

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07735

研究課題名(和文)世界最大級の馬,日本輓系種における妊娠全期間に渡る新しい胎子診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of new reproductive examination throughout pregnancy in one of biggest horse, Japanese heavy draft horses

研究代表者

南保 泰雄 (Nambo, Yasuo)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：20731623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：体重1000kg近い重輓馬の繁殖雌馬は妊娠が進行するにつれて胎子検査が難しくなる。本研究では、重輓馬の妊娠後半期において、子宮胎盤の厚さおよびその形状を超音波画像診断装置を用いて測定・描出し、その後分娩(流死産)に至るまでの状況を調べた。その結果、重輓馬のCTUPは妊娠の進行とともに増加し、子宮胎盤の2層化、剥離が観察された。また、CTUPおよび形状に異常が見られると定義した異常群においては、流死産・新生子疾病などの異常妊娠が高率に認められた。妊娠中後期の検査において子宮胎盤厚検査は有用であり、重輓馬の生産性向上に有用である。また、大型動物における妊娠診断への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Japanese heavy draft horses are heaviest and their body weight can be over 1,000 kg. therefore it is difficult to examine reproductive situation during pregnancy. In the present study, the combined thickness of the uterus and placenta (CTUP) and ultrasonographic images of uteroplacental tissues were investigated in pregnant heavy draft horses during mid-to late pregnancy.

As a result, CTUP increased as pregnancy progress to 12 months. Survive fetal and foal rate before or at parturition is lower in the abnormal group than in the control group. These findings suggest that increased CTUP and placental separation would reflect placentitis and abnormal pregnancies and may help to detect them in heavy draft horses. The present result might be useful to reduce pregnancy failure in large animals as well as in Japanese heavy draft horses.

研究分野：臨床繁殖学

キーワード：子宮胎盤厚 プロゲステロン エストラジオール 超音波画像診断装置 重輓馬 繁殖 妊娠 流産

1. 研究開始当初の背景

(1)家畜の妊娠後半期における超音波診断装置の効果的な利用は未だ十分にされていない現状にある。その理由のひとつには、ヒト医療と異なり、子宮・胎子容積が増大し、妊娠中期から分娩に至る胎子への有効な検査手段や画像読影技術が確立されていないためである。

(2)軽種馬生産では、経直腸および経腹壁よりコンベックス型探触子（描出深度25-30cm）の使用が有効であり、胎子成長の指標として子宮胎盤厚(CTUP)、頭尾長、眼球、腎臓、心拍数、胎子性腺などを描出、計測することが胎子発育をモニターしうることが報告されている(Murase, Nambo, et al. J. Vet. Med. Sci. 2014)。

また、馬の妊娠期に未だ生殖器官として機能していない精巣・卵巣が胎齢220日頃に著しく肥大化することが知られている。これにより胎子は自ら、活発にエストロゲン前駆物質やインヒピン、アクチピンを分泌する(Nambo Y, et al. Reprod. Fert. Dev. 1996, Tanaka Y, Nambo Y, et al. 2003)ことにより、妊娠の維持、胎盤機能の調節および胎子の成長にとって重要な役割を演じていると考えられる。

胎子性腺の超音波検査による診断について、その重要性を示す報告は少なく(Bucca. Theriogenology, 2005)、各種血中ホルモン動態と超音波画像計測結果を比較・検討することにより、胎子成長停滞や原因不明の流産との関連を解明する上で有用であるものと推察している。上記の診断に関する新たな知見や技術を確立することが研究開始当初の背景である。

2. 研究の目的

馬資源の安定的な確保および大型哺乳動物の妊娠画像診断モデルの礎として、世界最大級の体格を有する日本純系種（ばんえい競走馬資源）を対象とした妊娠期の新しい超音波画像検査法を開発する。日本純系種独自の胎子成長標準値を策定し、さらに、胎子腹腔に内在する精巣・卵巣の肥大化現象に着目し、性判別の可能性、および形態計測値と内分泌との関連性について検索し、超音波画像検査の有用性を検討する。本研究により、大型馬の妊娠全期間の胎子検査法が確立され、これまで不可能であった流産・難産予知や未然対応を通じた生産性向上が可能となる。

