超音波画像診断装置によるホルスタイン種乳牛
における黄体機能の評価金子一幸[†] 町出郁子 壹岐直史 澤田治紀 川上静夫

麻布大学獣医学部 (〒229-8501 相模原市淵野辺1-17-71)

(2002年12月16日受付・2004年3月1日受理)

要 約

ホルスタイン種乳牛における黄体形成およびプロジェステロン分泌機能を評価するため、発情後8～10日に超音波画像診断装置を用いて卵巣を観察し、描出された黄体組織面積(黄体面積より黄体内腔面積を減じた)、黄体内腔の有無および大きさと血中プロジェステロン値(P_4 値)との関係を調査した。供試した154例のうち153例に黄体が存在し、それらの血中 P_4 値はいずれも1ng/ml以上であった。血中 P_4 値は黄体組織面積が3cm²未満のもので低く、その面積が増えるに連れて高くなった。黄体内腔の存在および大きさは黄体組織面積や血中 P_4 値に影響しなかった。以上のように、黄体組織面積が大きくなるに連れて血中 P_4 値が高くなり、超音波画像診断装置による黄体組織面積の測定は黄体のプロジェステロン分泌機能の評価に有用なことが示唆された。

——キーワード:ホルスタイン種乳牛, 黄体組織面積, プロジェステロン, 超音波画像診断, 黄体内腔。

----- 日獣会誌 57, 431～434 (2004)

牛において、妊娠の成立およびその維持には黄体から分泌されるプロジェステロンが必要であり、黄体形成不全および黄体の機能が十分でない黄体機能不全は不妊症の一因とされている[10, 11, 14, 20]。そのため黄体形成および黄体機能を促進する目的で、人工授精時、人工授精後8日、10日、または12日にGnRHやhCGを投与し、受胎率を高める試みが行われている。しかし、それらの成績はホルモン剤の投与が受胎率を向上させたもののや、受胎率には影響しなかったものなど一様でない[1, 19, 22]。報告者により成績が一様でないのは、黄体形成不全や黄体機能不全状態の診断が困難であり[13]、GnRHやhCGの投与が診断的治療として行われているためかもしれない。また、嚢腫様黄体は黄体形成不全の一つとされているが、受胎や妊娠維持に影響しないとも言われている[3, 9]。さらに胚移植の場合、受胎牛の移植前日の血中プロジェステロン濃度が2.5ng/ml以上の場合は、それ未満のものに比べて受胎率は高いことが報告されている[12]。このように牛の繁殖管理において、黄体形成および黄体機能の状態を正確に評価することは重要である。

黄体形成および機能の評価は、一般的には直腸検査による黄体の形状によって行われているが、直腸検査によ

って正確に評価することは困難である[5, 14, 15, 23]。乳汁中や血中のプロジェステロン値(P_4 値)の測定は、黄体のプロジェステロン分泌機能を知るための有効な方法であるが[16]、測定結果が判明するまでに時間を要する。

本研究では、臨床現場で黄体の形状をリアルタイムで客観的に評価することを目的とし、超音波画像診断装置により描出された黄体組織面積、黄体内腔の有無および大きさと血中 P_4 値との関係を調査した。

材 料 お よ び 方 法

供試動物:麻布大学で飼養されているホルスタイン種経産牛17頭、および大学近郊の酪農家1戸で飼養されているホルスタイン種経産牛65頭を供試した。大学で飼養されている牛は教育実習用のもので、産歴および分娩後の日数は不明であり、泌乳していなかった。これら大学で飼養されている牛について、1～3日間隔で外部発情徴候および直腸検査による卵巣の観察を行い、外部発情徴候が発現した場合には直腸検査により排卵を確認した。また、発情徴候発現後8～10日(発情徴候発現日を0日とする)に超音波画像診断装置を用いて卵巣の観察を行った。大学で飼養されている牛は1頭につき2

[†] 連絡責任者:金子一幸(麻布大学獣医学部獣医学科臨床繁殖学研究室)

