

氏名（本（国）籍）	金 澤 朋 美（岩手県）
主指導教員氏名	岩手大学 教授 高 橋 透
学 位 の 種 類	博士（獣医学）
学 位 記 番 号	獣医博甲第485号
学位授与年月日	平成29年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岩手大学
学 位 論 文 題 目	乳牛の黄体血流量に基づく新規受胚牛選定法と超早期 妊娠診断法に関する研究
審 査 委 員	主査 岩 手 大 学 教 授 佐 藤 繁 副査 帯広畜産大学 教 授 松 井 基 純 副査 岩 手 大 学 教 授 高 橋 透 副査 東京農工大学 教 授 渡 辺 元 副査 岐 阜 大 学 教 授 村 瀬 哲 磨

学位論文の内容の要旨

ウシの胚移植（ET）は、採胚頭数・移植頭数ともに年々増加しているが、その受胎率は向上しておらず、解決すべき課題となっている。臨床現場においてETを行う際には、直腸検査または超音波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を行っているが、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。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性との関連性を検討するとともに、黄体血流評価が妊娠予測に有用であるかを検討した。

第1章では、ET前とET時の黄体血流動態の解析と移植時の黄体血流量が妊娠予測に有用であるかを検討した。その結果、受胎群では不受胎群に比較してDay 7の黄体血流面積（BFA）が有意に高値を示したが、血漿中プロジェステロン（ P_4 ）濃度は受胎牛と不受胎牛の間に差が認められなかった。また、ロジスティック回帰分析の結果から、血漿 P_4 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。

さらに、Day 7においては従来から受胚牛の選定の基準となっていた黄体面積および血漿 P_4 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^2 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。

次いで、得られたBFAのカットオフ値に基づく妊娠予測方法の再現性を検証した。上記

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^2 以上を検査陽性群 ($n = 15$)、 0.43cm^2 未満の検査陰性群 ($n = 23$) とした。Day 30 の妊娠診断の結果、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。従って、カラードプラ法により 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別に有用であると考えられた。

第 2 章では、第 1 章試験 1 と同一個体を用い、ET 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_4 濃度、BFA および時間平均最大血流速度 (TAMV) を測定し、ET 後の黄体血流量が妊娠予測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。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 0.63cm^2 かつ TAMV 50.6cm/s をカットオフ値に設定すると最も高い感度 (85.3%) と特異度 (91.7%) を同時に得ることができた。

第 3 章では、Day 5 に性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 製剤を投与した牛と非投与牛の ET 前から ET 後の黄体や卵胞の形態、血漿 P_4 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、受胎性および妊娠予測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、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。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 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、BFA のカットオフ値を 0.52cm^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。これらのことから、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 に基づく妊娠予測の精度が向上することが示された。従って、GnRH 投与後、ET を行い Day 14 に黄体血流量を評価することで、従来よりも早期に妊娠診断が可能となることが示唆された。

以上より、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への効果が明らかとなった。つまり、ET 前の黄体血流量を評価することが新たな受胎牛の選定基準となり、ET 後に黄体血流量を評価することが超早期妊娠診断に有効であると考えられた。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。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は牛の胚移植の成績改善を目的として、超音波ドプラ法による黄体血流評価に基づく新たな受胎牛選定法と超早期妊娠診断法の開発及び評価を行ったものである。胚移植は乳牛及び肉牛の改良増殖の手法として活用され、採胚及び移植の頭数は年々増加しているものの、移植後の受胎率は向上がみられていない。従来、良好な受胎率を得るためには受胎牛の選定が重要とされ、移植時の黄体サイズや血中プロゲステロン濃度による受胎牛選定が行われているが、受胎牛と不受胎牛の間に黄体サイズやプロゲステロン濃度に

差が認められなかったとする報告も多い。そこで本研究では、黄体の局所血流を評価する手法として超音波ドプラ法を用い、黄体血流と受胎性との関連や妊娠予測の精度について検討した。

