

多機能超音波画像診断によるセラピーホース
に適した馬の妊娠および胎子検査

令和5年
(2023)

帯広畜産大学大学院畜産学研究科
獣医学専攻博士課程
高遠之

Multifunctional ultrasound examination of
pregnancy mare and fetal in pony for Equine-
Assisted Therapy

2023

GAO Yuanzhi

Doctoral Program of Veterinary Science
Graduate School of
Animal and Veterinary Sciences and Agriculture
Obihiro University of
Agriculture and Veterinary Medicine

略 語 説 明

SCN ; Suprachiasmatic nucleus (視交叉上核)

GnRH ; Gonadotropin releasing hormone (ゴナドトロピン放出ホルモン)

ART ; Assisted reproductive technology (繁殖補助技術)

ET ; Embryo transfer (受精卵移植)

PMAP ; Piezo micromanipulator-assisted puncture (ピエゾマイクロマニピュ
レーター穿孔法)

LAP ; Laser-assisted puncture (レーザー穿孔法)

BSE ; Breeding soundness evaluation (繁殖健全性評価)

IV ; Index of vascularization (血管形成指数)

RI ; Resistance index (抵抗係数)

PI ; Pulsatility index (拍動係数)

PSF ; Peak systolic frequency shift (収縮期最大周波数シフト)

MF ; Minimum frequency shift (拡張末期周波数シフト)

TAMF ; Time-averaged maximum frequency shift (時間平均最大周波数シフ
ト)

FGR ; Fetal growth restriction (胎子発育不全)

FEO ; Fetal eye orbit (胎子眼窩径)

CTUP ; Combined thickness of the uterus and placenta (子宮胎盤厚)

FGL ; Fetal gonad length (胎子性腺径)

FKL ; Fetal kidney length (胎子腎臓径)

FHR ; Fetal heart rate (胎子心拍)

P₄ ; Progesterone (プロゲステロン)

E₂ ; Estradiol (エストラジオール)

EIA ; Enzyme Immunoassay (エンザイムイムノアッセイ)

目次

緒論	7
1.1 北海道和種馬について	1
1.2 馬の繁殖特徴について	2
1.3 馬の繁殖補助技術(ART)	3
1.4 超音波診断について	4
1.4.1 発情周期中の超音波検査	4
1.4.2 妊娠中の超音波検査	5
1.5 妊娠馬血中ホルモンについて	6
1.6 研究目的	6
1.7 図表	7
第1章	10
北海道和種馬および交雑種の超音波診断装置による妊娠全期間胎子検査指標	10
2.1 背景	11
2.2 材料と方法	12
2.2.1 実験動物	12
2.2.2 超音波検査	12
2.2.3 胎子指標	13
2.2.3.1 FEO	13
2.2.3.2 CTUP	13
2.2.3.3 FGL	13
2.2.3.4 FKL	13
2.2.3.5 FHR	13
2.2.4 胎子指標検出率	14
2.2.5 血液検査	14
2.2.6 データ分析	14
2.3 結果	14
2.3.1 胎子健康指標	14
2.3.2 妊娠馬血中ホルモン	15
2.4 考察	15
2.5 まとめ	17
2.6 図表	18

第2章	23
3D超音波を用いた妊娠早期の胎子性別判断法	23
3.1 背景	24
3.2 材料と方法	25
3.2.1 妊娠馬および飼養管理	25
3.2.2 胎子の性別判断手順	25
3.2.3 胎子性別判断基準	25
3.3 結果	26
3.4 考察	26
3.5 まとめ	28
3.6 図表	29
第3章	33
超音波胎子健康検査および母体血中ホルモン測定を用いて妊娠異常の早期発見の1例	33
4.1 背景	34
4.2 症例紹介	34
4.2.1 妊娠馬	34
4.2.2 飼養管理	35
4.2.3 胎子超音波およびホルモン検査	35
4.2.4 経過	35
4.3 考察	36
4.4 まとめ	38
4.5 図表	39
総括	45
謝辞	47
Abstract	49
参考文献	53

緒論

1.1 北海道和種馬について

在来馬とは在来種の馬を意味する用語であり、生物学的には「在来種」とはもともとある地域にいる生物をいい、それに対して「外来種」とは外から持ち込まれた生きものを意味する[1]、と定義されている。

北海道和種馬、木曾馬、御崎馬、対州馬、野間馬、トカラ馬、宮古馬および与那国馬は日本に存在する8種の在来馬である。北海道和種馬は15世紀から北海道へ渡来したことが知られている。日本在来馬の中で飼養頭数が最も多く、従来輸送業務、農作業や駄載業務を務めていた北海道和種馬でも、近年機械や車両の使用により飼養頭数は年々減少する傾向が見られている[1]。公益社団法人日本馬事協会（以下馬事協会として略称）の統計により昭和50年（1975年）の北海道和種馬の飼養頭数は1337頭であり、その後平成6年（1994年）には一時2928頭まで増加していたが、その後飼養頭数は減少の一途をたどっている。令和3年（2021年）の飼養頭数は記録がある46年間で最も少ない954頭となり、1994年のデータと比べおよそ3分の2まで減少した[2]。

馬事協会のデータによると、北海道和種馬(fig1-1)の体高は雄馬で120~130cm、雌馬では123~130cmであり、馬事協会登録規程では、北海道和種馬の毛色として14種類が定められている。また、日本にいる在来馬の多くは側対歩をしていたといわれる。北海道和種馬は側対歩の遺伝子を残しており、多くの馬は側対歩が可能となる[3]。それらの理由に加えて北海道和種馬はサラブレッドなどの競走馬と比べ、おとなしい性格を持ち、人とのコミュニケーションしやすい優れた点があるため、現代においては一般市民や障がい者の方の乗用馬として新たな利活用が模索されている[1]。

ホースセラピー（または乗馬療法、馬介在療法）は馬とのふれあい、騎乗の行為により身体的、精神的疾患を改善する動物介在療法の1つである(fig1-2)。1950年、ホースセラピーは既にドイツ、オーストリア、スイスで広く普及しており、この療法が身体障がい者のために使われていた。この20年間で、ホースセラピーは心理療法を含むように改善された[4]。近年日本においてホースセラピーも優れた治療法の1つとして段々注目を浴びている。今までの報告では、ホースセラピーは子供から年上者[5]まで有効であり、また脳性麻痺[6-8]や多発性硬化症[9]によるバランス神経損傷、注意欠陥多動性障害[10]などの身体的障がいおよび知的障害[11]、自閉症[12,13]などの精神疾患にも症状の改善効果が認められている。

馬は人より体格が大きく、仲間思いの動物であり、精神疾患を持つ人は馬と共に課題に取り組むことでより多くの自信、自尊心を得ることができる。また、乗馬をすることによって、馬上の揺れにより、腰の筋肉や体のバランス機能を回復することができる[14]。今ではホースセラピーの需要はかつてないほど急速に高

まっている。

これらの現状を踏まえると、北海道和種馬は、体格は小さく、おとなしい性格を持ち、また人に優しく接している点から考えると、現在最もホースセラピーに適している馬種である。また北海道和種馬以外の日本在来馬は更に保有頭数が少なく、近年絶滅危惧種になりつつある。種の多様性を保つため、北海道和種馬の繁殖知見を活かし、将来他の日本在来馬への応用が求められる。そのため、ホースセラピーや種の保存の需要を満たす為に、北海道和種馬を含む日本在来馬の生産性向上および飼養頭数の増加は必要不可欠と考えられる。

1.2 馬の繁殖特徴について

馬は長日繁殖動物である。北半球では、通常馬の繁殖期は4月から11月、またポニー馬の繁殖期は5月から10月である[15]。繁殖期以外の期間は非繁殖期と言われる (fig1-3)。この期間ではおよそ80%以上の馬の繁殖周期は停滞しており、発情や排卵が行われなくなる。繁殖移行期では、馬の卵巣は平均1から3の無排卵性卵胞波を発生する。この期間の卵胞は成長、静止と退行を繰り返す[16]。

メラトニンとは、ほぼすべての生物に日周情報や季節情報を伝達する重要な役割を持つホルモンである。メラトニンの濃度は、暗期が最も高くなる。また、夜や暗期が長くなると、メラトニン濃度が上昇する期間も延長する[17]。メラトニンの分泌を調節するメカニズムとして、視床下部前部のSCNが鍵となっている[18]。光の情報は馬の目を通じて網膜神経節細胞に伝達され、網膜視床下部路を通じてSCNに送られ、その後松果体に到達し、メラトニンの分泌を抑制する。また、メラトニンは、季節繁殖を行う哺乳類の年1回の繁殖サイクルの調節に重要な役割を果たしている。メラトニンの分泌量が減少すると、GnRHの分泌量が増加し、最終的に発情期を早めることができる。したがって、馬において冬季無発情期のメラトニンの分泌をいかに効果的に抑制することは、来年初回排卵を早める要である。

