

研究論文

## 黒毛和種牛胎子の経直腸超音波検査法による成長曲線と 血中エストロンサルフェート濃度

峯 雄太・邊見広一郎<sup>1)</sup>・小林郁雄<sup>1)</sup>・北原 豪・上村俊一†

宮崎大学農学部獣医臨床繁殖学講座, <sup>1)</sup>宮崎大学農学部附属住吉フィールド

(2009年11月26日 受理)

## Fetal Growth Curves Depicted by Transrectal Ultrasonography and Plasma Concentrations of Estrone Sulfate in Japanese Black Cows

Yuta MINE, Koichiro HENMI<sup>1)</sup>, Ikuo KOBAYASHI<sup>1)</sup>, Go KITAHARA, Shunichi KAMIMURA †

Laboratory of Theriogenology, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki,

<sup>1)</sup> Sumiyoshi Field, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

**Summary :** In order to depict fetal growth curves, fetometry in seventeen Japanese Black cows were conducted continuously by transrectal ultrasonography between Day 33 and Day 116 of gestation. In accordance with ultrasonography, peripheral blood was collected and plasma concentrations of progesterone (P<sub>4</sub>) and estrone sulfate (E<sub>1</sub>S) were measured by ELISA. In the fetometry, seven parts of fetal organs were obtained and the fetal growth curves during early gestation were formulated. Fetal growth curves were highly correlated with fetal ages. However, plasma concentrations of P<sub>4</sub> and E<sub>1</sub>S showed no correlation with fetal ages during Day 40 to Day 110. In conclusion, fetal growth curves obtained by continuous transrectal ultrasonography were highly correlated with fetal development and could be used for assessing fetal ages and diagnosis of abnormal fetal growth.

**Key words :** Estrone sulfate, Fetal growth curves, Fetometry, Japanese Black cows, Transrectal ultrasonography

### 緒 言

超音波検査法により作成される牛胎子の成長曲線は、胎齢の推定や成長異常の診断の指標となる。牛胎子の成長曲線は、自然交配によるパツファロー (Ali & Fahmy 2008) や、個体群の動態観察や管理計画が必要なシカ (Yanagawa *et al.* 2009), ホルスタイン種牛 (Shah *et al.* 2007) などでは作成されているが、黒毛和種牛の報告は少ない。

一方、エストロンサルフェート (E<sub>1</sub>S) は胎盤で合成されるエストロゲン硫酸抱合体であり、妊娠中期から後期に血中エストロゲンの中で最

大濃度となり、胎齢100日以降の胎盤機能や胎子成熟度の指標となる。しかし、妊娠早期では血中E<sub>1</sub>S濃度が低く、主に放射免疫測定法 (RIA) による測定であり (Hirako *et al.* 2002), その動態は十分には解明されていない。

今回、黒毛和種牛17頭を用いて、妊娠早期における胎子の様々な部位の長さを超音波検査法で継続的に計測し、成長曲線を作成した。また、母牛の血中E<sub>1</sub>S濃度と血中プロジェステロン (P<sub>4</sub>) 濃度を酵素免疫測定法 (ELISA) で測定し、超音波検査法による胎子成長曲線との関係を検討した。

† 責任著者名: 上村 俊一  
宮崎大学農学部獣医臨床繁殖学講座  
〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1  
Tel/FAX ; 0985-58-7787, e-mail ; kamimuras@cc.miyazaki-u.ac.jp

† Corresponding author : Shunichi KAMIMURA  
Laboratory of Theriogenology,  
Faculty of Agriculture, University of Miyazaki  
1-1 Gakuen Kibana-dai Nishi, Miyazaki 889-2192, Japan  
Tel/FAX ; 0985-58-7787, e-mail ; kamimuras@cc.miyazaki-u.ac.jp

