路となる (11)。また、黄体が形成されている卵巣と同側の子宮角内の P<sub>4</sub> 濃度は対側の子宮角内に比較して高く (95, 96)、黄体側の子宮角で着床、妊娠しやすいことが報告されている。これらの報告から、卵巣と同側の子宮角には密接な局所循環が存在することが示唆されている。本研究では、受胎群と不受胎群では血漿 P<sub>4</sub> 濃度には差が認められず、Day 7 において受胎群の BFA が高値を示した。従って、BFA が高いつまり豊富な血管形成により P<sub>4</sub> の産生および分泌が増加し、局所循環経路を介して黄体側の子宮角内の P<sub>4</sub> 濃度が上昇することが推測された。そのため、子宮内が胚の発育と着床に適した環境になるのではないかと考えた。以前より、ET 前後の血漿 P<sub>4</sub> 濃度が高い牛は受胎性が高いという報告 (57, 64) と血漿 P<sub>4</sub> 濃度による影響は受けないという報告 (12, 28) がある。本研究においては受胎群と不受胎群で血漿 P<sub>4</sub> 濃度に差は認められず、ロジスティック回帰分析の結果から血漿 P<sub>4</sub> 濃度は受胎に影響を与えないということが明らかとなった。

また、ET 前日または当日の主席卵胞サイズが小さく血中 E<sub>2</sub> 濃度が低く E<sub>2</sub>/P<sub>4</sub> 比が低い牛は受胎性が高いと報告されている (57)。本研究では、受胎群と不受胎群で主席卵胞面積の推移に差が認められず、ロジスティック回帰分析の結果からも主席卵胞面積は受胎の成否に影響しないことが示された。発情後 6–7 日の主席卵胞の直径は 12.0–15.0 mm であり、それに伴い血中 E<sub>2</sub> 濃度も上昇する (5, 71)。これらのことから、機能的な黄体の存在下では主席卵胞面積が受胎を妨げる原因とはならず、従って主席卵胞面積は受胎牛の選定基準として有用ではないと考えられた。さらに、Day 7 においては従来から受胎牛の選定の基準となっていた黄体面積お

および血漿 P<sub>4</sub>濃度と比較して BFA が妊娠予測に有用であり、カットオフ値を 0.43cm<sup>2</sup> に設定することで高い感度と特異度を同時に得ることができた。従って、Day 7 の BFA の測定は、受胎牛の受胎性の評価つまり受胎牛選定に有用であると考えられた。試験 2 では、試験 1 で得られた BFA のカットオフ値に基づく受胎牛選定法の再現性を検証した。試験 1 と異なる 38 頭のホルスタイン種経産受胎牛を用いて、Day 7 の BFA を測定し BFA 0.43cm<sup>2</sup> 以上のウシを検査陽性群、0.43 cm<sup>2</sup> 未満のウシを検査陰性群とした。Day 30 の妊娠診断の結果、陽性的中率が 86.7 %、陰性的中率が 87.0 %、感度が 81.3 %および特異度は 90.9 %であった。このことから、Day 7 における BFA に基づく受胎牛選定法は再現性が高いことが示された。従って、カラー Doppler 法により ET 時に BFA を測定することは受胎牛の受胎性の評価や受胎牛の選定に有用であると示された。

第 2 章では、第 1 章の試験 1 と同一のウシを用い、ET の 7 日後である Day 14 に黄体面積、黄体組織面積、主席卵胞面積、血漿 P<sub>4</sub>濃度、BFA および TAMV を測定し、受胎群と不受胎群で比較を行った。同時に、Day 14 の黄体血流量が超早期妊娠診断に有用であるかを検討した。受胎群では不受胎群に比較して、Day 14 において BFA と TAMV が有意に高値を示したが、他の項目では差が認められなかった。また、ロジスティック回帰分析と ROC 解析の結果から、Day 14 において受胎に影響を与える因子は BFA と TAMV であり、BFA と TAMV の 2 因子を考慮した重回帰式による妊娠予測が最も優れていることが示された。これらのことから、ET 後の黄体の豊富な血管形成や高速な血流が受胎に強い影響を及ぼしているものと考えられた。妊娠の成立、維持には黄体の存続が必須であるが、反芻動物において黄体の維持には胚の存在が必要である。ウシにおいて妊娠認識物質として知られている IFN $\tau$  は、胚の栄養膜細胞から分泌され (25, 38, 48, 67, 81)、子宮内膜上皮上の E<sub>2</sub> 受容体やオキシトシン受容体の発現を抑制することで、子宮からの黄体退