〒229-8501 相模原市淵野辺1-17-71 ☎0427-54-7111 FAX 0427-54-7661

～5回供試し、延べ例数は68例であった。酪農家で飼養されている牛の産歴は 2.8 ± 1.6 産（平均値 $\pm$ 標準偏差）、分娩後の日数は 165.3 ± 57.7 日、泌乳量は日量10～30kgであった。これらの牛については、外部発情徴候の発現時に人工授精を実施し、排卵を確認することなく、人工授精後8～10日に超音波画像診断装置を用いて卵巣の観察を行った。この時の授精で不受胎であった場合には次回の発情徴候発現時にも供試し、1頭につき1～4回供試し、延べ例数は86例であった。供試牛はいずれもタイストールで管理され、飼料の給与はNRC飼養標準1989年度版に準拠して行われていた。

卵巣の観察：5MHzの経直腸用リニア型探触子^{a)}を装着した超音波画像診断装置^{b)}を用いて、全例において同一者が行った。観察では、超音波画像診断装置の画面を黄体の断面積が最大に描出されていると思われるところで静止させた。次いで、キャリパーマークを黄体組織の外縁に沿って移動させ、その軌跡で囲まれた面積を超音波画像断層装置の面積測定機能により測定し、全体の黄体面積を黄体組織面積とした。黄体に内腔が存在する場合は、画面を内腔の面積が最大に描出されていると思われるところで再度静止させ、キャリパーマークを内腔の外縁に沿って移動させ、その軌跡で囲まれた面積を同様に測定した。これを黄体内腔面積とし、全体の黄体面積から内腔面積を減じたものを黄体組織面積とした。また黄体内腔の直径が7～10mm以上のものは嚢腫様黄体とされている[17]ことから、本研究においては黄体内腔面積から逆算して直径を求め、直径が7mm以上となるものを嚢腫様黄体とした。

血中P₄値の測定：卵巣の観察時に尾静脈よりヘパリン加真空採血管に採血し、麻布大学で飼養されている牛についてはただちに3,500rpmで10分間遠沈して血漿を分離した。酪農家で飼養されている牛については採取した血液をアイスボックスに入れて大学に搬入し、採血後90分以内に血漿を分離した。血中P₄値の測定にはプロジェステロン測定用キット^{c)}を用いた。

統計処理：黄体組織面積が3cm²未満のものをⅠ群、3cm²以上4cm²未満のものをⅡ群、4cm²以上5cm²未満のものをⅢ群、5cm²以上6cm²未満のものをⅣ群、ならびに6cm²以上のものをⅤ群として5群に区分し、各群の血中P₄値の平均についてStudent's-*t*検定で解析した。また、黄体内腔が存在しないものを無内腔群、内腔直径が7mm未満のものを小内腔群、および7mm以上のものを嚢腫様黄体群として3群に区分し、各群の血中P₄値および黄体組織面積の平均についてStudent's-*t*検

表1 超音波診断装置により測定した黄体組織面積と血中プロジェステロン値

黄体の分類	例数	黄体組織面積 (cm ²)	プロジェステロン値 (ng/ml) ^a
黄体なし	1 (0.6%)		<1
Ⅰ群	12 (7.8%)	<3	4.7 $\pm$ 2.6 ^b
Ⅱ群	35 (22.7%)	3～<4	6.6 $\pm$ 3.3
Ⅲ群	52 (33.8%)	4～<5	7.1 $\pm$ 3.5 ^c
Ⅳ群	32 (20.8%)	5～<6	6.6 $\pm$ 3.1
Ⅴ群	22 (14.3%)	6～	7.8 $\pm$ 3.1 ^d

a：平均値 $\pm$ 標準偏差

有意差bc間に $P<0.05$ ，bd間に $P<0.01$ 。

表2 黄体内腔の大きさ、黄体組織面積および血中プロジェステロン値

黄体内腔の分類	例数	黄体組織面積 (cm ²) ^c	プロジェステロン値 (ng/ml) ^c
無内腔群	75 (49.0%)	4.7 $\pm$ 1.5	6.8 $\pm$ 3.3
小内腔群 ^a	24 (15.7%)	4.6 $\pm$ 1.2	7.1 $\pm$ 3.4
嚢腫様黄体群 ^b	54 (35.3%)	4.8 $\pm$ 1.7	6.7 $\pm$ 3.4

a：黄体内腔面積が0.38cm²未満。

b：黄体内腔面積が0.38cm²以上。

c：平均値 $\pm$ 標準偏差。

定で解析した。さらに、嚢腫様黄体群のうち内腔直径が12mm未満のものをA群、12mm以上17mm未満のものをB群、17mm以上22mm未満のものをC群、22mm以上のものをD群として4群に区分し、各群の黄体組織面積および血中P₄値の平均についてStudent's-*t*検定で解析した。そして、危険率5%未満($P<0.05$)を有意差ありとした。