3. 研究の方法

本研究は、世界最大級の馬といわれる日本純系種を対象に妊娠全期間を通じて超音波画像検査を実施するための手技および画像読影技術を確立し、胎子発育のモニターおよび妊娠異常の新しい検出方法を見出すことを目的としている。軽量かつ深部観察が可能な超音波診断機器を用いた検索を実施する。

(1)供試動物

2軒の民間牧場および家畜改良センター十勝牧場において飼養されていた妊娠重種馬35頭（ペルシュロン種7頭、ブルトン種1頭、日本純系種27頭）を研究に供した。年齢は3-19歳（中央値8歳）、過去の産歴は0-13産（中央値2産）であった。妊娠馬は放牧され、分娩予定日約1週間前から分娩後数日間は分娩房にて飼養された。

(2)超音波画像検査：

妊娠7ヶ月から12ヶ月にかけて、各妊娠馬に対して月1回の経直腸超音波画像検査を実施した。超音波装置はHS-101Vを用い、5MHzのリニア型プローブ（HLV-155）を接続して使用した（本多電子株式会社、愛知、日本）。子宮頸管頭側かつ腹側の子宮胎盤組織を描出し、3ヶ所の平均値を算出してCTUPとした。描出部位によって厚さに違いが認められた場合には、最も肥厚している部位を採用した。子宮胎盤組織に凹凸、胎盤剥離、2層化が認められた場合には、これらの有無も記録した。妊娠月は既報論文に従って以下のように定義した：7ヶ月、181-210日；8ヶ月、211-240日；9ヶ月、241-270日；10ヶ月、271-300日；11ヶ月、301-330日；12ヶ月、331-360日。

(3)後産検査：

後産は35頭中30頭において採取可能であった。星状部と絨毛部の境界を切除し、10%ホルマリン緩衝液に浸漬後、パラフィンに包埋し、病理学的胎盤検査に供した。組織をヘマトキシリン-エオジン染色し、胎盤浮腫、壊死、出血、炎症細胞浸潤、およびフィブリン蓄積の有無を総合的に判断して胎盤炎を診断した。病理学的な胎盤浮腫の有無も記録した。



(4)群分け：

病理学的に胎盤炎と診断された3頭を胎盤炎群とした。流産、早産、および肉眼的に明らかな奇胎妊娠を呈し、病理学的に胎盤炎と診断されなかった7頭を異常産群とした。なお、異常産を呈し、病理学的胎盤検査を適用できなかった症例は異常産群に含めた。流産は妊娠後期の胎子喪失、早産は妊娠320日目

満の分娩と定義した。臨床的に健康かつ、非胎盤炎と診断され、異常産を呈さなかった25頭を正常群とした。

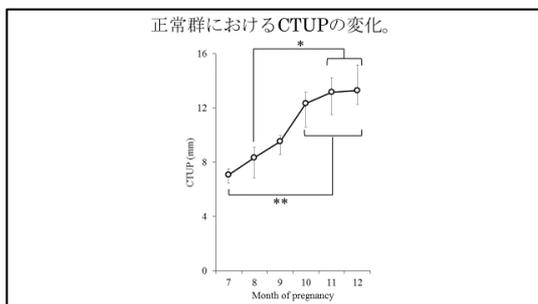
4. 研究成果

(1)胎盤炎群 ABC および異常産群 D-J についての詳細：

Mare A, B, C の3頭が胎盤炎と診断された。Mare A は妊娠 309 日に早産し、子馬は出生直後に死亡した。Mare B は妊娠 305 日に流産した。Mare C は妊娠 334 日に帝王切開し、母子ともに死亡した。Mare D から J の7頭が異常産群に分類された。Mare D および Mare E はそれぞれ妊娠 284 日および 315 日に流産した。Mare F, G, H はそれぞれ妊娠 315 日、318 日、319 日に早産した。そして Mare I および Mare J はそれぞれ妊娠 283 日および 348 日に奇形胎子を娩出した。Mare E および Mare J の後産を病理学的に検査した結果、非胎盤炎と診断され、異常産群に属する他の5頭の胎盤は病理学的検査に供することができなかった。