光周期 (photoperiod) のコントロールはヒトおよび動物のメラトニンを調節する重要な方法である。Gintherらの研究では[19]、北半球で12月12日から15L/9D (1日中15時間連続光処理、9時間暗処理) の長日処理 (lightning program) プログラム (fig1-4)を開始すると、雌馬の冬季無発情期を大幅に短縮することができた。また、長日処理のコストを最小化するために、他の長日処理も検討された。まず、研究結果で示されたように、11月1日から或いは12月1日から長日処理を開始しても、ほぼ同じ無発情期短縮効果が得られた。そして、冬の無発情期を短縮する効果を得るためには、少なくとも6週間の長日処理が必要と考えられた。15L/9Dの長日処理プラン以外、固定パルス (fixed pulse, 自

然日長+午前4時から1時間のパルス光処理)方式は、15L/9Dプランと同じ効果であった。この結果から、雌馬の卵巢成熟を促進するためには、12月1日から雌馬に1時間の固定光パルスを照射する方法が冬の無発情期を短縮する効果がある中で最もコスト削減につながる可能性の高い方法であることが判明した。

一方、近年馬の初回排卵を早めるための処置として、ブルーライトマスク(fig1-5)を用いたライトコントロールに関する研究が多く発表されている。人間や馬などの動物の研究では、単色光は自然光や白色光と同様の効果があるとされている。馬の場合、メラトニンの分泌を抑制する効果は、ヒトと同様、波長範囲430~560nmの単色光が最も高いとされている。Walshら[20]の研究では、メラトニン抑制効果について、光治療の強度、片目と両目のブルーライトアイマスクを用いて比較検討した。自然光と3ルクス、10ルクス、50ルクスおよび100ルクスのブルーライトを浴びた供試馬と、片目と両目のブルーライト処理をした供試馬のメラトニン濃度を比較した。その結果、50ルクスと100ルクスのブルーライトは、同じようにメラトニン濃度を抑制する能力があることが判明した。また、片目と両目のブルーライト処理群の間にメラトニン濃度の有意な差は見られなかった。この結果から、50ルクスの単眼ブルーライトマスクによる治療が、雌馬のメラトニン抑制に最も適している方法であると結論づけた。

光周期による長日処理以外もGuerinらの研究では、冬の最低および最高気温は馬初回排卵を早める重要な原因として考えている。Guerinらの報告では理論上は年間平均最低気温が1°C上昇すると、平均して初回排卵日を約9日早めることが判明した[21]。また、馬の栄養なども初回排卵の時間に影響を与えると考えている。

1.3 馬の繁殖補助技術(ART)

受精卵移植(ET)は従来、高齢馬や妊娠率の低い馬によく使用される[22]。近年、馬の品種改良、遺伝子の保存などの用途にも使用されている[23,24]。馬は1年1産の非常に繁殖効率が低い動物である。また、馬にとって過剰排卵処置の結果は好ましくないため[25]、受精卵移植による最大の利点は、本来1年に1頭しか産まれない優秀な馬が、受精卵移植により1年に複数頭生産することが可能となることである。馬の受精卵移植は1972年に初めて報告された[26]。日本においても、1992年に15頭の馬受精卵移植が実施され、翌年6頭(40%)の馬が生産され、世界初の受精卵移植による生産馬として発表された[27]。ところが、日本において受精卵移植は馬生産への応用がまだ普及されていない。2019年Hannanら[28]は初めて日本で北海道和種馬において人工授精後の受精卵移植により子馬が産まれた成功例を報告した。その報告によると、凍結精液を用いてドナーへ子宮角深部人工授精7日後の受精卵回収率(67%)および新鮮受精卵

をレシピエントへ移植後の妊娠率（100%）は共に高い結果を示している。

新鮮受精卵の移植の欠点は実行可能な範囲がドナーのいる地域に限定されてしまうことである。そのため、受精卵回収後の凍結保存はドナーの地域問題を解決する方法として期待されている。馬の受精卵は非常に繊細なものである。受精卵を凍結保存する際に、1つ解決しなければならない問題は直径 300 μ m 以上の受精卵の凍結保存法の検討である。受精卵の凍結の際、氷の形成による細胞間構造の機械的破壊はその後の受精卵妊娠率を下げる要因である[29,30]。そこで、高濃度の凍結保護剤水溶液を極低温まで過冷却させるという方法がある。十分に低い温度では、これらの溶液は粘性が高くなり、氷を形成することなく固化する（このプロセスはガラス化と呼ばれている）。1985年、マウスにおいて受精卵のガラス化保存は初めて報告された[31]。一方、馬では、直径 300 μ m 以下の受精卵は胚盤腔を穿刺しなくても、許容できる妊娠率（50～65%）を保てるが[32]、300 μ m 以上の受精卵は胚盤腔を穿刺しない限り、移植後は極めて低い妊娠率であった。そこで、Reza ら[33]は PMAP および LAP 法を用いて 300 μ m 以上の大きい受精卵のカプセルと絨毛層に穴を開け、凍結保存した。保存した受精卵をレシピエントに移植し、レシピエントの妊娠率を調べた。結果、PMAP および LAP 法は直径 300～700 μ m の受精卵の凍結保存に有用であることを証明した。700 μ m 以上の受精卵の凍結保存法に関してはさらなる検討が必要と考えられる。

最新の研究では[34]、日本において馬の受精卵の遠距離輸送を実現させた報告もあった。馬の受精卵移植技術の普及により、将来的に馬の生産性の向上や種の保存により一層活用できることが期待できる。

1.4 超音波診断について

1.4.1 発情周期中の超音波検査

近年、超音波診断法は馬の繁殖に広く使用されている馬の BSE の重要なツールの 1 つである[35]。超音波検査は様々な方面で応用されている(fig1-6)。繁殖期において繁殖牝馬の卵巢および子宮の評価は最も重要な応用である。馬の発情周期は平均 21 日で、およそ 1 週間の卵胞期と 2 週間の黄体期に分けられる。卵胞期について、主席卵胞の形態学の評価は排卵予測につながる。また黄体期において超音波画像診断装置による黄体機能評価は繁殖牝馬の繁殖能力評価の指標の 1 つである[36]。黄体は、妊娠の成立と維持に不可欠な P₄ を分泌する内分泌腺である。妊娠しない場合、黄体は退行し、雌馬は発情前期（卵胞期）に戻る。黄体は黄体細胞（ホルモン産生細胞：大、小黄体細胞）、内皮細胞、肥大化した線維芽細胞およびマクロファージと白血球から成る[37]。黄体の形成についてはまだ明らかにされていないが、黄体細胞は排卵前の卵胞顆粒細胞および莢膜外層細胞から成る説があった[38]。馬の黄体はキノコまたはひょうたん型と

いわれる。また黄体は卵巣内にあるため、触診することが困難である。そのため、超音波診断は馬黄体を確認する重要な方法と考えられる。血管生成は黄体の一番の特徴である。卵巣動脈から黄体内に流れた血流は馬の繁殖性能を表している。Ferreira ら[39]の研究では、受精卵移植時のドップラー機能下の黄体血管面積と血中 P₄ 濃度に相関が見られた。また Panzani ら[40]の研究では、無排卵期前の馬の排卵 14 日までの血管形成指数 (IV=黄体血流面積/黄体断面面積) から、血中 P₄ 濃度が 1 ng/mL 以上の判断指標として提唱した。

子宮内膜炎は、繁殖牝馬の不妊症の最も重要な原因の 1 つである[41]。子宮体液の貯留、子宮内膜の浮腫のグレードなどの指標は子宮内膜炎診断の根拠の 1 つである。また最近の研究では、ドップラー超音波検査から子宮内膜炎群では、子宮動脈血流速度の増加およびドップラー係数 (RI、PI) の下降が報告された[42]。

1.4.2 妊娠中の超音波検査

馬の妊娠期間は約 11 ヶ月と長い動物である。馬の双胎は非感染性流産を起こす原因の 1 つであるため[43]、原則馬は 1 年 1 産の動物となる。長い妊娠期間の中、数多の原因で妊娠異常を起こす可能性がある。妊娠中の馬の超音波検査は馬妊娠損失を抑える有用な方法と考えられる。ところが、馬妊娠中超音波検査はまだ普及されてない。

1996 年 Reef ら[44]は初めて妊娠後期胎子健康検査法を確立した。これまで、妊娠全期間の胎子指標については、多くの研究の蓄積がある[45–48]。馬の胎子検査法は妊娠時期によって難易度や診断意義が異なるものとなる。妊娠前期 (胎齢 35~200 d) は経直腸検査が主な検査ツールである。妊娠中期および後期 (胎齢 200d~分娩) は主に経腹壁検査並びに経直腸検査により胎子検査を行う。子宮胎盤厚、胎子心拍、胎子眼窩径、胎子大動脈径、胎子腎臓および胎子性腺径は最も胎子健康診断に使用された指標であった。