成 績

黄体組織面積と血中P₄値：大学で飼養し、排卵を確認した68例では全例に黄体が認められた。酪農家で飼養され、人工授精後に排卵確認を行わなかった86例では、85例に黄体が認められ、1例では黄体は確認されなかった。黄体が存在した153例の血中P₄値は全例で1ng/ml以上(1.4～16.2ng/ml)を示したが、黄体が存在しなかった1例の血中P₄値は1ng/ml未満であった。

黄体組織面積により5群に区分した各群の血中P₄値はⅠ群(4.7 $\pm$ 2.6ng/ml：平均値 $\pm$ 標準偏差)で最も低く、Ⅲ群との間には5%の危険率で、Ⅳ群との間には1%の危険率で有意差が認められた(表1)。血中P₄値は黄体組織面積が大きくなるに連れて高くなったが、Ⅰ群以外の各群間に有意差は認められなかった(表1)。

黄体内腔の有無および大きさと黄体組織面積ならびに血中P₄値：卵巣に存在した153個の黄体のうち、75個(49.0%)の黄体には内腔が存在せず、78個(51.0%)

a) UST-588U-5，アロカ㈱，東京。

b) SSD-500，アロカ㈱，東京。

c) オブチェック血液用EIAキット，デンカ製薬㈱，神奈川。

表3 囊腫様黄体群における黄体内腔の大きさ、黄体組織面積および血中プロゲステロン値

黄体内腔の 大きさによる 分類(内腔直径)	例 数	黄体組 織面積 (cm ²)	プロジェ ステロン値 (ng/ml) ^a
A群 ($\geq 7 \sim < 12$ mm)	2	<3	1.9 $\pm$ 0.6
	7	3 $\sim$ <4	5.8 $\pm$ 2.8
	11	4 $\sim$ <5	6.4 $\pm$ 2.8
	8	5 $\sim$ <6	7.2 $\pm$ 3.8
	0	6 $\sim$	
平均値 $\pm$ 標準偏差	28 (51.8%)	4.4 $\pm$ 0.9	6.1 $\pm$ 3.2
B群 ($\geq 12 \sim < 17$ mm)	0	<3	
	1	3 $\sim$ <4	13.3
	5	4 $\sim$ <5	6.9 $\pm$ 2.6
	4	5 $\sim$ <6	6.6 $\pm$ 3.3
	4	6 $\sim$	7.5 $\pm$ 2.8
平均値 $\pm$ 標準偏差	14 (25.9%)	5.2 $\pm$ 1.7	7.4 $\pm$ 3.0
C群 ($\geq 17 \sim < 22$ mm)	1	<3	3.7
	1	3 $\sim$ <4	3.5
	3	4 $\sim$ <5	6.7 $\pm$ 3.9
	0	5 $\sim$ <6	
	0	6 $\sim$	
平均値 $\pm$ 標準偏差	5 (9.3%)	3.7 $\pm$ 1.7	5.5 $\pm$ 3.2
D群 (≥ 22 mm)	1	<3	6.9
	0	3 $\sim$ <4	
	1	4 $\sim$ <5	16.2
	2	5 $\sim$ <6	4.4 $\pm$ 1.0
	3	6 $\sim$	8.2 $\pm$ 3.6
平均値 $\pm$ 標準偏差	7 (13.0%)	5.8 $\pm$ 3.5	8.1 $\pm$ 4.5