行因子である  $\text{PGF}_2\alpha$  の分泌を抑制する (66, 88)。その産生は時期特異的で、後期桑実胚から産生されるが Day 14-15 から産生量が急増する (18, 19)。また、 $\text{P}_4$  と協調して子宮内膜や腺上皮細胞において胚の生存と発育に必要な遺伝子発現や免疫細胞を誘導する役割を担っている。本研究で認められた受胎群における豊富な血管形成は、Day 7 において血管形成の多い黄体がその後も安定して血管形成を増加したことが考えられる。その一方で、Day 14 は、 $\text{IFN}\tau$  産生量が急増する時期であることから、受胎群における豊富な血管形成と高速な血流は胚から産生された  $\text{IFN}\tau$  による影響である可能性もあると考えた。また、第 1 章と同様に受胎群では黄体の血管形成が豊富であり、局所循環経路を介した子宮角への  $\text{P}_4$  輸送が増加することで、子宮角内が胚の発育と着床に適した環境になるのではないかと考えた。さらに、母体の  $\text{P}_4$  濃度は胚の発育と胚からの  $\text{IFN}\tau$  産生に影響を与え、母体の  $\text{P}_4$  濃度が高いと  $\text{IFN}\tau$  の産生が増加し胚の発育に適した環境となることが示唆されている (37)。従って、子宮角内の  $\text{P}_4$  濃度が高いことで、 $\text{IFN}\tau$  産生が増加し、胚の発育と着床に適した環境となったと推測された。しかし、 $\text{IFN}\tau$  と黄体血流量との関連性は明らかになっていないため、今後研究を行っていく必要がある。

AI 後 20 および 21 日、または受胎牛の Day 19 における BFA に基づく妊娠診断が試みられ、早期妊娠診断の有用性が示唆されている (77, 89)。しかしながら、BFA 単独による妊娠診断の精度は低い (89) と報告されている。本研究では、ROC 解析の結果から、ロジスティック回帰式から予測される妊娠確率が 60% である BFA  $0.63 \text{ cm}^2$  かつ TAMV  $50.60 \text{ cm/s}$  をカットオフ値に設定すると最も高い感度と特異度を同時に得ることができた。そのため、Day 14 における超早期妊娠診断には BFA と TAMV を組み合わせる方法が最適であると判断した。以上のことから、Day 14 に BFA と TAMV を測定することが超早期妊娠診断に有用であることが明らかとなった。また、従来の方法より早期で尚且つ次回発情周期以前に妊娠診断を行う



ことで、不受胎であった場合には次回の発情発見率および AI 率または ET 率の向上に繋がるものと考えられた。

第 3 章では、Day 5 に GnRH 製剤を投与したウシと無処置のウシの ET 前から ET 後の黄体や卵胞の形態、血漿 P<sub>4</sub> 濃度および黄体血流量の推移を解析した。さらに、Day 5 における GnRH 製剤の投与が黄体血流量と妊娠予測の精度に及ぼす影響を検討した。GnRH 投与群は対照群に比較して、Day 7 および 14 の BFA が高値を示したが、TAMV では差が認められなかった。また、GnRH-受胎群では、対照群および GnRH-不受胎群に比較して Day 7 および Day 14 の BFA が高値を示した。Day 7 において、GnRH-受胎群の TAMV は GnRH-不受胎群に比較して有意に高い値を示した。また、Day 14 においては、GnRH 処置に関わらず、受胎群は不受胎群に比較して TAMV が有意に高い値を示した。GnRH は、視床下部で産生、分泌され、ウシの繁殖機能を制御する視床下部-脳下垂体-卵巣軸において重要な役割を果たしている (16)。GnRH は脳下垂体に作用し LH と FSH の産生と分泌を刺激し、これらが卵巣へと作用し卵胞発育、黄体形成を促進する (16)。黄体の血管形成は VEGFA や FGF2 といった血管新生因子によって制御されているが、FSH と LH がこれら血管新生因子の産生とレセプターの発現を増加させる (23, 39, 99) ことが示唆されている。従って、GnRH 製剤の投与により FSH および LH が上昇し、VEGFA と FGF2 の産生が増加したことで Day 7 および 14 の BFA が増加したのではないかと考えた。しかしながら、GnRH 製剤投与により BFA が増加した原因は本研究では明らかにできなかった。また、BFA の増加は血管数の増加または血管の拡張を反映していることが予測されるが、その解明には更なる研究を行う必要がある。