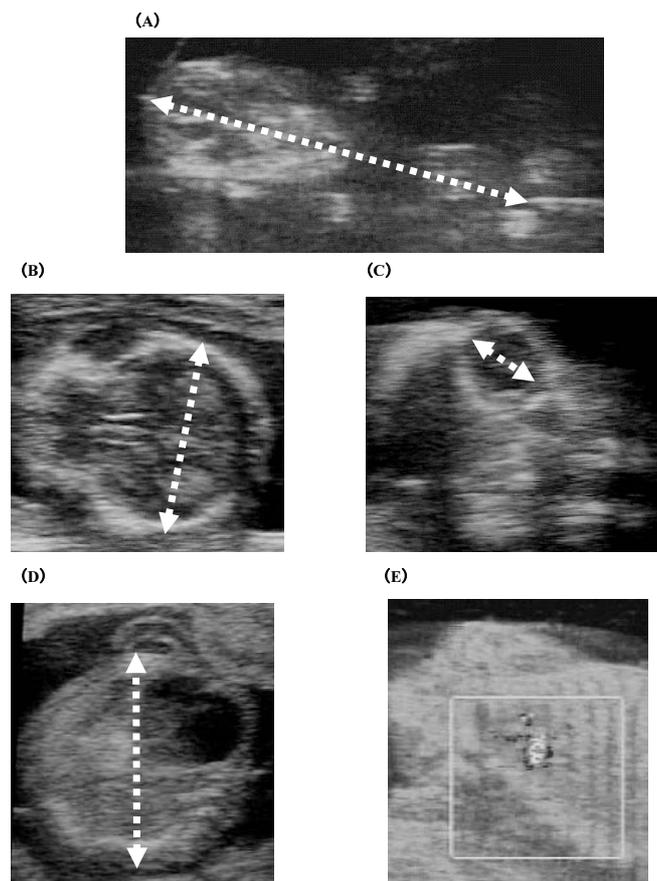
## 材料及び方法

### 1) 供試牛

宮崎大学農学部附属住吉フィールドで、2008年5月から2009年3月に超音波検査で妊娠が確認された黒毛和種牛17頭（平均産次 $\pm$ 標準偏差； $7.5 \pm 3.1$ 産，BCS； $2.9 \pm 0.2$ ，5段階評価法）を用いた。供試牛はフリーバーンで飼養され、毎年6月から10月は9時から16時の間、イタリアン主体の牧草地に放牧された。調査は、胎齡33日から116日の胎子を持つ妊娠牛を柵場に保定し、2日から7日間隔で、7.5 MHzのリニア型探触子を装着した携帯型超音波診断装置（HS-1500 U，本田電子，東京，及びSonoSite 180 PLUS，ソノサイトジャパン，東京）を用いて、同一人が経直腸超音波検査法により胎子計測を行った。

### 2) 超音波検査法

超音波診断装置を用いて描出された胎子の画像はビデオカメラ（DZ-HS903，日立，東京）で動画として保存し、その後、動画再生ソフト（Windows Media Player，マイクロソフト，USA）で再生し、静止画像で胎子の各部位を測定した。測定部位として、胎子の頭頂部から尾根部までの距離を示す頭臀長（Crown-Rump Length；CRL，Fig. 1-A），頭蓋骨の水平断面上で、脳硬膜が頭蓋内の正中で板状に突出し、脳梁に至る大脳鎌がみえる位置の両側頭骨間の距離を示す大横径（Biparietal Diameter；BPD，Fig. 1-B），眼球径（Eyeball Diameter；EBD，Fig. 1-C），腹部横断面上で臍帯がみえる位置で外部から圧力を受けていない状態の最小直径を示す臍帯付着部横断径（Cross-section of the



**Fig. 1.** Ultrasound images of respective fetal organs. The length of dashed line was measured.

- (A) Crown-Rump Length ; CRL (30 mm)
- (B) Biparietal Diameter ; BPD (40 mm)
- (C) Eyeball Diameter ; EBD (17 mm)
- (D) Cross-section of the Abdomen at the insertion of the Umbilical cord ; CAU (30 mm)
- (E) Fetal Heart Rate ; FHR (140 beats/min)

Abdomen at the insertion of the Umbilical cord; CAU, Fig. 1-D), 心拍数 (Fetal Heart Rate; FHR, Fig. 1-E) について計測した. 心拍数は10秒間の測定を5回行い, その平均値を6倍して算出した. さらに, 生後生殖器となる生殖結節 (Genital Tubercle; GT) の臍帯や尾に対する相対的位置により胎子の性別を行い, GTが臍帯の尾側にあるものを雄, GTが臍帯の周囲になく尾根部にあるものを雌と判定した.