胎子健康指標以外、妊娠中の妊娠馬子宮動脈血流指標も胎子モニタリングする重要な指標として考えられる[49]。RI および PI は最も使用される血流評価指標である (fig1-7)。2 つの係数はそれぞれ PSF、MF、TAMF により算出される ($RI=(PSF-MF)/PSF$ 、 $PI=(PSF-MF)/TAMF$) [50]。PI の上限はないが、RI の範囲は 0~1 である。血管抵抗係数が高ければ高いほど血管抵抗が高く、血流速度が遅いことを表している。妊娠中の母体から子宮経由での胎子への血液供給は胎子発育の過程で非常な要素である。不十分な血液供給が最終的に胎子発育不全 (FGR) に繋がることになる[51]。そのため、妊娠中の子宮動脈血管抵抗の測定は胎子健康モニタリングの重要な一環である。また、妊娠中の血管波形も重要な指標の 1 つである[52]。ヒトでは妊娠中妊婦子宮動脈拡張期切痕 (diastolic

notch) は子癩前症の診断指標として使用される[53,54]。

その他、2D および 3D 超音波検査を用いた馬妊娠中胎子性別判断法も近年注目されている。妊娠の前期、中期および後期のそれぞれの胎子性別判断法が報告された。2D および 3D 妊娠前期の胎子生殖器突起判断法[55,56]、妊娠中期の胎子外性器の検出法[56,57]および妊娠後期の胎子性腺判断法[58]の報告は妊娠全期間馬胎子性別判断法を充実させ、性別判断の精度を更に向上させた。

1.5 妊娠馬血中ホルモンについて

馬の妊娠は 11 ヶ月ほどと長く、また複雑な過程である。馬の妊娠の維持には様々なホルモンが連携して機能する必要がある。そのうちステロイドホルモンは馬の妊娠に対して最も重要なホルモンと思われる[59]。ウシと同じように妊娠早期の妊娠馬の黄体から分泌する P_4 は妊娠維持に重要なホルモンである[60]。妊娠馬 P_4 濃度は排卵直後に初回のピークを迎え、その後妊娠 6 週から第 2 ピークに到達する。その後妊娠 26 週目まで徐々に下降する[46]。また、エストロゲンは妊娠維持のための重要なホルモンである[59]。妊娠期間中、馬のエストロゲンは妊娠前期では低い値を保っているが、妊娠中期には高値に上昇する。その後、分娩前に徐々に下降する。馬の妊娠維持の役割は、妊娠前期では妊娠馬黄体由来の P_4 、妊娠中期および後期では胎子および胎盤によるエストロゲンが担っている。妊娠中のホルモン検査は胎子の健康状態モニタリングおよび流産防止に重要と思われる。

1.6 研究目的

北海道和種馬において繁殖に関する知見はいまだ少ない。特に北海道和種馬に適した繁殖検査診断法はまだ確立されていない。そのため、本研究では、超音波診断装置並びに血中ホルモン測定装置を用いて、以下の内容を研究の目的とした。

1. 北海道和種馬における妊娠全期間の胎子指標の正常範囲の解明
2. 北海道和種馬における妊娠全期間健康母体血中 P_4 および E_2 濃度の測定
3. 3D 超音波を用いた妊娠早期胎子性別判断の方法の確立
4. 超音波画像診断胎子検査法および母体血中ホルモン測定を用いた妊娠異常の早期発見

1.7 図表

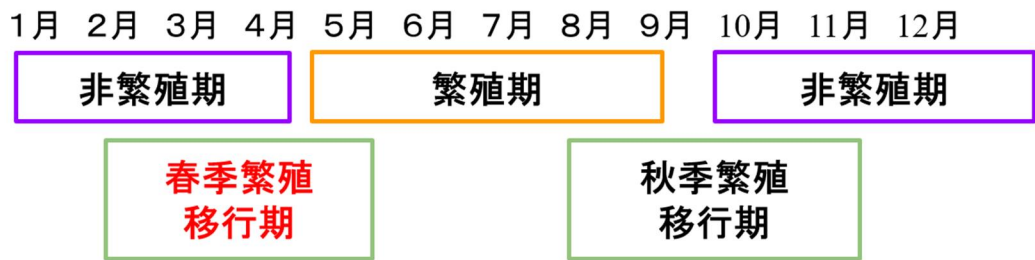


Fig1-1 Hokkaido native pony



Fig1-2 Horse-Assisted Therapy in Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

<https://www.obihiro.ac.jp/facility/fcasa/contribute>



JRA育成牧場管理指針 生産編より

Fig1-3 The reproductive season of horses during the year



Fig1-4 15L/9D lightning program: L represents light phase, D represents dark phase.



Fig1-5 Single eye lightning blue mask used on Hokkaido Native Pony

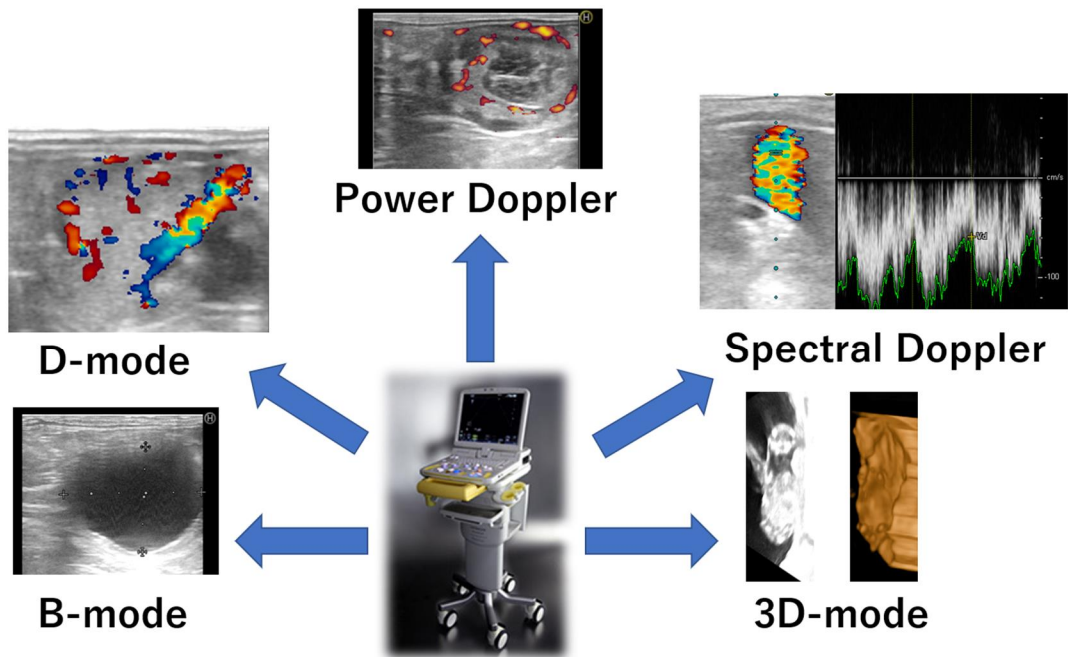


Fig1-6 The use of multifunctional ultrasonic diagnostic devices in equine reproduction.

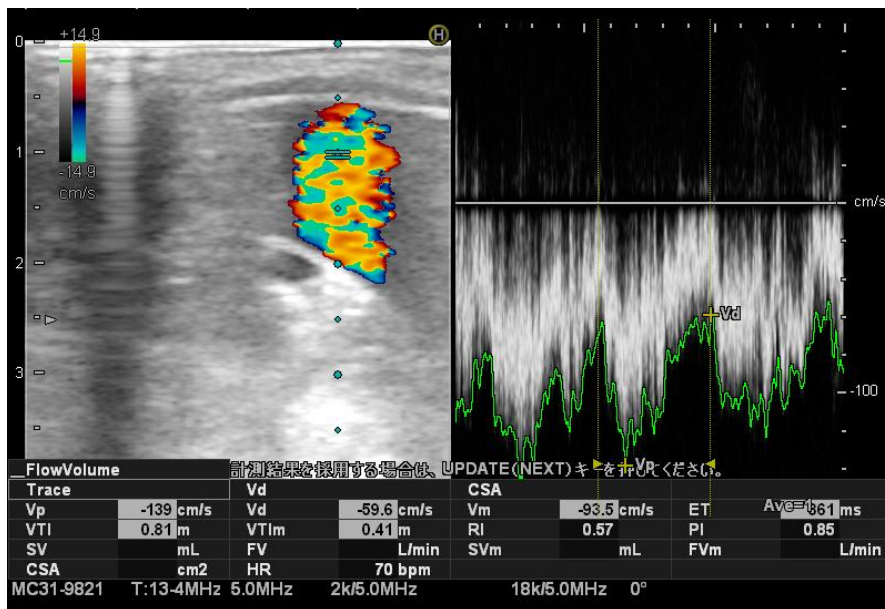


Fig1-7 Measurement of uterine artery blood flow velocity in pregnant mares using pulse mode.