また、黄体面積、黄体組織面積および血漿 P<sub>4</sub> 濃度には差は認められなかった。しかし、主席卵胞面積は、Day 7 および 14 において GnRH 投与群が対照群に比較し

て有意に低値を示した。また、GnRH 投与群において、Day 14 の副黄体形成率は 96.5%であった。以前より、AI 後または ET 前に hCG または GnRH 製剤の投与により、受胎性を向上させる試みが行われてきた (31, 54, 58, 62, 63, 72, 73, 75, 91)。Day 5 の GnRH 製剤の投与により LH サージが誘起され、直径 10mm 以上の主席卵胞が排卵し副黄体が形成される。従って、本研究における主席卵胞面積の減少は、GnRH 製剤投与後に発生した LH サージにより、第 1 卵胞波の主席卵胞が排卵した結果であると考えた。AI 後または ET 前の GnRH 製剤の投与により副黄体が形成され、血中 P<sub>4</sub>濃度が上昇し受胎率が向上するという報告 (73) もあるが、向上しないという報告 (21) もある。本研究では、血漿 P<sub>4</sub>濃度、受胎率ともに上昇しなかったが、受胎率が劣るとされている直径 20 mm 未満のウシに対しては、他の報告同様に血漿 P<sub>4</sub>濃度、受胎率ともに向上する可能性があると考えた。

また、第 1 章、2 章と同様に、ROC 解析により妊娠予測因子の精度の比較を行った。GnRH 投与群においても、Day 14 では BFA と TAMV の 2 因子を考慮した重回帰式による妊娠予測が最も優れ、ロジスティック回帰式から予測される妊娠確率が 58.3%である BFA 0.94 cm<sup>2</sup> かつ TAMV 44.93 cm/s をカットオフ値に設定することで高い感度と特異度を同時に得ることができた。さらに、Day 14 の GnRH 投与群における BFA と TAMV の 2 因子を考慮した予測の AUC は、対照群に比較して有意に広いことが示された。これらのことから、GnRH 製剤の投与により、受胎群と不受胎群における BFA の差が明瞭となることで、Day 14 における超早期妊娠診断精度が有意に向上することが明らかとなった。以上のことから、Day 5 における GnRH 製剤の投与により Day 7 と 14 の BFA が増加し、Day 14 における BFA と TAMV に基づく超早期妊娠診断の精度が向上することが示された。従って、Day 5 に GnRH 製剤を投与後、ET を行い Day 14 に BFA と TAMV を評価することで、精度の高い超早期妊娠診断が可能となることが示された。

以上、第 1 章から第 3 章までに行った研究から、受胎牛の ET 前後の黄体血流量の推移、黄体血流量の妊娠予測への有用性および GnRH 製剤投与による黄体血流量と超早期妊娠診断精度への効果が明らかとなった。つまり、Day 7 に BFA を評価することが新たな受胎牛の選定基準となり、Day 14 に BFA と TAMV を評価することで超早期妊娠診断が可能となることが示された。また、ET 前に GnRH 製剤を投与することでその後の黄体血流量が増加し、超早期妊娠診断の精度が向上することが明らかとなった。

このように、本研究で明らかにした成果は、ET の受胎率の向上、貴重な胚の浪費の防止、超早期妊娠診断が可能となることから、生産性の向上および農家の経営安定化に寄与できるものと考えられる。

## 謝辞

本稿を終えるに臨み、御指導を賜りました岩手大学農学部共同獣医学科繁殖機能制御学研究室 高橋透教授に深謝いたします。また、本論文作成にあたり御校閲頂きました岩手大学 佐藤繁教授，東京農工大学 渡辺元教授，帯広畜産大学 松井基純教授，岐阜大学 村瀬哲磨教授に深謝いたします。