(2)CTUP：

正常群における CTUP の結果を下図に示す。

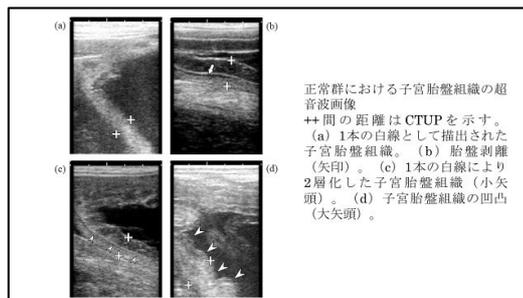


正常群において、CTUP は妊娠7ヶ月(中央値 7.08 mm、5.68-11.27 mm)よりも妊娠10ヶ月(中央値 12.34 mm、9.61-20.11 mm)、11ヶ月(中央値 13.19 mm、8.34-19.81 mm)、12ヶ月(中央値 13.31 mm、7.44-16.31 mm)の方が有意に高値を示し ($p < 0.01$)、妊娠8ヶ月(中央値 8.35 mm、3.67-10.69 mm)よりも妊娠11、12ヶ月の方が有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

胎盤炎に罹患した軽種馬およびポニーについて、CTUP の高値が報告されている。本研究では、胎盤炎群に属する全頭(100%)のCTUPが、正常群の第3四分位よりも高値(正常群の上位25%が含まれる範囲)を示した。15mm以上のCTUPを示した妊娠馬の割合は、胎盤炎群(100%)の方が正常群(28.0%)よりも多かった ($p < 0.05$)。つまり、重挽馬においても胎盤炎によってCTUPは増加し、CTUP測定は胎盤炎検出に有用であることが示唆された。一方で、胎盤浮腫は馬の死産や流産の一因であることから、胎盤炎以外にも流産や早産の危機がある場合にCTUPは増加すると予想された。結果として、重挽馬の異常産においてもCTUPが増加すると推測された。後産の検査数を増やした追加研究が必要と考えられる。

(3)子宮胎盤組織の凹凸：

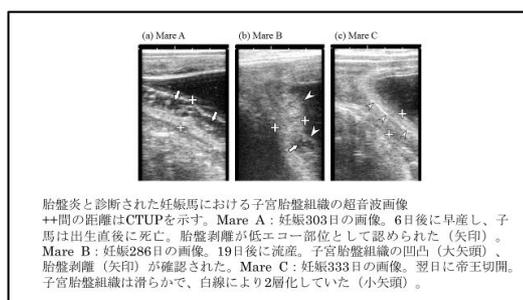
子宮胎盤組織の凹凸を示した超音波画像を下図に示す。子宮胎盤組織の凹凸はほぼ全ての妊娠馬に確認された。各群における発生率は、正常群72.0%、胎盤炎群および異常産群100%であり、群間の発生率に有意差は検出されなかった。



子宮胎盤組織の凹凸は、軽種馬においては子宮胎盤組織の凹凸は胎盤炎症例において報告されている。一方で、本研究では全群において一般的に観察され(発生率は正常群72.0%、胎盤炎群および異常産群100%)、重挽馬においては一般的な所見であると示唆された。重挽馬の大きな胎盤が子宮頸管付近でたわみ、蛇行したことなどが原因として推察された。

(4)胎盤剥離：

超音波画像上の胎盤剥離は、胎盤炎群のうちの2頭(66.7%:Mare Aの妊娠11ヶ月;Mare Bの妊娠10ヶ月)異常産群のうちの2頭(28.6%:Mare FおよびHの妊娠11ヶ月)において確認された。Mare Fは妊娠314日に広範囲の胎盤剥離が確認され、翌日に早産した(図6)。正常群において、胎盤剥離は5頭(20.0%)に確認された(1頭は妊娠11ヶ月



および12ヶ月、2頭は妊娠11ヶ月、2頭は妊娠12ヶ月)。各群における胎盤剥離の発生率に有意差は検出されなかった。

胎盤剥離の発生率は正常群20.0%、異常産群28.6%であったのに対し、胎盤炎群では66.7%であり、統計学的に有意ではないものの胎盤炎群において多く認められた。胎盤剥離は胎盤機能を障害し、胎盤炎に罹患した軽種馬において発生が報告されていることから、重挽馬においても胎盤炎で発生が増加するものと推察された。しかし、本研究では正常群においても20.0%の個体に発生が認められ、重挽馬では胎盤剥離に対して、多少の耐性があるものと推論された。経直腸超音波画像検査にて胎盤剥離が疑われた場合には、ホ