第 1 章

北海道和種馬および交雑種の超音波診断装置による妊娠 全期間胎子検査指標

2.1 背景

馬の流産は馬産業の大きな脅威の 1 つである。超音波胎児検査は妊娠中の流産兆候の早期発見を可能とする。1996 年 Reef ら[44]は初めて妊娠後期胎児健康検査法を確立した。ヒト医学の胎児健康診断法を真似し、胎児心拍、大動脈径、胎児活動レベル、子宮胎盤厚、子宮胎盤接触と胎児液最大深度の 6 つのパラメータを馬の妊娠異常の判断基準として使用した。パラメータごとに 0~2 点がつけられる。トータル点数が低くなることで流産のリスクが高いことを示唆している。その後、2019 年 Vincze ら[48]は Reef らの胎児健康検査法を更に簡略化し、胎児心拍、大動脈径および子宮胎盤厚の 3 つのパラメータに絞られた。Vincze らが、Reef らの検査法と新しい検査法を比較した結果、それぞれ 82.95%と 86.82%の高い精度を得られた。

Reef らの胎児健康検査は妊娠後期に絞られたが、流産は妊娠のどの段階でも発生する可能性がある。Bucca ら[45]は Reef らの胎児健康検査法の内容を更に拡張し、研究を行った。Reef らの検査法以外にも胎児呼吸、胎児気管、胎児眼窩、胃、胎児性腺、胎児腎臓のパラメータの有用性を検討した。検査時期も妊娠後期から妊娠中期および後期に伸ばした。

2014 年、妊娠全期間サラブレッドにおける胎児健康診断は Murase ら[47]の研究で行われた。この研究は初めて妊娠全期間に渡る胎児のパラメータを評価した研究であった。各胎児指標は妊娠期間中の検査可能な時期が明らかになった。

超音波胎児健康検査法と同様に、妊娠馬血中ホルモン濃度測定も有用な流産早期発見の方法である。Shikichi ら[61]の研究では、妊娠 200 から 320 日の間、妊娠異常時の妊娠馬血中 P_4 値が有意に高く、エストロゲン濃度は有意に低下する傾向が見られた。馬におけるホルモン濃度異常のカットオフ値を求めることは、胎児健康診断や流産予防に非常に重要である。

胎児超音波検査法および妊娠馬血中ホルモン測定法は胎児健康診断における有用なツールと考えられる。ところが、前文にも紹介したように、ホースセラピーに適している北海道和種馬などの日本在来馬の胎児パラメータや妊娠馬ホルモンに関する知見はまだ報告されていない。北海道和種馬を含む日本在来馬の生産性向上および種の保存のため、本研究では北海道和種馬およびその交雑種を用いて妊娠正常の胎児妊娠全期間健康指標を調べる；妊娠全期間妊娠馬血中 P_4 および E_2 濃度を測定し、妊娠中正常なホルモン変化を調べる。

2.2 材料と方法

2.2.1 実験動物

2018年から2020年にかけて、帯広畜産大学で飼養された北海道和種馬およびその交雑種5頭を供試馬とした。5頭中3頭は北海道和種馬、2頭は北海道和種馬とハフリンガーの交雑種であった。試験期間中供試馬5頭はのべ7回妊娠した。すべての妊娠は人工授精およびその後の受精卵移植により受胎した。供試馬の平均年齢は 8 ± 2 (\pm SD) 歳であった。すべての妊娠は正常とみなし、平均妊娠期間は 341 ± 8 日(範囲: 332~359日)であった。

すべての供試馬は妊娠中帯広畜産大学のパドック内で飼養された(fig2-1)。馬は自由に水を飲むことができる。一日中 10kg 乾草および 500 g 混合飼料(Stamm 30; Hallway Feeds, Lexington, KY, USA)と 10 g アルファルファキューブを与えられた。妊娠中供試馬のボディーコンディションは 5~6 で保っている。

2.2.2 超音波検査

胎子検査は経直腸および経腹壁2つのツールがあり、それぞれ 7.5-MHz リニア型のプローブ(Noblus, Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan)と 5-MHz コンベックス型プローブ(Noblus, Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan)を使用した(fig2-2)。経直腸胎子検査の手順として、初めにリニア型プローブを直腸検査ビニール手袋内に入れ、エコージェリーをプローブ表面に十分に塗布し、プローブと手袋間の空気を手で抜く。その後、術者の左手に直腸検査ビニール手袋を腕まで被せ、ローションやボディーソープを手袋に十分に塗り、その後手を馬の直腸内に入れる。入れた後、直腸内のフンを出来るだけ外に出す。フンをすべて出したらリニア型プローブを直腸内に入れ、検査を始める。経腹壁胎子検査の手順として、初めに妊娠馬の腹部を毛刈りする必要がある。目安として、妊娠馬の乳腺から胸腔の肋骨まで広範囲の毛刈りを推奨する。毛刈り後、妊娠馬腹部の検査範囲にアルコールスプレーをかけ、コンベックスプローブの上にエコージェリーを塗る。胎子検査は妊娠馬乳腺から妊娠馬の肋骨までの腹中線に沿ってプローブを動かす、その区間内に胎子をスキャンする(fig2-3)。

胎子超音波検査は受精卵移植の日から分娩後1週まで週1回行った。検査する時、馬は柵場の中に保定した。馬のストレスを解消するために、検査中馬の前に乾草を置いた。検査中妊娠馬の鎮静は行わなかった。検査時間は経直腸検査15分以内、経腹壁検査15分以内、またトータル時間30分以内として設定した。胎子検査する際に最低2人の術者が必要になる。1人は超音波検査機器操作担当、もう1人は検査担当であった。検査後、事後分析のため、検査中に得られた超音波データはすべてUSBを経由し、パソコンに移した。

2.2.3 胎子指標

2.2.3.1 FEO

経直腸検査により測定可能であった。検査する際に直腸検査により胎子の頭を確認し、次にリニア型プローブを胎子の頭上に配置する。リニア型プローブを胎子頭部表面の端から端までスキャンし、胎子の眼窩は円い低エコー像として描出される。眼窩内水晶体は、エコー像では眼窩より更に小さい円形のリングである。眼窩の長径と短径は水晶体を映す時に測定する。胎子の眼窩サイズは長径と短径の平均値になる(fig2-4 A)。

2.2.3.2 CTUP

経直腸検査により測定可能であった。検査する際にリニア型プローブを妊娠馬膀胱と羊膜の間に置き、その後プローブを移動し、子宮頸管胎盤接合部を探す。胎子の体に影響のない部位にて任意で三回厚さの測定をする。結果の平均値はCTUP 値とする(fig2-4 B)。

2.2.3.3 FGL

経直腸および経腹壁検査により測定可能。検査する際には、初めに胎子の胴体を確認し、その後胎子心臓をランドマークとして胸腔を確認する。次に胎子の下半身に移動し、豆状の低エコー像として確認される胃を腹腔のランドマークとした。胎子胃から尾部の間に性腺があり、エコー像上均一な楕円形の中エコー像であった。胎子性腺の長径と短径を測定し、その平均値は胎子性腺径とした(fig2-4 C)。

2.2.3.4 FKL

経腹壁検査により測定可能。検査する際に胎子性腺と同じ手順で、胎子性腺より胎子の背側に配置する。エコー像上は高エコーと低エコーを混合した像であった。胎子腎臓の長径と短径を測定し、その平均値は胎子腎臓径とした(fig2-4 D)。

2.2.3.5 FHR

経直腸および経腹壁検査により測定可能。主に胎子心臓および胎子臍帯から測定出来る。測定時胎子の血管或いは心臓にドップラーをかけ、血流を確認する。その後パワードップラー機能を用いて、安静時の胎子心拍を測定する(fig2-4 E)。検査内に3回心拍を測定し、その中の最も低い数値を胎子心拍として記録した。

2.2.4 胎子指標検出率

本研究では、妊娠全期間に渡り各胎子指標の検査可能な時間を記録した。検査可能は検出率 50%以上として設定した。

2.2.5 血液検査

供試馬に対して、妊娠前の週から分娩後の 1 週目まで週 1 回採血を行った。採血の際に 10mL ヘパリン入り真空採血管を用いて頸静脈から血液採取した。採取された血液は実験室に移動するまで 0~4℃で保管した。実験室で血液を 1500 g X 15 min 遠心した。遠心後、上清を取り、-30℃の冷蔵庫に測定するまで保管した。

ホルモン測定時、冷凍した血漿サンプルを自然解凍し、解凍後 EIA 法により (AIA360, Tosoh Bioscience, Tokyo, Japan)血漿中 E₂ (ST AIA-PACK iE2; Tosoh Bioscience, Inc., San Francisco, CA, USA) および P₄ (ST AIA-PACK PROG III; Tosoh Bioscience, Inc.)濃度を測定した(fig2-5)。

2.2.6 データ分析

すべての結果は、平均値±平均値の標準誤差 (SEM) で表していた。データ解析は、一元配置分散分析に続いて多重比較のための Tukey's HSD テスト、相関分析は Pearson の積率相関、回帰分析を利用し、回帰曲線を作成した。統計解析は、RStudio ver. 1.4.1103.を使用した。有意性は P<0.05 として設定した。

2.3 結果

2.3.1 胎子健康指標

FEO は妊娠 10 週から分娩まで測定可能であった。検査期間中、リニア型プローブにより経直腸検査のみ測定可能であった(fig2-6 A)。FEO は妊娠 10 週の 2.7mm から分娩前の 36.1±1.8mm まで成長した。FEO は妊娠日齢と強い相関 (r=0.96, P<0.001)を示した。最も FEO に適した回帰方程式は $y = -0.0185 x^2 + 1.8479 x - 12.2512$, ($r^2=0.98$) であった。

CTUP は妊娠 13 週から分娩まで測定可能であった(fig2-6 B)。CTUP は妊娠 13 週の 2.7mm から分娩前の 8.6±0.2mm まで成長した。妊娠 15 週から 32 週の間、有意な変化は見られなかった。CTUP は妊娠日齢と強い相関 (r=0.96, P<0.001)を示した。線性回帰式 $y = 0.1428 x + 0.2129$, ($r^2=0.92$) は最も CTUP の変化に一致した。