なにより、研究遂行にあたり、多大なる御協力、御助言を頂きました、東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻植物栄養生理学分野 石山敬貴先生，九州大学理学部生物科学専攻数理生物学研究室 関元秀先生に心よりの御礼を申し上げます。特に統計解析，論文作成に関してはひとかたならない御指導・御鞭撻を賜りました。本研究の遂行と本論文のとりまとめは，お二人無くしては成し得ず最大の感謝の意を申し上げます。本当に有難うございました。

そして，本研究始める契機を作って頂いた岩手大学農学部共同獣医学科繁殖機能制御学研究室前教授の居在家義昭博士に感謝の意を表します。

実験に際し貴重な牛を快く提供して頂いた荒関正夫氏に深謝いたします。

また，忙しいところ日々の業務に協力して頂いた宮城県農業共済組合の皆様，中央家畜診療センターの皆様，中央家畜診療センター元所長 沼津敬治先生に感謝いたします。

そして，研究に協力して下さった繁殖機能制御学研究室の大学院生，学部学生の皆様に感謝いたします。

最後に，今日に至るまでの長きにわたって支えていただいた両親に心から感謝の意を表します。

#### 参考文献

1. Acosta, T. J., Hayashi, K. G., Ohtani, M. and Miyamoto, A. (2003). Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*. 125, 759~767.
2. Acosta, T. J., Yoshizawa, N., Ohtani, M. and Miyamoto, A. (2002). Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F2 $\alpha$  injection in the cow. *Biol. Reprod.* 66, 651~658.
3. Al-Katanani, Y. M., Paula-Lopes, F. F. and Hansen, P. J. (2002). Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 85, 390~396.
4. Assey, R. J., Purwantara, B., Greve, T., Hyttel, P. and Schmidt, M. H. (1993). Corpus luteum size and plasma progesterone levels in cattle after cloprostenol-induced luteolysis. *Theriogenology*. 39, 1321~1330.
5. Badinga, L., Driancourt, M. A., Savio, J. D., Wolfenson, D., Drost, M., De la sota, R. L. and Thatcher, W. W. (1992). Endocrine and ovarian response associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 47, 871~883.
6. Bartol, F. F., Roberts, R. M., Bazer, F. W., Lewis, G. S., Godkin, J. D. and Thatcher, W. W. (1985). Characterization of proteins produced in vitro by periattachment bovine conceptuses. *Biol. Reprod.* 32, 681~693.
7. Baruselli, P. S., Ferreira, R. M., Sales, J. N., Gimenes, L. U., Sá Filho, M. F., Martins, C. M., Rodrigues, C. A. and Bó, G. A. (2011). Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology*. 76, 1583~1593.

8. Baruselli, P. S., Sá Filho, M. F., Martins, C. M., Nasser, L. F., Nogueira, M. F., Barros, C. M. and Bó, G. A. (2006). Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 65, 77~88.
9. Berg, D. K., van Leeuwen, J., Beaumont, S., Berg, M. and Pfeffer, P. L. (2010). Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. *Theriogenology*. 73, 250~260.
10. Bollwein, H., Maieri, J., Mayer, R. and Stolla, R. (1998). Transrectal color Doppler sonography of the A. uterina in cyclic mares. *Theriogenology*. 49, 1483~1488.
11. Carr, B. R., MacDonald, P. C. and Simpson, E. R. (1982). The role of lipoproteins in the regulation of progesterone secretion by the human corpus luteum. *Fertil. Steril.* 38, 303~311.
12. Chagas e Silva, J., Lopes da Costa, L. and Silva, J. R. (2002). Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology*. 58, 51~59.
13. DeLong, E. R., DeLong, D. M. and Clarke-Pearson, D. L. (1988). Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*. 44, 837~845.
14. Diskin, M. G. and Morris, D. G. (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod. Domest. Anim. Suppl* 2, 260~267.
15. Diskin, M. G., Parr, M. H. and Morris, D. G. (2011). Embryo death in cattle: an update. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 244~251.
16. D'Occhio, M. J., Fordyce, G., Whyte, T. R., Aspden, W. J. and Trigg, T. E. (2000). Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. *Anim. Reprod.*

Sci. 60-61, 433~442.