ルモン測定などの他の検査方法の併用が推奨される。

(5)子宮胎盤組織の2層化：

子宮胎盤組織の2層化は、胎盤炎群のうちの1頭(33.3%：Mare Cの妊娠11ヶ月および12ヶ月)、異常産群のうちの3頭(42.9%：Mare Eは妊娠11ヶ月、Mare Fは妊娠10ヶ月、Mare Jは妊娠11ヶ月)、正常群のうちの8頭(32.0%：1頭は妊娠7ヶ月、2頭は妊娠11ヶ月、4頭は妊娠12ヶ月、1頭は妊娠10ヶ月および11ヶ月)において確認された。

子宮胎盤組織の2層化はサラブレッドの胎盤発達に伴う変化として報告されている。本研究での各群における子宮胎盤組織の2層化の発生率は、正常群32.0%、胎盤炎群33.3%、異常産群42.9%であり、群間の発生率に違いは認められなかった。また、正常群の1頭を除く11頭において、妊娠10ヶ月以降に確認されたことから、子宮胎盤組織の2層化は重挽馬においても胎盤の発達を反映し、ウマの種類によらない生理学的な変化であることが推察された。

本研究により、重挽馬の正常なCTUPが明らかとなった。重挽馬のCTUPは、他の品種の馬の報告よりも高値を示し、妊娠進行に伴って増加することが判明した。重挽馬におけるCTUPの増加および胎盤剥離画像の検出は、胎盤炎および異常産の検出に有用であると推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計17件)

Murase H, Ball AB, Tangyuenyong S, Watanabe G, Sato F, Hada T, Nambo Y. Serum Anti-Müllerian Hormone Concentrations in Mares With Granulosa Cell Tumors Versus Other Ovarian Abnormalities. *J. Equine Vet. Sci.* 60 : 6–10, 2018. (査読有り)
10.1016/j.jevs.2017.10.012

Kikuchi K, Sasaki K, Akizawa H, Tsukahara H, Bai H, Takahashi M, Nambo Y, Hata H, Kawahara M. Identification and expression analysis of cDNA encoding insulin-like growth factor 2 in horses. *J Reprod Dev.* 27:57-64, 2018. (査読有り)
10.1262/jrd.2017-124.

Shikichi M, Iwata K, Ito K, Miyakoshi D, Murase H, Sato F, Korosue K, Nagata S, Nambo Y. Abnormal pregnancies associated with deviation in progesterin and estrogen profiles in late pregnant mares: A diagnostic aid.

Theriogenology. 98:75-81, 2017. (査読有り)

10.1016/j.theriogenology.2017.04.024.

Tangyuenyong S, Nambo Y, Nagaoka K, Tanaka T, Watanabe G. Sensitive radioimmunoassay of total thyroxine (T4) in horses using a simple extraction method. *J Vet Med Sci.* 79:1294-1300, 2017. (査読有り)
10.1292/jvms.17-0133.

Tangyuenyong S, Sato F, Nambo Y, Murase H, Endo Y, Tanaka T, Nagaoka K, Watanabe G. Comparison of physical body growth and metabolic and reproductive endocrine functions between north and south climates of Japan in trained Thoroughbred yearling horses. *J Equine Sci.* 28:77-86, 2017. (査読有り)
10.1294/jes.28.77.

Mizobe F, Nomura M, Kato T, Nambo Y, Yamada K. Signal changes in standing magnetic resonance imaging of osseous injury at the origin of the suspensory ligament in four Thoroughbred racehorses under tiludronic acid treatment. *J Equine Sci.* 28:87-97, 2017. (査読有り)
10.1294/jes.28.87.

Miyakoshi D, Sato F, Murase H, Inoue Y, Shikichi M, Iwata K, Okai K, Ito K, Nambo Y. Foaling rate of mares that were rebred after pregnancy loss in Hidaka, Japan. 28:159-161, 2017. (査読有り)
10.1294/jes.28.159.

Satoh M, Higuchi T, Inoue S, Gotoh T, Murase H, Nambo Y. Factors affecting the prognosis for uterine torsion: the effect of treatment based on measurements of serum progesterone and estradiol concentrations after surgery. *J Equine Sci.* 28:163-167, 2017. (査読有り)
10.1294/jes.28.163.