FGL は妊娠 14 週から分娩まで測定可能であった(fig2-6 C)。妊娠 14 週から FGL は妊娠日齢と共に上昇した。妊娠 32 から 37 週までピークに保ち、その後妊娠日齢と共に下降した。妊娠後期の検出率は低下する傾向が見られた。妊娠 35 週までは経直腸検査により測定可能でしたが、妊娠 35 週後から経腹壁検査

のみ検査可能であった。

FKL は妊娠 30 週から経腹壁検査のみ測定できた(fig2-6 D)。分娩まで測定可能であったが、胎齢と共に検出率が下降している。FKL も妊娠日齢と強い相関($r=0.85$, $P<0.001$)を示した。妊娠 42 週から分娩までは有意な変化は見られない。FKL は妊娠 30 週の 33.8mm から分娩前の 70.7mm まで増加した。

FHR は妊娠 35 日から分娩まで測定可能であった(fig2-6 E)。妊娠 35 日から妊娠 9 週まで上昇し、平均値 179.7 ± 6.4 bpm まで上昇した。妊娠 11 週から、胎齢と共に下降した。分娩前胎子心拍は平均 70.8 ± 2.9 bpm であった。

妊娠全期間の各胎子指標の検出率は以下にまとめた(fig2-7)。

2.3.2 妊娠馬血中ホルモン

妊娠全期間、妊娠馬血中 P_4 (fig2-8)および E_2 濃度(fig2-9)変化はグラフの示した通りであった。 P_4 濃度は妊娠 5 週まで平均 11 ± 0.9 ng/ml の濃度で保っていた。妊娠 6 週目から P_4 濃度が上昇した。その後、妊娠 10 週から 14 週までピークに到達した。妊娠 15 週から P_4 濃度が下降した。妊娠 23 週から 30 週の期間 P_4 濃度は 10 ng/ml 以下であった。更に、妊娠 31 週から 45 週の期間 P_4 濃度は 5 ng/ml 以下で保っていた。妊娠 46 週から P_4 濃度は急激な上昇が見られた。分娩前は第 2 ピークに到達し、分娩後には 1 ng/ml 以下まで下降した。

E_2 濃度は妊娠 20 週までは低い濃度 (<50 pg/ml) で保っていた。その後、 E_2 濃度は妊娠 39 週まで上昇し、ピークの 246.6 ± 24.7 pg/ml 濃度に到達した。その後、妊娠 44 週から、 E_2 濃度の下降が見られた。妊娠 49 週に一時上昇が見られ、その後、分娩前に 104.6 ± 11.9 pg/ml まで下降し、更に分娩後 53.2 ± 6.9 pg/ml まで下降した。また、 E_2 濃度と胎子性腺径に強い相関($r=0.72$, $P<0.001$)が見られた。

2.4 考察

本研究では、ポニー馬の妊娠全期間の胎子健康指標 : FHR、FEO、FGL、FKL および CTUP、また妊娠馬全期間血中 P_4 および E_2 濃度の正常変化について研究した。我々の調べる限り、本研究は初めてのポニー馬における妊娠全期間にわたる馬の胎子健康指標および妊娠馬血中ホルモン濃度の研究であった。今回の研究から得られたパラメータデータは将来ポニー馬の妊娠異常診断に有用な基礎的資料になると期待している。また本研究は馬の生産性向上に役に立つことを確信している。

FGL が妊娠中に増大することは馬胎子の特殊な現象である[62]。胎子性腺は妊娠中一時的に増大し、その大きさは妊娠馬の卵巣より大きくなる。その原因は

妊娠中の胎性腺の間質細胞の肥大化および低形成化によるものと報告された[62]。胎性腺増大のピークがポニー馬では妊娠 220-250 日の報告があった[63]。本研究では、胎性腺のピークは妊娠 32 から 37 週の 57mm であった、その結果は北海道和種馬のようなポニー馬も先行研究と一致し、胎性腺の増大現象があった。胎性腺は胎盤のエストロゲン生成に関与することが報告された。Pashen ら[64]の研究では、胎性腺摘出手術を行った妊娠馬は血中 E_2 濃度の明らかな下降が見られた。Allen らのサラブレッドおよびポニー馬本研究では[65]、エストロゲン濃度は妊娠馬の胎盤や血液の量ではなく、胎性腺のサイズと相関があると報告した。本研究でも、胎性腺と妊娠馬血中 E_2 濃度には強い相関が見られた。更に、胎性腺は妊娠 32 週にピークに到達し、37 週から下降した。また妊娠馬血中 E_2 濃度は妊娠 39 週にピークに到達し、44 週から下降した。この結果から胎性腺と妊娠馬血中 E_2 濃度変化はよりおよそ 6 週のインターバルが認められた。このインターバルは今までの研究では報告されてなかった。そのインターバルは胎性腺からの前駆物質が胎盤単位で芳香化し、エストロゲンを生成するために必要な時間と考えられる。

馬上行性胎盤炎は妊娠中期および後期の馬流産の大きな原因の 1 つである[66–68]。乳房の早期腫脹や外陰部の汚れは上行性胎盤炎の診断指標として広く使用されているが[69]、それらの症状が発見された時、流産は既にある程度進んでいる。その時点で妊娠馬に治療を施したとしても胎性流産防止の成功率は低くなっている。そのため、血液ホルモン測定および CTUP の測定は上行性胎盤炎の早期発見および流産防止の鍵となる。数多くの研究において、妊娠 240 から 300 日の間の CTUP およびプレグナン濃度の測定は、上行性胎盤炎の早期診断指標となることが証明されている[70–73]。本研究により北海道和種馬の正常値を測定することで、将来繁殖検査時に妊娠異常の判断の有用な参考になる。

Ginther ら[74]と Murase ら[47]により、ヒトの胎児と同じように馬の胎性での妊娠 3 ヶ月までの FHR の上昇、およびその後の下降現象が報告された。それは胎性の交感神経が成熟した後に、妊娠 3 ヶ月時点で副交感神経の成熟が起こることによると解釈された。本研究では、ポニー馬でも同じ現象が見られた。生理上 FHR は胎性の動きにより上昇する。そのため、FHR を測定する際には、胎性の動きがない時で、又複数回サンプリングし、その中の最も低い値を選ぶことで、より正しい胎性心拍を得ることが出来る。病理時、FHR は胎性健康の重要な指標の 1 つである。持続的な胎性の頻脈、徐脈、および心不整脈は、胎性流産または胎性ストレスの一般的な予測因子である。本研究では、FHR の異常は見られなかった。

Turner ら[75]と Renaudin ら[76]の報告では、FEO は妊娠日齢と強い相関が見られた。本研究でもポニー馬の FEO と妊娠日齢の強い相関が見られた。それ

らの結果から馬の FEO は胎子妊娠日齢を逆算する重要なパラメータの 1 つであった。妊娠日齢が不明な際には胎子眼窩径を測定することで、妊娠日齢を推定出来る。本研究では、FEO の変化の回帰曲線は二次関数と最も適合していることから、FEO は妊娠後期の成長速度は前期より遅いことが判明した。この FEO の成長傾向は、Turner らの研究で報告されており、Renaudin が提示したモデルにはないものであった。Turner らは FEO から胎子出産後の体重推定に使用することを検討したが、FEO と胎子出産後の体重の関連性は発見されてなかった。本研究でも、FEO と胎子出産後の体重の相関($r=0.10$)が見られなかった。

FKL は妊娠後期において胎齢を推定する重要なパラメータの 1 つとして Murase らと Ferrer ら[77]は報告した。ところが、本研究では、妊娠 42 週から分娩まで有意な変化が見られなかった。その原因は胎子腎臓が不定形であり、観測の角度によって長径が変化することによると考えられる。またはポニー馬では妊娠 42 週から胎子腎臓が既に発育を完了しているとも考えられる。また胎子腎臓は水腎症や胎子泌尿器官異常の判断する重要なパラメータである。

2.5 まとめ

本研究では、初めて北海道和種馬およびその交雑種を用いて、妊娠全期間の妊娠正常の胎子健康指標および母体血中ホルモンを測定した。また本研究では、初めて胎子性腺と母体血中 E_2 濃度の相関を発見した。それらの結果は将来的に北海道和種馬および日本在来馬の繁殖に役立つと考えられる。

2.6 図表



Fig2-1 The Hokkaido Native Pony were bred in Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine. During the winter, all the horses were kept in a paddock. During summer, the horses were grazed during the day and gathered at night.



Fig2-2 Multi-functional ultrasonic diagnostic device used in the study.



Fig2-3 Fetal well-being monitoring by transabdominal ultrasound.