17. Ealy, A. D., Drost and M., Hansen, P. J. (1993). Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. J. Dairy Sci. 76, 2899~2905.
18. Ealy, A. D., Larson, S. F., Liu, L., Alexenko, A. P., Winkelman, G. L., Kubisch, H. M., Bixby, J. A. and Roberts, R. M. (2001). Polymorphic forms of expressed bovine interferon-tau genes: relative transcript abundance during early placental development, promoter sequences of genes and biological activity of protein products. Endocrinology. 142, 2906~2915.
19. Ealy, A. D. and Yang, Q. E. (2009). Control of interferon-tau expression during early pregnancy in ruminants. Am. J. Reprod. Immunol. 61, 95~106.
20. Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T. and Webster, G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. J. Dairy Sci. 72, 68~78.
21. Ellington, J. E., Foote, R. H., Farrell, P. B., Hasler, J. F., Webb, J., Henderson, W. B. and McGrath, A. B. (1991). Pregnancy rates after the use of a gonadotropin releasing hormone agonist in bovine embryo transfer recipients. Theriogenology. 36, 1035~1042.
22. Farin, C. E., Imakawa, K., Hansen, T. R., McDonnell, J. J., Murphy, C. N., Farin, P. W., Roberts, R. M. (1990). Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. Biol. Reprod. 43, 210~218.
23. Fátima, L. A., Evangelista, M. C., Silva, R. S., Cardoso, A. P., Baruselli, P. S. and Papa, P. C. (2013). FSH up-regulates angiogenic factors in luteal cells of buffaloes. Domest. Anim. Endocrinol. 45, 224~237.

24. Forde, N., Beltman, M. E., Duffy, G. B., Duffy, P., Mehta, J. P., O'Gaora, P., Roche, J. F., Lonergan, P. and Crowe, M. A. (2011). Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: Effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biol. Reprod.* 84, 266~278.
25. Godkin, J. D., Bazer, F. W., Moffatt, J., Sessions, F. and Roberts, R. M. (1982). Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at day 13-21. *J. Reprod. Fertil.* 65, 141~150.
26. Hanzen, C. and Delsaux, B. (1987). Use of transrectal B-mode ultrasound imaging in bovine pregnancy diagnosis. *Vet. Rec.* 121, 200~202.
27. Hasler, J. F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rate in cattle. (2001). *Theriogenology.* 56, 1401~1415.
28. Hasler, J. F., Bowen, R. A., Nelson, L. D. and Seidel, G. E. Jr. (1980). Serum progesterone concentrations in cows receiving embryo transfers. *J. Reprod. Fertil.* 58, 71~77.
29. Hernandez-Ledezma, J. J., Sikes, J. D., Murphy, C. N., Watson, A. J., Schultz, G. A. and Roberts, R. M. (1992). Expression of bovine trophoblast interferon in conceptuses derived by in vitro techniques. *Biol. Reprod.* 47, 374~380.
30. Herzog, K., Brockhan-Lüdemann, M., Kaske, M., Beindorff, N., Paul, V., Niemann, H. and Bollwein, H. (2010). Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology.* 73, 691~697.
31. Howard, J. M., Manzo, R., Dalton, J. C., Frago, F. and Ahmadzadeh, A. (2006).



- Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 95, 224~233.
32. Ichaisri, C., Jorritsma, R., Vos, P. L., van. der. Weijden, G. C. and Hogeveen, H. (2011). Analysis of the economically optimal voluntary waiting period for first insemination. *J. Dairy Sci.* 94, 3811~3823.
33. Imakawa, K., Anthony, R. V., Kazemi, M., Marotti, K. R., Polites, H. G. and Roberts, R. M. (1987). Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. *Nature.* 330, 377~379.
34. 居在家義昭. (2012). 人工授精. 中尾敏彦, 津曲茂久, 片桐成二 編. 獣医繁殖学, 第4版 pp. 213~224. 文永堂出版, 東京.
35. Karten, M. J. and Rivier, J. E. (1986). Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies towards the development of agonists and antagonists: rationale and perspectives. *Endocr. Rev.* 7, 44~66.
36. Kastelic, J. P., Bergfelt, D. R. and Ginther, O. J. (1990). Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology.* 33, 1269~1278.
37. Kerbier, T. L., Buhr, M. M., Jordan, L. T., Leslie, K. E. and Walton, J. S. (1997). Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology.* 47, 703~714.
38. Kubisch, H. M., Larson, M. A. and Roberts, R. M. (1998). Relationship between age of blastocyst formation and interferon-tau secretion by in vitro-derived bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 49, 254~260.