Haneda S, Nagaoka K, Nambo Y, Kikuchi M, Nakano Y, Li J, Matsui M, Miyake YI, Imakawa K. Expression of uterine lipocalin 2 and its receptor during early- to mid-pregnancy period in mares. *J. Reprod. Dev.* 63: 127-133, 2017. (査読有り)

10.1262/jrd.2016-096.

Kimura Y, Aoki T, Chiba A, Nambo Y. Effects of dystocia on blood gas parameters, acid-base balance and serum lactate concentration in heavy draft newborn foal. J Equine Sci. 28:27-30, 2017. (査読有り) 10.1294/jes.28.27.

妊娠後期に腸管手術を実施したサラブレッドの血中プロジェステロン 佐藤正人、樋口徹、井上哲、後藤忠広、村瀬晴崇、南保泰雄 日獣会誌 70 : 37-43, 2016, 2017. (査読有り)

南保泰雄 繁殖雌馬の卵巣機能調節と制御 日獣会誌 69: 589-596, 2016. (査読有り)

Miki W, Oniyama H, Takeda N, Kimura Y, Haneda S, Matsui M, Taya K, Nambo Y. Effects of a single use of the GnRH analog busserelin on the induction of ovulation and endocrine profiles in heavy draft mares. J. Equine Sci. 27: 149-156, 2016. (査読有り) 10.1294/jes.27.149

Yamada K, Sato F, Hada T, Horiuchi N, Ikeda H, Nishihara K, Sasaki N, Kobayashi Y, Nambo Y. Quantitative evaluation of cervical cord compression by computed tomographic myelography in Thoroughbred foals. J. Equine Sci. 27: 143-148, 2016. (査読有り) 10.1294/jes.27.143

Yamada K, Sato F, Horiuchi N, Higuchi T, Kobayashi Y, Sasaki N, Nambo Y. Autopsy imaging for cardiac tamponade in a Thoroughbred foal. J. Equine Sci. 27: 115-118, 2016. (査読有り) 10.1294/jes.27.115

Kozai K, Tokuyama S, Szóstek AZ, Toishi Y, Tsunoda N, Taya K, Sakatani M, Takahashi M, Nambo Y, Skarzynski DJ, Yamamoto Y, Kimura K, Okuda K. Evidence for a PGF2 α auto-amplification system in the endometrium in mares. Reproduction. 151: 517-526, 2016. (査読有り) 10.1530/REP-15-0617

Aoki T, Kimura Y, Oya A, Chiba A,

Ishii M, Nambo Y. Hematological and biochemical features of postpartum fever in the heavy draft mare. J Equine Sci. 27:13-6, 2016. (査読有り) 10.1294/jes.27.13.

[学会発表](計15件)

村瀬晴崇、Siriwan Tangyuenyong、渡辺元、佐藤文夫、松井朗、羽田哲朗、南保泰雄 ウマ顆粒膜細胞腫に対するAMH診断基準値の設定 日本獣医師会年次大会 2018-2-10 別府国際コンベンションセンター(大分・別府)

村瀬晴崇、Siriwan Tangyuenyong、渡辺元、佐藤文夫、松井朗、羽田哲朗、南保泰雄 ウマ顆粒膜細胞腫に対するAMH診断基準値の設定とその診断精度 北海道獣医師会大会・3学会 2017-9-07 北海道大学(北海道・札幌)

南保泰雄、齊藤朋子、木田克弥 帯広畜産大学馬介在活動室の活動について 平成28年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会(招待講演) 2017-02-24 ホテル金沢(石川・金沢)

南保泰雄 雌馬の生殖機能と疾患 - 牛との相違 平成28年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会(招待講演) 2017-02-24 ホテル金沢(石川・金沢)

土生川佳世、木村優希、羽田真悟、松井基純、南保泰雄 ブルーライトマスクを用いた重鞍馬の春季繁殖移行期における早期排卵誘発 平成28年度十勝獣医師会獣医学術研究発表会 2016-6-3 十勝NOSAI本部(北海道・帯広)

南保泰雄、土生川佳世、木村優希、羽田真悟、松井基純 自動エンザイムイムノアッセイ装置による馬の血中プロジェステロン濃度の測定および黄体機能以外のモニターの有用性について 平成28年度十勝獣医師会獣医学術研究発表会 2016-6-3 十勝NOSAI本部(北海道・帯広)