計測したCRL, BPD, EBD, CAU, FHRは項目毎に胎齢をX軸, それぞれ計測して得られた測定値をY軸にとり, それに基づき散布図を描き, 二次回帰法により成長曲線を作成した. さらに, 通常母牛が6産のとき新生子牛の体重が最大であることから, 供試牛を2, 3, 4産の低産次群, 5, 6, 7産の中産次群, 8産以上の高産次群に分け, 産次別および胎子の雌雄別に成長曲線を検討した.

### 3) ホルモン測定

毎回の観察時に尾静脈よりヘパリン加血として10 mLを採血し, その後4℃, 3000 rpm, 20分間で遠心して (テーブルトップ冷却遠心機, 久保田, 東京) 血漿を分離し, 測定まで -30℃ で保存した. 血中プロゲステロン ( $P_4$ ) 濃度は自動免疫蛍光測定装置 (Mini-VIDAS, 日本ビオメリュー, 東京) で測定した. 血中エストロンサルフェート ( $E_1S$ ) 濃度は逆相カートリッジ (Sep-Pak plus C18, Waters Corp, MA, USA) で抽出後, ELISA (Bovine Estrone Sulfate ELISA Test Kit, Endocrine Technologies, CA, USA) で測定した. 本試験での測定範囲と感度は, それぞれ血中  $P_4$  濃度で0.25 ng/mLから80 ng/mL, 0.25 ng/mL, 血中  $E_1S$  濃度で0.05 ng/mLから10 ng/mL, 5 ng/mLであった.

### 4) 統計学的解析

統計学的解析は, 胎齢とそれぞれの測定値, 並びに血中ホルモン濃度との間で得られた相関関係について無相関検定を行い, 有意性を検討した. その際,  $P < 0.05$  を有意差ありとした.

## 結果

供試牛17頭全てにおいて, 観察期間中に胚死や流産などの異常はみられなかった.

CRLは, 胎齢との間に,  $y = 0.0435x^2 - 2.4301x + 43.339$  (相関係数;  $r = 0.962$ ,  $P = 7.5 \times 10^{-10}$ )

の回帰曲線が得られた. CRLは胎子の発達に伴い, 全測定項目中で最も早期に同一画面上での描出が困難となり, 特に胎齢58日以降は計測できなかった. 一方, 計測値は, 常に胎子の姿勢による影響を受けた.

BPDは, 胎齢との間に,  $y = 0.001x^2 + 0.3573x - 11.395$  ( $r = 0.985$ ,  $P = 9.2 \times 10^{-13}$ ) の回帰曲線が得られた (Fig. 2-A). BPDの回帰曲線はより直線に近く, 頭蓋骨の直径であることから, 胎子の姿勢や母体の動きによる影響を受けることはなかった.

EBDは, 胎齢との間に,  $y = 0.0019x^2 - 0.0429x + 1.5285$  ( $r = 0.977$ ,  $P = 3.8 \times 10^{-14}$ ) の回帰曲線が得られた. EBDは, 最大画像を描出できれば今回計測した部位の中で変動が最も小さく, また左右眼球による差は特にみられなかった.

CAUは, 胎齢との間に,  $y = 0.0059x^2 - 0.1594x + 5.3595$  ( $r = 0.990$ ,  $P = 2.1 \times 10^{-11}$ ) の回帰曲線が得られた. CAUは胎子の姿勢や母体の動きによる影響を受けやすかった.