39. Laitinen, M., Ristimäki, A., Honkasalo, M., Narko, K., Paavonen, K. and Ritvos, O. (1997). Differential hormonal regulation of vascular endothelial growth factors VEGF, VEGF-B, and VEGF-C messenger ribonucleic acid levels in cultured human granulosa-luteal cells. *Endocrinology*. 138, 4748~4756.
40. Lamond, D. R. and Drost, M. (1974). Blood supply to the bovine ovary. *J. Anim. Sci.* 38, 106~112.
41. Lei, Z. M., Chegini, N. and Rao, C. V. (1991). Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states. *Biol. Reprod.* 44, 1148~1156.
42. López-Gatius, F. (2003). Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology*. 60, 89~99.
43. Lopez, H., Satter, L. D. and Wiltbank, M. C. (2004). Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 81, 209~223.
44. Lucy, M. C. (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J. Dairy Sci.* 84, 1277~1293.
45. Mann, G. E. and Lamming, G. E. (1999). The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 34, 269~274.
46. Mann, G. E. and Lamming, G. E. (2001). Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*. 121, 175~180.
47. Mann, G. E., Lamming, G. E. and Fray, M. D. (1995). Plasma oestradiol and progesterone during early pregnancy in the cow and the effects of treatment

- with buserelin. Anim. Reprod. Sci. 37, 121~131.
48. Martal, J., Lacroix, M. C., Loudes, C., Saunier, M. and Wintenberger-Torrès, S. (1979). Trophoblastin, an antiluteolytic protein present in early pregnancy in sheep. J. Reprod. Fertil. 56, 63~73.
49. Matsui, M and Miyamoto, A. (2009). Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: Practical use for reproductive management in the cow. Vet. J. 181, 232~240.
50. McDougall, S. and Rhodes, F. M. (1999). Detection of a corpus luteum in apparently anoestrous cows by manual palpation, transrectal ultrasonography and plasma progesterone concentration. N Z Vet. J. 47, 47~52.
51. Miura R, Haneda S, Kayano M, Matsui M. (2015). Short communication: Development of the first follicular wave dominant follicle on the ovary ipsilateral to the corpus luteum is associated with decreased conception rate in dairy cattle. J. Dairy Sci. 98, 318~321.
52. Miyazaki, T., Tanaka, M., Miyakoshi, K., Minegishi, K., Kasai, K. and Yoshimura, Y. (1998). Power and colour Doppler ultrasonography for the evaluation of the vasculature of the human corpus luteum. Hum. Reprod. 13, 2836~2841.
53. Moor, R. M. and Rowson, L. E. A. (1964). Influence of the embryo and uterus on luteal function in the sheep. Nature. 201, 522~523.
54. Morgan, W. F. and Lean, I. J. (1993). Gonadotrophin-releasing hormone treatment in cattle: a meta-analysis of the effects on conception at the time of insemination. Aust. Vet. J. 70, 205~209.

55. Morris, D. and Diskin, M. (2008). Effect of progesterone on embryo survival. *Animal*. 2, 1112~1119.
56. Murakami, T. and Adachi, Y. (1994). The adaptability as recipients for ET in cows with the coexistences of corpus luteum and follicle, and cystic corpus luteum. *J. Reprod. Dev.* 40, 81~86.
57. Nishigai, M., Kamomae, H., Tanaka, T. and Kaneda, Y. (2000). The relationship of blood progesterone and estrogen concentrations on the day before and the day of frozen-thawed embryo transfer to pregnancy rate in Japanese black beef cattle. *J. Reprod. Dev.* 46, 235~243.
58. Nishigai, M., Kamomae, H., Tanaka, T. and Kaneda, Y. (2002). Improvement of pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos. *Theriogenology*. 58, 1597~1606.
59. O' Shea, J. D., Rodgers, R. J. and D' Occhio, M. J. (1989). Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. *J. Reprod. Fertil.* 85, 483~487.
60. Parr, M. H., Mullen, M. P., Crowe, M. A., Roche, J. F., Lonergan, P., Evans, A. C. O. and Diskin, M. G. (2012). Relationship between pregnancy per artificial insemination and early luteal concentrations of progesterone and establishment of repeatability estimates for these traits in Holstein-Friesian heifers. *J. Dairy. Sci.* 95, 2390~2396.
61. Perkins, N. J. and Schisterman, E. F. (2006). The inconsistency of "optimal" cut-points using two ROC based criteria. *Am. J. Epidemiol.* 163, 670~675.
62. Peters, A. R., Martinez, T. A. and Cook, A. J. (2000). A meta-analysis of