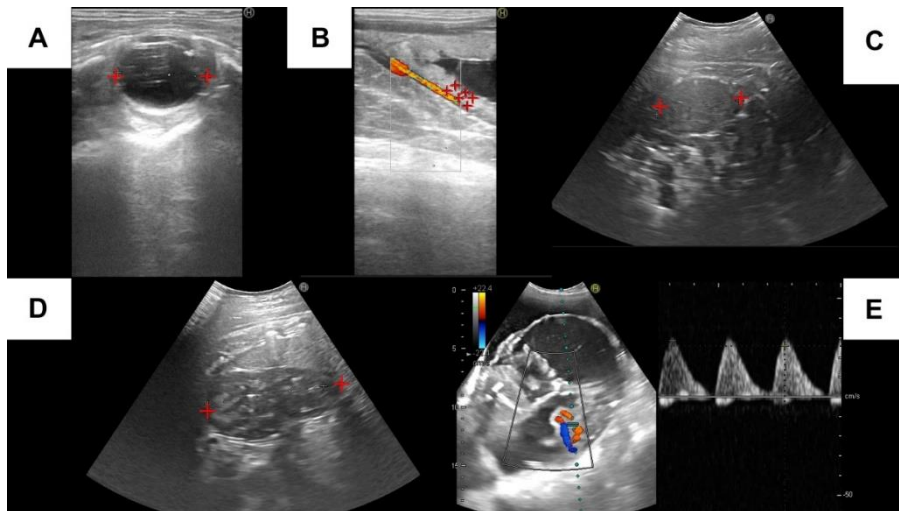


Fig2-4 Measurement of ultrasonographic indices of a pregnant mare. (A) Transrectal image of the fetal eye orbit (FEO). Eye length measurements (+) are shown. Eye length was measured from the maximum length of the inner margin of the vitreous body. (B) Transrectal images of the ventral part of the uterine body, near the cervix. Headers show the combined thickness of the uterus and placenta (CTUP). (C) Transrectal image of the fetal gonad. Fetal gonad length (FGL) measurements (+) are shown. (D) Transabdominal image of the fetal abdomen at the level of the kidney. Fetal kidney length (FKL) measurements (+) are shown. (E) Transrectal image of the fetal heart rate (FHR). Fetal heart rate measurement at the umbilical cord is shown.



Fig2-5 Automatic EIA device to measure equine blood hormone concentrations in this study.

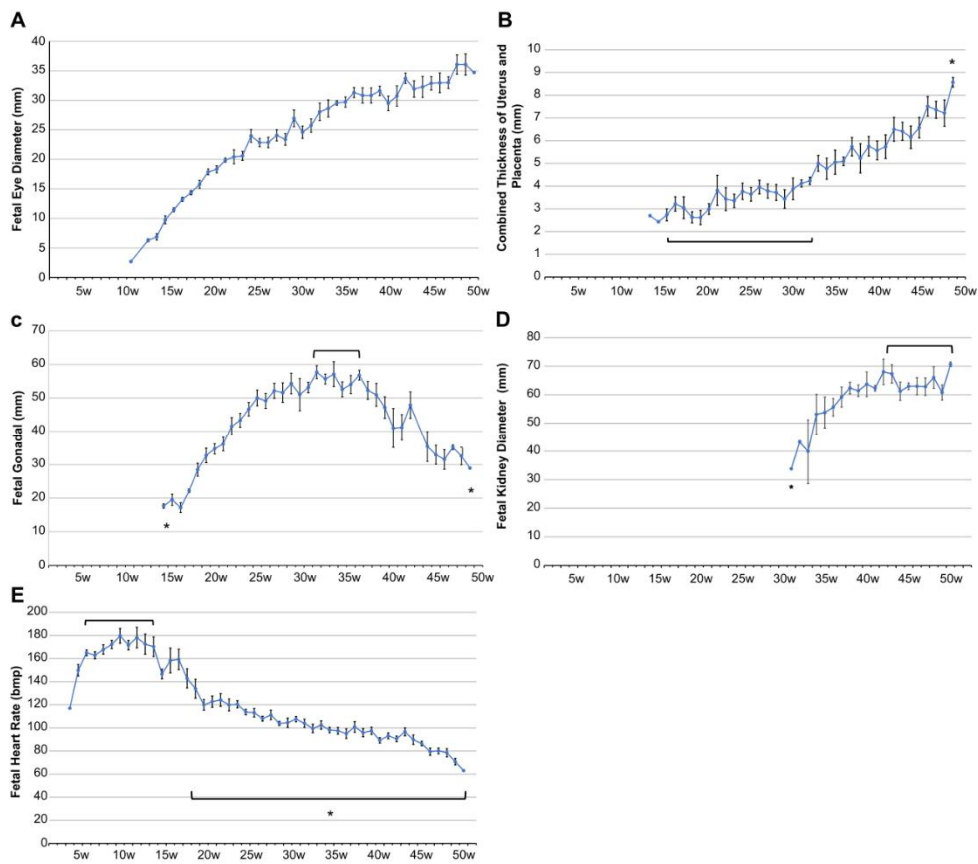


Fig2-6 Changes in FEO (A), CTUP (B), FGL (C), FKL (D), and FHR (E)

measured in pregnant mares throughout gestation. The x-axis represents the gestation week. Asterisks show significant differences in CTUP (B) when week 49 was compared with 16–32 weeks, in FGL (C) when week 14 and week 50 were compared with 32–37 weeks, in FKL (D) when week 30 was compared with 41–49 weeks, and in FHR (E) when 19–50 weeks were compared with 5–13 weeks. The error bars represent standard error of the mean (SEM).

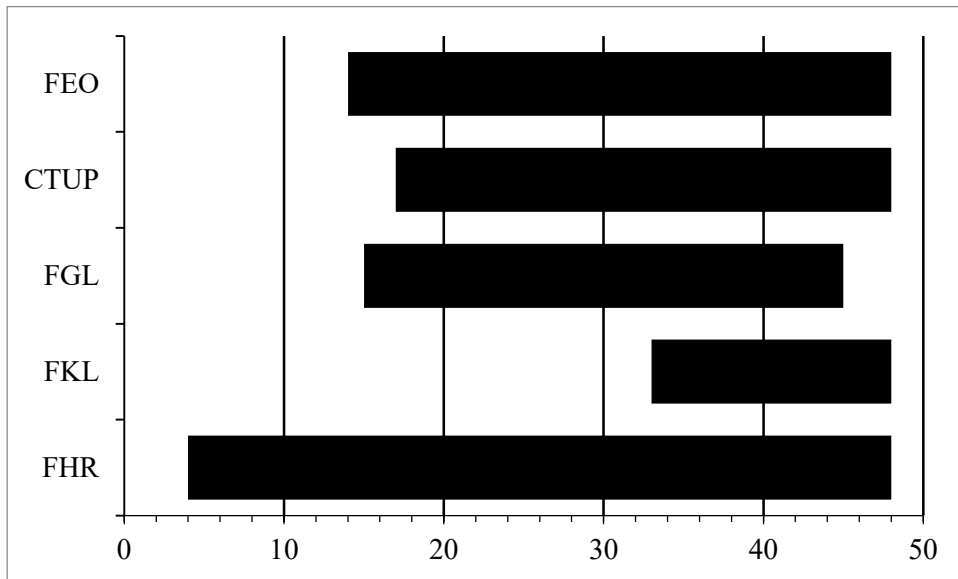


Fig2-7 Detectable periods for each index in pregnant mares. Bars show the detection rates are over 50%. The x-axis represents the gestation week.

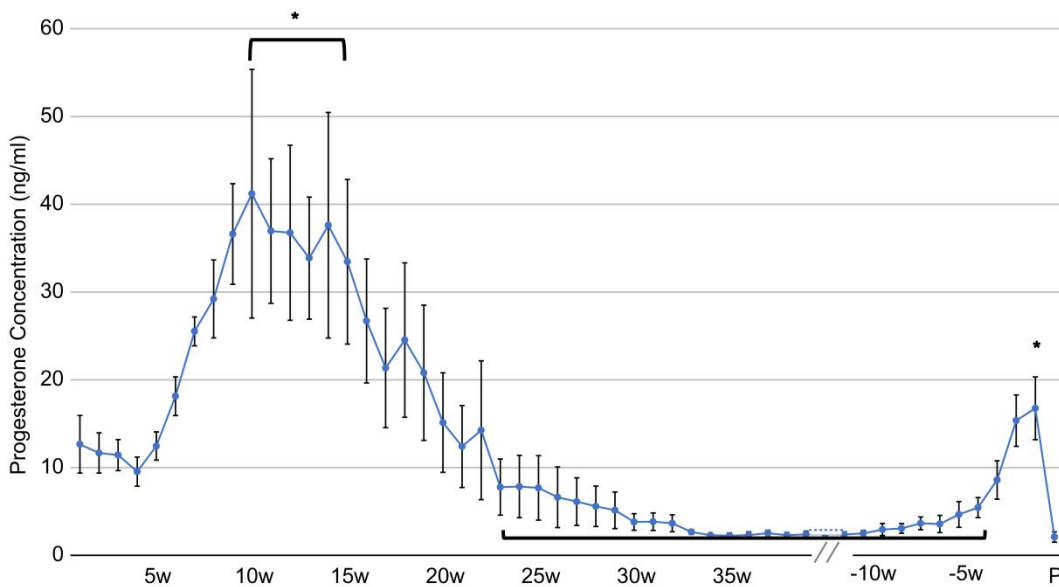


Fig2-8 Maternal circulating progesterone concentrations. Asterisk indicates the concentrations at

10–14 weeks were significantly different from those at 23–39 weeks and the concentrations at -10--4 weeks and -1 week were significantly different from those at 23–39 weeks and -10--4 weeks.

P is the day after the parturition. The error bars represent SEM.