FHRは, 胎齢との間に,  $y = -0.0088x^2 + 1.2578x + 96.325$  ( $r = 0.547$ ,  $P = 2.3 \times 10^{-2}$ ) の回帰曲線が

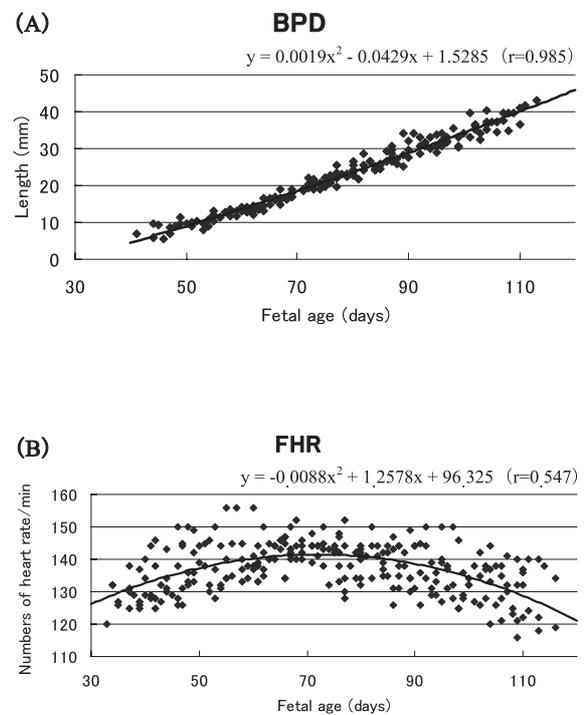
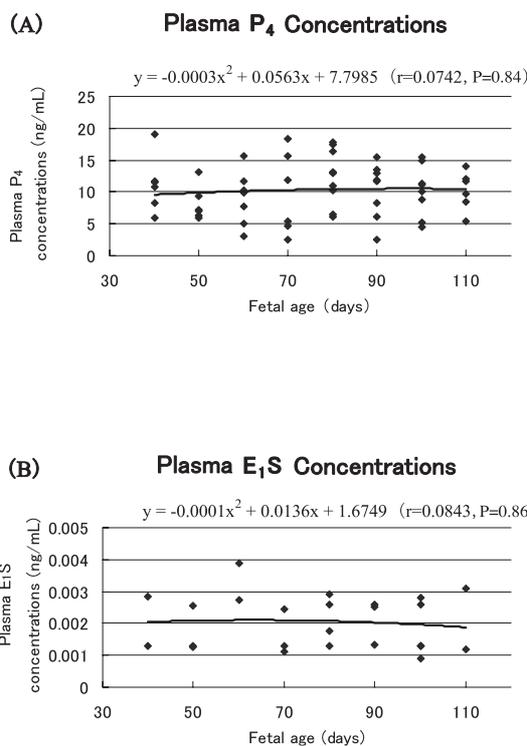


Fig. 2. Regression curves with a multiple regression formula.

(A) BPD, (B) FHR

**Table 1.** Correlation coefficient (r) and probability (P) of Crown-Rump Length (CRL), Biparietal Diameter (BPD), Eyeball Diameter (EBD), Cross-section of the Abdomen at the insertion of the Umbilical cord (CAU) and Fetal Heart Rate (FHR) characterized with fetal sex and number of calvings.

Item	(n)	CRL		BPD		EBD		CAU		FHR	
		r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
Fetal sex	Male (9)	0.964	$3.0 \times 10^{-5}$	0.983	$1.9 \times 10^{-6}$	0.979	$3.1 \times 10^{-7}$	0.990	$4.2 \times 10^{-6}$	0.421	$2.6 \times 10^{-1}$
	Female (8)	0.960	$1.5 \times 10^{-4}$	0.986	$6.2 \times 10^{-6}$	0.977	$2.2 \times 10^{-6}$	0.990	$2.9 \times 10^{-5}$	0.539	$1.7 \times 10^{-1}$
Number of Calvings	2, 3, 4 (3)	0.989	$9.5 \times 10^{-2}$	0.989	$9.5 \times 10^{-2}$	0.969	$1.0 \times 10^{-1}$	0.987	$1.6 \times 10^{-1}$	0.837	$3.7 \times 10^{-1}$
	5, 6, 7 (7)	0.940	$1.6 \times 10^{-3}$	0.985	$5.1 \times 10^{-5}$	0.977	$6.8 \times 10^{-6}$	0.993	$1.5 \times 10^{-4}$	0.491	$2.6 \times 10^{-1}$
	8 (7)	0.974	$2.1 \times 10^{-4}$	0.986	$4.8 \times 10^{-5}$	0.981	$2.7 \times 10^{-5}$	0.989	$9.1 \times 10^{-5}$	0.561	$1.9 \times 10^{-1}$
Total	(17)	0.962	$7.5 \times 10^{-10}$	0.985	$9.2 \times 10^{-13}$	0.977	$3.8 \times 10^{-14}$	0.990	$2.1 \times 10^{-11}$	0.547	$2.3 \times 10^{-2}$