a: 平均値 $\pm$ 標準偏差。

の黄体に内腔が存在した。内腔が存在したものうち、小内腔が存在したものは24個(15.7%)、囊腫様黄体と区分されたものは54個(35.3%)であった。黄体組織面積は無内腔群(4.7 $\pm$ 1.5cm²)、小内腔群(4.6 $\pm$ 1.2cm²)、および囊腫様黄体群(4.8 $\pm$ 1.7cm²)の3群でほぼ等しく、各群間で有意差は認められなかった(表2)。また血中P₄値も無内腔群(6.8 $\pm$ 3.3ng/ml)、小内腔群(7.1 $\pm$ 3.4ng/ml)、および囊腫様黄体群(6.7 $\pm$ 3.4ng/ml)の3群でほぼ等しく、各群間で有意差は認められなかった(表2)。

囊腫様黄体群における黄体内腔の大きさと黄体組織面積ならびに血中P₄値：黄体内腔の大きさにより4群に区分した囊腫様黄体群の黄体組織面積は、黄体内腔が最も大きかったD群(5.8 $\pm$ 3.5cm²)で最も大きかったが、黄体内腔の大きさと黄体組織面積の間には一定の傾向はみられず、各群間に有意差は認められなかった(表3)。また、血中P₄値は、D群(8.1 $\pm$ 4.5ng/ml)で最も高く、C群(5.5 $\pm$ 3.2ng/ml)で最も低かったが、黄体内腔の大きさと血中P₄値の間には一定の傾向はみられず、各群間で有意差は認められなかった(表3)。

考 察

黄体は排卵後7～9日で完成し[4]、超音波画像診断装置によりこの時の黄体面積を測定することは、そのプロゲステロン分泌機能を評価するうえで血中P₄値を測定することと同等な価値があると報告されている[7]。また、Wiseら[24]は発情周期における黄体の長径と短径の変化は、血中P₄値の変化に類似していたと報告している。今回の研究でも、超音波画像診断装置により描出された黄体組織面積が大きいほど血中P₄値は高く、逆に黄体組織面積が3cm²未満のもので最も低かった。プロゲステロンの分泌は黄体組織の重量に依存しているため[2]、その機能を推測するには黄体の体積を測定するほうが望ましいかもしれない。しかし、2次元の超音波画像診断装置によって描出された画像から、不整形の3次元の体積を求めることは、より大きな誤差を生じる可能性がある。

排卵確認を行ったものでは全例で黄体が存在し、血中P₄値はいずれも機能性の黄体が存在するとされる1ng/ml以上であった[18]。黄体が存在せず、血中P₄値が1ng/ml以下であったものは、排卵確認を行わなかった86例中1例のみであり、本例では排卵が起こらなかった可能性もある。今回得られた成績は、排卵後に黄体形成不全となりプロゲステロン分泌機能が低い例は多くないことを示す。

今回の研究では153個の黄体のうち78個(51.0%)の黄体に内腔が存在しており、これは発情後7日の黄体では40.7%に内腔が存在していたとするGarcia & Salaheddine[3]の報告と一致する。囊腫様黄体の黄体組織中のプロゲステロン濃度は正常な黄体のものより低く[21]、受胎障害の原因になる可能性が高いが、その内容液を人為的に排除することにより受胎率の向上することが報告されている[6]。一方、内腔の存在や大きさは黄体組織の体積や重量、および血中P₄値に影響せず[4, 7, 8]、囊腫様黄体は受胎や妊娠維持に影響しないとも言われている[3, 9]。今回の成績でも黄体内腔の存在や大きさは、黄体組織面積や血中P₄値に影響しなかった。これらの結果は、黄体内腔の存在や大きさは黄体のプロゲステロン分泌機能を損なわないことを示唆する。

以上のことから、超音波画像診断装置を用いた黄体組織面積の測定により、黄体のプロゲステロン分泌機能の評価が可能であると思われた。

引 用 文 献

- [1] Drew SB, Peters AR: Vet Rec, 134, 267-269 (1994)
- [2] Erb RE, Randel RD: J Anim Sci, 32, 80-106 (1971)
- [3] Garcia A, Salaheddine M: Reprod Dom Anim, 35,