// separates the figure into two parts. The left part is the progesterone concentration starting from week 0 of gestation. The right part is the progesterone concentration setting the parturition as week 0.

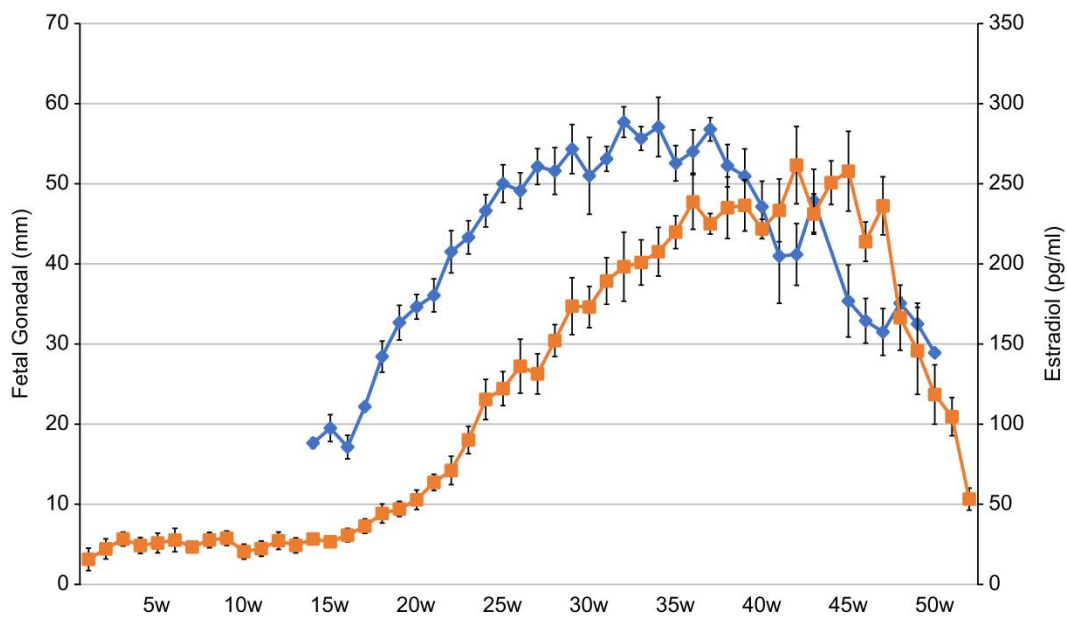


Fig2-9 Maternal circulating estradiol concentrations (■) and fetal gonad length (◆). The x-axis represents the gestation week. The error bars represent SEM.

第 2 章

3D 超音波を用いた妊娠早期の胎子性別判断法

3.1 背景

妊娠期間中の馬の胎子性別判断は巨大な利益をもたらす技術である。胎子の性別が判明している妊娠馬は更なる高い価額で販売される。また、胎子の性別を知ることにより、優秀な種馬を効率よく残すことができる。さらに、胎子の性別を事前に知ることが出来れば、繁殖牝馬の保存や淘汰も容易になる。

胎子性別判断方法は解剖学および生理学の進歩と共に、発展および成熟しつつある。Ginther ら[55]の妊娠前期 35 から 97 日間の馬胎子性別による生理構造の違いの研究では、雌雄問わず、馬胎子の生殖器突起（または生殖器結節）は妊娠 40 から 54 日にかけて両後肢の間にあり、エコー上等しく高エコーの二重構造である。妊娠が進むにつれて、雄の生殖器突起は臍帯側に移行する。雌では、尾部に近い側に移行する。胎子生殖器突起と後肢、臍帯および尾部の位置関係は妊娠前期の胎子性別判断の根拠になる。この方法の精度は Ginther らの研究では妊娠 69 から 97 日間にかけ高い精度を示している。また Efrat ら[78]の研究でも妊娠 12 週では 98.7%、妊娠 13 週では 100%の高い精度を示している。

その後、妊娠中期から胎子は体積が大きく、経直腸による検査では胎子の腹腔は届かないため、経腹壁による胎子性別検査法が考えられた。1999 年 Catherine らは妊娠 100 日から分娩までの期間に着目し[79]、経腹壁超音波検査による胎子外性器の検出を研究した。雄は陰茎や包茎、雌は乳腺や卵巣を判断の根拠とした。その研究から妊娠 100 から 220 日は胎子外性器の検査の最適な時期と判明した。その後、Bucca[80]はその方法を更に詳しくまとめた。Velde ら[81]は外性器の判断法を実行し、98%の高い精度が得られた。更に、胎子性腺の血流ドップラーの違いを胎子性別判断法の 1 つとして提唱した。

3D 超音波は表面構造を認識または評価するツールの 1 つである。ヒト医学では、3D 超音波診断は妊娠中の胎児の幅広い臓器の生理および病理的診断に使用されている[82]。胎児の脳[83]、肺[84]、心血管系[85]、脊椎[86]、腎臓[87]および骨盤[88]などはすべて研究の対象になっている。ヒト以外もマウス[89]、犬[90]、ヤギ[91]、ウマでの 3D 超音波検査の応用は報告されている。馬における 3D 胎子超音波検査は Kotoyori ら[56]の報告以外はまだ記録されていない。また、Kotoyori らの研究では、妊娠 63 から 76 日にかけて胎子の生殖器突起が確認でき、妊娠 90 から 150 日では胎子の外性器の検出が可能との報告であった。ところが、3D 超音波胎子性別判断の実用性はまだ判明されておらず、また妊娠日齢ごとの検出率や胎子性別判断の正確率についてはこれまで検討されてこなかった。そのため、本研究では、①ポニー馬を用いて、3D 超音波胎子性別判断の可能性を検討する；②妊娠 50 から 100 日までの 3D および 2D 超音波の胎子性別判断の胎子性別検出率を調べる；③3D 超音波による胎子の性別判断に適した時期を検討する。

3.2 材料と方法

3.2.1 妊娠馬および飼養管理

2020年から2023年、日本北海道帯広畜産大学で、北海道和種馬5頭(9.9±3.7歳)はのべ9回妊娠した。すべての試験馬は人工授精後、受精卵移植によって妊娠した。妊娠馬は妊娠期間中はパドック内に飼養され、一日10kg乾草および500g混合飼料を与えられ、自由飲水の可能とした。ボディーコンディションスコアは5-5.5で維持された。週1回妊娠馬に対して血液採取および超音波胎児検査を行った。また、妊娠50から100日の期間に5日間で1回の胎児性別判断を行った。

3.2.2 胎児の性別判断手順

胎児性別検査の際、初めに7.5-MHzリニア型のプローブ(Noblus, Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan)で経直腸により胎児をスキャンする。最初は胎児の頭を探した。胎児の頭を確認した後、胎児心臓や肋骨を胸腔のランドマークとして胎児の胸腔を確認した。続けて、胎児の胃を腹腔のランドマークとして胎児の腹腔を確認した。この手順によって、最終的に胎児の姿勢を確認した。超音波と胎児の四肢の角度が90°になるようにプローブの角度を変換し、胎児の水平面を画像上に描出する(fig3-1 A)。最後に、胎児の後肢に焦点を当てて、性別判断を行う。2D性別判断を10から15分まで行い、その後、結果を記録する。その後2Dプローブを外し、5-MHz3Dコンベックス型プローブ(Noblus, Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan)に付け替え(fig3-2)、同じ経直腸により胎児の全身像を2Dモードで描出し、胎児の全身または腹腔以下の部位を画面の中央に移動する。次に3Dモードに切り替える。胎児および妊娠馬を同時に安静時に3Dボリュームサンプルをスキャンする(fig3-1 B)。1回の3Dスキャンは5秒ほどかかる、その際に明らかな胎児や妊娠馬の動きを感じた時はスキャンし直す。トータルサンプリング時間は5分以内であった。安静時の3Dボリュームを3回スキャン成功した後、収集された3Dデータは超音波診断装置内に記録され、検査後、実験室で超音波診断装置内蔵の専用のソフトウェアを用いて事後分析を行った。

3.2.3 胎児性別判断基準

胎児性別検査と判断は同じ術者で行った。2D超音波胎児性別判断の際は、Curranら[55]の方法に従い、胎児の生殖器突起と両後肢のラインの位置関係を判断根拠とした。生殖器突起が後肢ラインと臍帯の区間内なら雄としてし、生殖器突起が後肢ラインと尾部の区間内なら雌として判定する。生殖器突起が両後

肢と同じラインの場合は性別不明とされる。3D 超音波胎子性別判断は 2D 超音波と同じ方法で性別判断を行う。胎子性別はすべて 2D の結果を根拠として判断する。2D と 3D の判断が異なる場合は 2D の結果を取る。

3.3 結果

本研究では、先ず妊娠 50 から 100 日までの胎子 3D 超音波画像の描出はすべて可能であった。胎子の頭部、前肢、後肢、尾部および胴体は胎子安静時にははっきりと観察出来る(fig3-3)。胎子生殖器突起も 3D モードで確認可能であった(fig3-4)。妊娠 50 から 70 日まで一貫した 2D および 3D 画像は収集可能であることが本研究では明らかになった(fig3-5, 3-6)。胎子のサイズは妊娠と共に大きくなり、妊娠 80 日以降は全身像をスキャンすることが難しくなる。また妊娠 70 日以降、胎子の動きは明らかに頻繁になり、安静時の 3D 画像は描出困難となる。