- studies of the effect of GnRH 11-14 days after insemination on pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*. 54, 1317~1326.
63. Price, C. A. and Webb, R. (1989). Ovarian response to hCG treatment during the oestrous cycle in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 86, 303~308.
  64. Remsen, L. G., Roussel, J. D. and Karihaloo, A. K. (1982). Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. *Theriogenology*. 18, 365-372.
  65. Ribadu, A. Y., Ward, W. R. and Dobson, H. (1994). Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. *Vet. Rec.* 35, 452~457.
  66. Roberts, R. M. (1996). Interferon-tau and pregnancy. *J. interferon Cytokine Res.* 16, 271~273.
  67. Roberts, R. M., Cross, J. C. and Leaman, D. W. (1992). Interferons as hormones of pregnancy. *Endocr. Rev.* 13, 432~452.
  68. Robin, X., Turck, N., Hainard, A., Tiberti, N., Lisacek, F., Sanchez, J. C. and Müller, M. (2011). pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*. 12, 77.
  69. Sartori, R., Fricke, P. M., Ferreira, J. C., Ginther, O. J. and Wiltbank, M. C. (2001). Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol. Reprod.* 65, 1403~1409.
  70. Sartori, R., Sartor-Bergfelt, R., Mertens, S. A., Guenther, J. N., Parrish, J. J. and Wiltbank, M. C. (2002). Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.* 85, 2803~2812.

71. Savio, J. D., Keenan, L., Boland, M. P. and Roche, J. F. (1988). Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 83, 663~671.
72. Schmitt, E. J., Barros, C. M., Fields, P. A., Fields, M. J., Diaz, T., Kluge, J. M. and Thatcher, W. W. (1996). A cellular and endocrine characterization of the original and induced corpus luteum after administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin on day five of the estrus cycle. *J. Anim. Sci.* 74, 1915~1929.
73. Schmitt, E. J., Diaz, T., Barros, C. M., de la Sota, R. L., Drost, M., Fredriksson, E. W., Staples, C. R., Thorner, R. and Thatcher, W. W. (1996). Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. *J. Anim. Sci.* 74, 1074~1083.
74. Shirasuna, K., Nitta, A., Sineenard, J., Shimizu, T., Bollwein, H. and Miyamoto, A. (2012). Vascular and immune regulation of corpus luteum development, maintenance, and regression in the cow. *Domest. Anim. Endocrinol.* 43, 198~211.
75. Sianangama, P. C. and Rajamahendran, R. (1992). Effect of human chorionic gonadotropin administered at specific times following breeding on milk progesterone and pregnancy in cows. *Theriogenology.* 38, 85~96.
76. Singh, J., Adams, G. P. and Pierson, R. A. (2003). Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 371~399.
77. Siqueira, L. G. B., Areas, V. S., Ghetti, A. M., Fonseca, J. F., Palhao, M. P., Fernandes, C. A. C. and Viana, J. H. M. (2013). Color Doppler flow imaging

- for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. *J. Dairy. Sci.* 96, 6461~6472.
78. Sirois, J. and Fortune, J. E. (1988). Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers monitored by real - time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39, 308~317.
  79. Smith, A. K., Broadbent, P. J., Dolman, D. F., Grimmer, S. P., Davies, D. A. and Dobson, H. (1996). Norgestomet implants, plasma progesterone concentrations and embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Vet. Rec.* 139, 187~191.
  80. Spell, A. R., Beal, W. E., Corah, L. R. and Lamb, G. C. (2001). Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology.* 56, 287~297.
  81. Spencer, T. E., Burghardt, R. C., Johnson, G. A. and Bazer, F. W. (2004). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 537~550.
  82. Sreenan, J. M. and Diskin, M. G. (1987). Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow. *Theriogenology.* 27, 99~113.
  83. Sterry, R. A., Welle, M. L. and Fricke, P. M. (2006). Treatment with gonadotropin-releasing hormone after first timed artificial insemination improves fertility in noncycling lactating dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 89, 4237~4245.
  84. Sunagawa, M., Kasahara, T. and Tsunoda, R. (1987). Morphological investigation of corpus luteum and plasma progesterone levels in bovine recipients. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 33, 206~208.