**Fig. 3.** Correlation between fetal age and plasma concentrations progesterone ( $P_4$ ) or estrone sulfate ( $E_1S$ ) during early pregnancy. There was no significant difference in the correlation coefficient of  $P_4$  and  $E_1S$ .

(A)  $P_4$ , (B)  $E_1S$

得られた (Fig. 2-B). 他の測定項目に比べ相関係数は小さいが (Table 1), 統計学的有意性があり ( $P < 0.05$ ), 妊娠70日をピークとする放物線を描いた.

胎子の性別別は, 雄で胎齢  $59.6 \pm 2.6$  日, 雌で  $61.8 \pm 1.9$  日, 全体で  $60.6 \pm 2.5$  日から判定が可能であった. 子牛の出生後, 超音波診断装置で胎子性別別を行った結果と, 実際に娩出された子牛の

性別は全て一致した.

各測定部位において, 母牛が2, 3, 4産の低産次群, 5, 6, 7産の中産次群, 8産以上の高産次群の3群間, 及び胎子の雌雄間における成長曲線に特に有意差はみられなかった (Table 1).

胎齢40日から110日において, 血中 $P_4$ 濃度は2.49 ng/mLから19.06 ng/mLの間で推移し (Fig. 3-A), 胎齢との間に有意な相関関係はみられなかった ( $r = 0.0742$ ,  $P = 0.84$ ). また血中 $E_1S$ 濃度は, 0.0011 ng/mLから0.0039 ng/mLの間で推移し (Fig. 3-B), 胎齢との間に有意な相関関係はみられなかった ( $r = 0.0843$ ,  $P = 0.86$ ).

## 考 察

今回作成した黒毛和種牛の胎子の成長曲線は, 妊娠早期において胎齢との間に高い相関関係を示し, 胎子の成長を推察する上で有用であった. また各測定部位において産次別や雌雄別に明瞭な違いはみられなかった. このことから, 今回, 妊娠早期における黒毛和種牛の胎子について, 標準的な成長曲線が得られたと考えられる. 計測部位として, 胎子の姿勢や母体の動きの影響を受けやすい頭臀長 (CRL) や臍帯附着部横断径 (CAU) より, 骨組織である大横径 (BPD) や眼球径 (EBD)の方が適していた. Ali & Fahmy (2008) はバッファローにおいて, 妊娠初期は頭臀長 (CRL), 中期は大横径 (BPD), 中期と後期は眼球径 (EBD) で胎齢との間に最も高い相関がみられると報告しており, 今回の黒毛和種牛の測定結果と類似した. 一方, バッファローにおいて胎子胎盤が最も長期間にわたり観察可能で, 胎齢推定に適するとされるが, 今回は特に測定しなかった.

Breukelman *et al.* (2004) はホルスタイン種

牛で胎子心拍数 (FHR) が胎齢60日をピークとする放物線を描くと報告しており、今回の胎齢70日付近をピークとする結果と類似した。一方、同じBreukelman *et al.* (2004) はホルスタイン種牛では、FHRが胎齢40日で172回/分、胎齢60日で180回/分、胎齢100日で158回/分としており、今回の黒毛和種牛より約30回/分多くなる結果を報告している。これらのことから、FHRで胎齢を推定する際は、胎子の品種でその結果が変動することが示唆された。

胎子の性別別では、雄で胎齢 $59.6 \pm 2.6$ 日、雌で同 $61.8 \pm 1.9$ 日、全体で同 $60.6 \pm 2.5$ 日からの判定が可能であり、また出生した子牛は性別が全て一致していることから、超音波検査法による胎子の性別別は有用であると判定された。