- 113-118 (2000)
- [4] Grygar I, Kudlaac E, Dolezel R, Nedbalkova J : Anim Reprod Sci, 49, 78-82 (1997)
- [5] Hussein FM, Paccamonti DL, Eilts BE, Younis MYM : Theriogenology, 38, 431-439 (1992)
- [6] 金田義宏, 百目鬼郁男, 中原達夫 : 家畜繁殖誌, 26, 37-42 (1980)
- [7] Kastelic JP, Bergfelt DR, Ginther OJ : Theriogenology, 33, 1269-1278 (1990)
- [8] Kastelic JP, Pieson RA, Ginther OJ : Theriogenology, 34, 487-498 (1990)
- [9] Kito S, Okuda K, Miyazawa K, Sato K : Theriogenology, 25, 325-333 (1986)
- [10] Knickerbocker JJ, Drost M, Thatcher WW : Current Therapy in Theriogenology, DA Morrow eds, 2nd ed, 117-125, WB Saunders Company, Philadelphia (1986)
- [11] Nachreiner RF : Current Therapy in Theriogenology, DA Morrow eds, 2nd ed, 17-20, WB Saunders Company, Philadelphia (1986)
- [12] Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T, Kaneda Y : J Reprod Dev, 44, 413-419 (1998)
- [13] Noakes DE : Veterinary reproduction and obstetrics, GH Arthur, et al eds, 5th ed, 295-327, Bailliere Tindall, London (1982)
- [14] Noakes DE : Veterinary reproduction and obstetrics, GH Arthur, et al eds, 7th ed, 345-388, Bailliere Tindall, London (1996)
- [15] Ott RS, Bretzlaff KN, Hixon JE : J Am Vet Med Assoc, 188, 1417-1419 (1986)
- [16] Pierson RA, Ginther OJ : Theriogenology, 28, 929-936 (1987)
- [17] Roberts SJ : 獣医産科繁殖学—その診断と治療—, 臼井和哉, 河田啓一郎監訳, 344-357, 学窓社, 東京 (1978)
- [18] Robertson HA, Sarda IR : J Endocrinol, 49, 407-419 (1971)
- [19] Ryan DP, Snijders S, Condon T, Grealy M, Sreenan J, O'Farrell KJ : Anim Reprod Sci, 34, 179-191 (1994)
- [20] Sreenan JM, Diskin MG : Vet Rec, 112, 517-521 (1983)
- [21] Staples RE, McEntee K, Hansel W : J Dairy Sci, 44, 2049-2057 (1961)
- [22] Stevenson JS, Call EP, Scoby RK : J Dairy Sci, 73, 1766-1772 (1990)
- [23] Watson ED, Munro CD : Br Vet J, 136, 555-560 (1980)
- [24] Wise TH, Caton D, Thatcher WW, Barron DH, Fields MJ : J Anim Sci, 55, 627-637 (1982)

Ultrasonographic Evaluation of the Corpus-luteum Function in Holstein Cows

Kazuyuki KANEKO^{*†}, Ikuko MACHIDA, Naofumi IKI, Haruki SAWADA and Shizuo KAWAKAMI

** Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Sagamihara, 229-8501, Japan*

SUMMARY

To evaluate the progesterone-secreting function of the corpus luteum objectively, ultrasonographic measurements were made of the luteal-tissue area and the central luteal cavity; and progesterone concentration (P_4) was determined by means of enzyme immunoassay 8 ~ 10 days following estrus. Observation of the corpus luteum in 153/154 cows showed plasma P_4 concentration of more than 1 ng/ml. These concentrations were lowest when the luteal-tissue area was less than 3 cm² and grew higher as that area increased. The presence and size of a central luteal cavity exerted no influence on either plasma P_4 concentration or luteal-tissue area. These results suggest that ultrasonographic measurement of the corpus-luteum area is useful in assessing progesterone-secreting ability.

— Key words : central luteal cavity, Holstein cow, luteal-tissue area, progesterone, ultrasonography.

† Correspondence to : Kazuyuki KANEKO (Azabu University)

1-17-71 Fuchinobe, Sagamihara, 229-8501, Japan TEL 0427-54-7111 FAX 0427-54-7661

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 57, 431 ~ 434 (2004)