85. 高橋芳幸. (2012). 胚移植. 中尾敏彦, 津曲茂久, 片桐成二 編. 獣医繁殖学, 第4版 pp. 236~248. 文永堂出版, 東京.
86. Takahashi, M., Sawada, K., Kawate, N., Inaba, T. and Tamada, H. (2013). Improvement of superovulatory response and pregnancy rate after transfer of embryos recovered from Japanese Black cows fed rumen bypass polyunsaturated fatty acids. *J. Vet. Med. Sci.* 75, 1485~1490.
87. Taverne, M. A., Szenci, O., Szétag, J. and Piros, A. (1985). Pregnancy diagnosis in cows with linear-array real-time ultrasound scanning: a preliminary note. *Vet. Q.* 7, 264~270.
88. 津曲茂久. (2012). 妊娠と分娩. 中尾敏彦, 津曲茂久, 片桐成二 編. 獣医繁殖学, 第4版 pp. 163~212. 文永堂出版, 東京
89. Utt, M. D., Johnson III, G. L. and Beal, W. E. (2009). The evaluation of corpus luteum blood flow using color-flow Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients. *Theriogenology*. 71, 707~715.
90. Vaillancourt, D., Bierschwal, C. J., Ogwu, D., Elmore, R. G., Martin, C. E., Sharp, A. J. and Youngquist, R. S. (1979). Correlation between pregnancy diagnosis by membrane slip and embryonic mortality. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 175, 466~468.
91. Vasconcelos, J. L., Sá Filho, O. G., Justolin, P. L., Morelli, P., Aragon, F. L., Veras, M. B. and Soriano, S. (2011). Effects of postbreeding gonadotropin treatments on conception rates of lactating dairy cows subjected to timed artificial insemination or embryo transfer in a tropical environment. *J. Dairy Sci.* 94, 223~234.
92. Vasconcelos, J. L., Sangsritavong, S., Tsai, S. J. and Wiltbank, M. C. (2003).



- Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology*. 60, 795~807.
93. Wathes, D. C., Fenwick, M., Cheng, Z., Bourne, N., Llewellyn, S., Morris, D. G., Kenny, D., Murphy, J. and Fitzpatrick, R. (2007). Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cows. *Theriogenology*. 68, S232~S241.
  94. Webb, R., Gong, J. G., Law, A. S. and Rusbridge, S. M. (1992). Control of ovarian function in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 45, 141~156.
  95. Weems, C. W., Lee, C. N., Weems, Y. S. and Vincent, D. L. (1988). Distribution of progesterone to the uterus and associated vasculature of cattle. *Endocrinol. Japan*. 35, 625~630.
  96. Wijayagunawardane, M. P., Cerbito, W. A., Miyamoto, A., Acosta, T. J., Takagi, M., Miyazawa, K. and Sato, K. (1996). Oviductal progesterone concentration and its spatial distribution in cyclic and early pregnant cows. *Theriogenology*. 46, 1149~1158.
  97. Wiltbank, M. C., Dysko, R. C., Gallagher, K. P. and Keyes, P. L. (1988). Relationship between blood flow and steroidogenesis in the rabbit corpus luteum. *J. Reprod. Fertil.* 84, 513~520.
  98. Wiltbank, M. C., Lopez, H., Sartori, R., Sangsritavong, S. and Gümen, A. (2006). Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*. 65, 17~29.
  99. Wulff, C., Wilson, H., Largue, P., Duncan, W. C., Armstrong, D. G. and Fraser, H. M. (2000). Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie-2, and vascular endothelial growth factor

messenger ribonucleic acid. J. Clin. Endocrinol. Metab. 85, 4302~4309.

100. Yamada, O., Abe, M., Takehana, K., Iwasa, K., Hiraga, T. and Hiratsuka, T. (1995). Microvascular changes in the bovine corpus luteum during pregnancy. J. Vet. Med. Sci. 57, 75~79.