胎齢40日から110日において、血中 $P_4$ 濃度は2.49 ng/mLから19.06 ng/mL、血中 $E_1S$ 濃度は0.0011 ng/mLから0.0039 ng/mLの間で変動し、今回両ホルモンと胎齢との間に有意な相関関係はみられなかった。血中 $E_1S$ 濃度は胎齢50日付近から徐々に増加し、胎齢80日から急激に上昇するという報告 (Hirako *et al.* 2000) があるが、今回はそのような現象はみられなかった。これはホルスタイン種と黒毛和種の品種差 (Isobe *et al.* 2003) や、 $E_1S$ の測定方法がELISAとRIAで異なっていたことが考えられる。

結論として、経直腸超音波検査による妊娠早期の胎子計測や胎子の性別別は可能であり、胎齢の推定や成長異常の診断に有用であった。

## 要 約

牛胎子の成長曲線を作成するため、黒毛和種牛17頭を用いて、胎齢33日から116日まで継続的に、胎子の様々な部位の長さを経直腸超音波検査法で計測した。また、母牛の血中プロゲステロン ( $P_4$ ) 濃度とエストロンサルフェート ( $E_1S$ ) 濃度を測定し、超音波検査法による胎子計測との関係を検討した。その結果、体長の計測値と胎齢との間に高い相関関係がみられ、妊娠早期における標準的な成長曲線が得られた。一方、胎齢40日から110日における血中 $P_4$ 濃度および $E_1S$ 濃度は、胎齢との間に有意な関係は得られなかった。結論として、経直腸超音波検査による妊娠早期の胎子計測や性別別は可能であり、胎齢の推定や成長異常

の診断に有用であった。

キーワード：エストロンサルフェート、胎子成長曲線、胎子計測、黒毛和種牛、経直腸超音波検査法

## 引用文献

- Ali, A., S. Fahmy (2008) Ultrasonographic fetometry and determination of fetal sex in buffaloes (*bubalus bubalis*). *Anim. Reprod. Sci.* **106**, 90-99.
- Breukelman, S. P., J. M. C. Reinders, F. H. Jonker, L. de Ruigh, L. M. T. E. Kaal, A. M. van Wagtenonk-de Leeuw, P. L. A. M. Vos, S. J. Dieleman, J. F. Beckers, Zs. Perenyi, M. A. M. Taverne (2004) Fetometry and fetal heart rates between day 35 and 108 in bovine pregnancies resulting from transfer of either MOET, IVP-co-culture or IVP-SOF embryos. *Theriogenology* **61**, 867-882.
- Hirako, M., T. Takahashi, I. Domeki (2002) Peripheral changes in estrone sulfate concentration during the first trimester of gestation in cattle : comparison with unconjugated estrogens and relationship to fetal number. *Theriogenology* **57**, 1939-1947.
- Hirako, M., H. Takahashi, T. Takahashi (2000) Oestrone sulfate commences an increase around 50 days of gestation in bovine peripheral blood. *Reprod. Fertil. Dev.* **12**, 351-354.
- Isobe, N., T. Nakao, O. Uehara, H. Yamashiro, H. Kubota (2003) Plasma concentration of estrone sulfate during pregnancy in different breeds of Japanese beef cattle. *J. Reprod. Dev.* **49**, 369-374.
- Shah, K. D., T. Nakao, H. Kubota, T. Maeda (2007) Peripartum changes in plasma estrone sulfate and estradiol-17 $\beta$  profiles associated with and without the retention of fetal membranes in Holstein-Friesian cattle. *J. Reprod. Dev.* **53**, 279-288.
- Yanagawa, Y., Y. Matsuura, M. Suzuki, S. Saga, H. Okuyama, D. Fukui, G. Bandou, S. Katagiri, Y. Takahashi, T. Tsubota (2009) Fetal age estimation of Hokkaido sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) using ultrasonography during early pregnancy. *J. Reprod. Dev.* **55**, 143-148.