第1章の試験1では58頭のホルスタイン種経産牛を用いて胚移植前後の黄体血流動態の解析を行い、黄体血流データによる妊娠予測が可能かどうか検討した。その結果、受胎群（34頭）では胚移植日（発情日をDay 0としたDay 7）の黄体血流面積が不受胎群（24頭）よりも有意に高い値であった。その一方で、黄体面積、黄体組織面積、主席卵胞面積、血漿プロゲステロン濃度、平均血流速度は、群間に差が認められなかった。この成績から、高い受胎率を得るための受胎牛選定指標としては、従来から行われてきた黄体サイズや血中プロゲステロン濃度よりも、黄体血流面積が有効であることが明らかになり、妊娠予測の指標としては、黄体血流面積のカットオフ値を 0.43 cm^2 に設定すると高い感度(79.4%)と特異度(75.0%)が得られることがわかった。

次いで試験2では、試験1とは別に38頭のホルスタイン種経産牛を供試してDay 7の黄体血流面積を測定して血流面積 0.43 cm^2 以上を検査陽性群（15頭）とし、それ以外を検査陰性群（23頭）とした。この検査結果をDay30のBモード超音波検査による妊娠診断結果と比較検証したところ、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）の成績を得た。第1章の研究成績から、超音波ドプラ法によるDay7の黄体血流面積測定は、受胎牛の選定や受胎性予測に有用であると結論された。

第2章では第1章の試験1と同じ供試牛を用いて、胚移植の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、血漿プロゲステロン濃度、黄体血流面積および血流速度を測定し、受胎群（34頭）と不受胎群（24頭）間の比較を行った。その結果、受胎群では黄体血流面積と血流速度が不受胎群よりも有意に高い値を示したが、その他の項目には群間の差は認められなかった。この成績から、黄体血流面積と血流速度のカットオフ値をそれぞれ 0.63 cm^2 および 50.6 cm/s に設定すると、高い感度(85.3%)と特異度(91.7%)で妊娠予測ができることが明らかになった。第2章の研究成績から、Day 14に超音波ドプラ法で黄体血流面積と血流速度を測定することによって、超早期の妊娠診断が可能であることが示唆された。

第3章では、受胎牛にDay 5に性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤（GnRH）を投与する実験区を設定し、胚移植前後の黄体や卵胞の形態、黄体血流面積、血流速度および血漿プロゲステロン濃度を測定して、GnRH投与が黄体血流および妊娠予測に及ぼす影響について検討した。GnRH投与群（受胎牛と不受胎牛の両方を含む）ではDay 7および14の黄体血流面積が対照群に比べて高値を示したが、血流速度には群間の差は認められなかった。Day 5にGnRHを投与されて受胎した群では、GnRHを投与されて不受胎に終わった群やGnRH無投与の対照群（受胎牛と不受胎牛の両方を含む）よりもDay 7および14の黄体血流面積が高値を示したが、血流速度に差はみられなかった。また、Day 14においてはホルモン処置の有無に関わらず、受胎群の黄体血流面積は不受胎群よりも有意に高い値であった。

またGnRH製剤の投与によってDay 14における妊娠診断の精度が有意に向上し、黄体血流面積と血流速度のカットオフ値をそれぞれ 0.94 cm^2 および 44.93 cm/s に設定することによって、高い感度(97.1%)と特異度(100%)で妊娠診断が可能になることが示唆された。第3章の研究成績から、Day 5にGnRHを投与することによってその後の黄体血流量が増加して、黄体血流面積や血流速度による妊娠診断の精度が向上することが明らかになった。

本研究全体を通じて明らかになった知見は、受胎率向上や超早期の妊娠診断法の開発につながり、牛の胚移植の生産性向上に資するところが極めて大きいと認められた。

以上について、本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると審査委員が全員一致で認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目: Pregnancy prediction on the day of embryo transfer (Day 7) and Day 14 by measuring luteal blood flow in dairy cows
- 著 者 名: Kanazawa, T., Seki, M., Ishiyama, K., Kubo, T., Kaneda, Y., Sakaguchi, M., Izaike, Y. and Takahashi, T.
- 学術雑誌名: Theriogenology
- 巻・号・頁・発行年: 86(6):1436-1444, 2016