光明南潮、村瀬晴崇、土生川佳世、渋谷久、安井禎、大滝忠利、津曲茂久、南保泰雄 半去勢片側性潜在精巣において抗ミューラー管ホルモン(AMH)の分泌が亢進する病態の免疫組織化学的検索 第29回日本ウマ科学会学術集会 2016-11-29 東京大学(東京・文京区)

南保泰雄 馬の子宮内膜炎に対する診断・治療法と牛への応用の可能性 第

159 回日本獣医学会学術集会(招待講演)
2016-9-06 日本大学(神奈川・藤沢)

三木 渉、木村優希、南保泰雄、石井三都夫、三宅陽一 重挽馬における胎胞发育变化の特徴 第159回日本獣医学会学術集会 2016-9-06 日本大学(神奈川・藤沢)

土生川佳世、村瀬晴崇、木村優希、渡邊謙一、佐々木基樹、南保泰雄 馬の顆粒膜細胞腫における抗ミューラー管ホルモン(AMH)およびAMH受容体の局在 第159回日本獣医学会学術集会 2016-09-06 日本大学(神奈川・藤沢)

木村優希、羽田真悟、福本奈津子、滄木孝弘、古岡秀文、松井基純、南保泰雄 重挽馬における子宮胎盤厚の月間変動および異常分娩との関連 北海道獣医師会大会・3学会 2016-9-01 大雪クリスタルホール(北海道・旭川)

Kimura Y, Furuoka H, Matsui M, Haneda S, Nambo Y. Measuring the combined thickness of uterus and placenta for evaluation of placentitis in Japanese heavy draft mares. International Congress of Animal Reproduction 2016. 2016-6-26. Tours (France).

KIMURA Y, FURUOKA H, TAKAHASHI H, MATSUI M, HANEDA S, AOKI T, and NAMBO Y. The utility of measuring the combined thickness of uterus and placenta for evaluation of placentitis in the Japanese heavy draft horse. The 7th Joint Symposium of Veterinary Research among Universities of Veterinary Medicine in East Asia (国際学会) 2016年2月21日~2月22日 Green World Hotel, Tam Dao National Park, Vietnam.

南保泰雄 生産地で応用可能な馬の繁殖性向上技術に関する研究 日本ウマ科学会学術集会(招待講演) 2015年11月30日~12月01日 東京大学(東京・文京区)

木村優希、滄木孝弘、高橋啓人、羽田真悟、古岡秀文、松井基純、南保泰雄 妊娠馬における胎盤炎評価のための子宮胎盤厚測定の有用性 重挽馬の標準値作成について 北海道獣医師会・3学会 2015年9月12日 酪農学園大学(北海道・江別

市)

〔図書〕(計5件)

南保泰雄 軽種馬の生殖器系と生殖器疾患 その3 発情・排卵誘発 B T C ニュース 108号 3-5, 2017.

南保泰雄 軽種馬の生殖器系と生殖器疾患 その2 発情と交配適期 B T C ニュース 107号 15-18, 2017.

南保泰雄 軽種馬の生殖器系と生殖器疾患 その1 牝馬の生殖器の構造と機能 B T C ニュース 106号 8-11, 2017.

南保泰雄 獣医学教育改革における馬臨床教育に関する模索 獣医畜産新報(文永堂出版) 70(1), 29-34, 2017.

南保泰雄 馬を専門としない獣医師のための馬繁殖検査 臨床獣医(緑書房) 34(3) 17-21, 2016.

〔その他〕

特色ある研究の紹介

<http://www.obihiro.ac.jp/focus/focus2.html>

障がい者乗用馬ならびに在来馬の生産法確立事業

<http://www.clione.ne.jp/~sample/tikudai-uma/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南保 泰雄 (NAMBO, Yasuo) 帯広畜産大学・グローバルアグロメディシン研究センター・教授

研究者番号: 20731623

(2) 研究分担者

羽田 真悟 (HANEDA, Shingo) 帯広畜産大学・臨床獣医学分野・准教授

研究者番号: 40553441

滄木 孝弘 (AOKI, Takahiro) 帯広畜産大学・グローバルアグロメディシン研究センター・助教

研究者番号: 40624721

(3) 研究協力者

佐藤 文夫 (SATO, Fumio)

村瀬 晴崇 (MURASE, Harutaka)

木村 優希 (KIMURA, Yuki)