本研究ではのべ 9 回胎子性別判断を行い、2D と 3D の検査結果はすべて一致している。またその後産まれた 9 頭子供の性別はすべて生前胎子性別診断と一致した。妊娠 50 から 100 日までの 2D および 3D 超音波胎子性別検出率は図に示している(fig3-7)。2D および 3D 超音波診断により胎子性別が判断可能となる妊娠期間は 50 日から 80 までであった。2D 超音波では、検出率の高い時期は妊娠 70 日 (66.7%) であった。一方、3D 超音波では、検出率の高い時期は妊娠 60 日 (55.6%) であった。全体的に妊娠 60 日から 70 日までは高い検出率を示している。妊娠 50 日および 80 日はそれぞれ 1 回のみ胎子性別を検出されている。

3.4 考察

この研究は初めてウマで 3D 超音波胎子性別判断の実用性を評価した研究である。Kotoyori ら[56]の研究では既に 3D 超音波により妊娠前期の胎子生殖器突起および外性器の検出率が可能であることを判明した。しかし、妊娠日齢による 3D 超音波の検出率または実用性はまだ不明であった。本研究は妊娠 50 から 100 日までの 2D および 3D 胎子性別判断の検出率をそれぞれ記録し、この研究データは、3D 超音波胎子性別判断法のさらなる発展のための基礎データになると考えられる。Kotoyori らの研究と同様に、本研究でもポニー馬の 3D 画像は妊娠前期の構成が可能であった。また胎子全身の形は鮮明に多角度から観測することが出来る。この結果から、3D 超音波は妊娠中馬胎子の表面構造を研究する重要なツールと考えられる。

Curran ら[55]研究では、乗用馬において妊娠 59 から 68 日は最適な性別判断区間であった。本研究では、ポニー馬において妊娠 60 から 70 日の期間は胎子

性別の検出率が一番高いことが判明した。この結果は Curran らの研究結果および Kotoyori ら[56]の報告とほぼ一致している。また、ヒトの性別判断の最適の期間は妊娠 11 から 14 週と報告される[92]。ヒトと比べ、ウマの妊娠前期胎子性別判断時期は早く、測定可能な区間は短いと思われる。それはヒトよりウマの胎子の体型が大きいため、発育の速度も異なると思われる。また、もう 1 つ考えられる原因はウマにおいて妊娠前期超音波検査のアプローチは経直腸のみのため、妊娠中期では胎子生殖器の検査が困難である。本研究で明らかになったのは、妊娠 60 日の時に 3D 超音波検査により胎子性別の検出率が最も高く、また妊娠 70 日の時に 2D 超音波検査により胎子性別の検出率が最も高いことであった。この結果から妊娠 60 から 70 日の 2D および 3D 超音波検査の同時進行は推奨される。

3D 超音波の利点として、最大の利点は適切なスキャン区間を決めた後、専用のソフトウェアによりスキャンの角度を変えずに必要な画面を再現できる点が挙げられ、これは 2D 超音波では出来ない機能である。また 3D スキャンする時、胎子の姿勢を気にせずボリュームを取集出来るため、検査時間は 2D 超音波より短縮された。最後に、取得したボリュームは事後分析が出来るため、直腸検査の短い時間より冷静に分析出来る。それらの利点は 3D の使用により、胎子性別判断の正確率を上昇させ、また術者への性別判断の経験の要求も緩和された。しかし、一番のデメリットとして 2D 超音波と比べ、3D 超音波は胎子や妊娠馬の動きの影響を大きく受けることになった。スキャン中の胎子の姿勢の変化は必要のないアーチファクトを増やす原因の 1 つである。その影響を減らすため、妊娠馬および胎子安静時の複数回のボリューム取集および必要な時に鎮静が考えられる。

ヒトの医学では、3D 超音波検査のみ用いた研究では 85.3%の高い正確率を示している[93]。今回の研究は 2D および 3D 超音波検査を用いて胎子性別判断を 9 回行った結果正確率は 100%であった。それらの結果から 3D 超音波検査は十分にポテンシャルのある胎子性別判断法である。しかし、本研究における妊娠期間別の検出率の最高値は 2D では 66.7%（妊娠 70 日）、3D では 55.6%（妊娠 60 日）となり、ヒトの診断時の検出率と比べて少し低い値になった。一番の原因として、ウマはヒトよりも安静を保つことが困難であることが挙げられる。そのため、胎子の 3D 画像も余計にアーチファクトが増えやすくなる。またヒトでも同じように、スキャン時の胎子後肢または臍帯は生殖器突起の上方の場合は、性別判断が出来なくなる。

近年ヒトの医学では、3D 超音波を用いて、妊娠 20 から 30 週の胎児頭蓋内容積 (fetal intracranial volume) の違いも新しい性別判断法として考えられている[94]。馬胎子性別についての知見はまだ空白な領域も多い、また現在馬に關す

る 3D 超音波の使用や研究はまだ少ない。しかし、将来的に馬生産者からの需要が高まると思われるため、今後更なる 3D 超音波の研究および馬の 3D 超音波胎子性別判断検査法の実用化が求められる。

3.5 まとめ

本研究では、初めて 3D 超音波診断装置を用いて、ポニー馬の妊娠 50 から 100 日までの胎子性別判断を行った。本研究からポニー馬の妊娠 60 から 70 日の期間は一番胎子性別判断に適している時期であることが明らかになった。今までウマでは 3D 超音波胎子性別判断の応用はまだ少ないが、この技術の発展により、ウマ生産者および獣医師に更なる経済的効果をもたらすことが期待出来る。

3.6 图表



Fig3-1 3D convex transducer using for 3D fetal gender determination

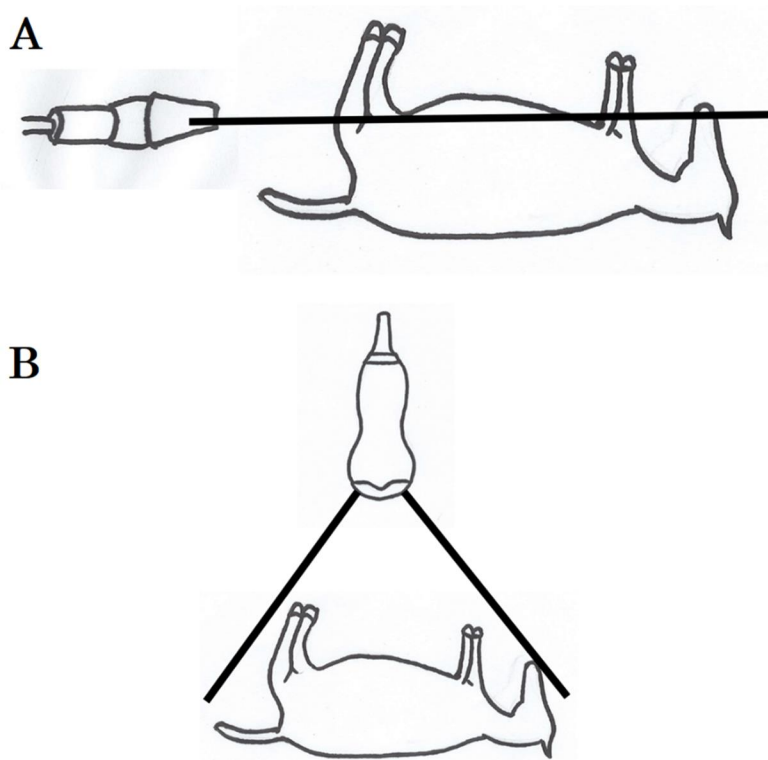


Fig3-2 The 2D (A) and 3D (B) ultrasound fetal gender examination using linear and 3D convex transducer. The black line presents the ultrasound beam.

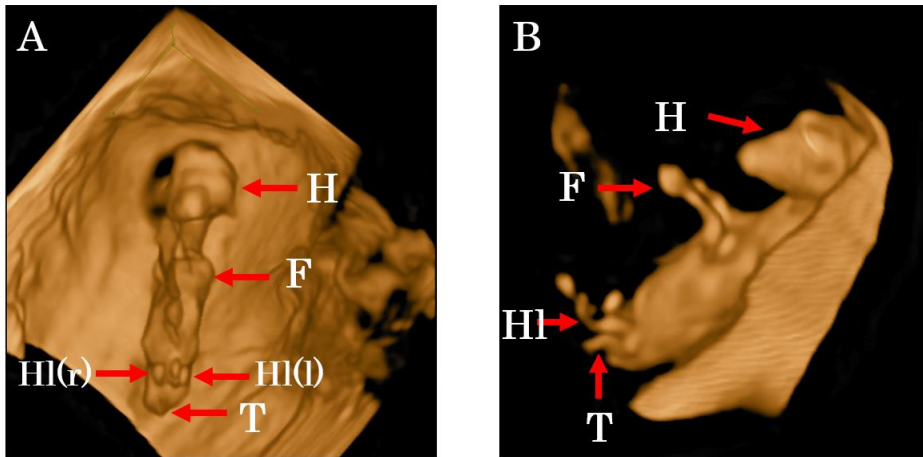


Fig3-3 The 3D volume of fetal body in gestation day of 65 in front (A) and side view (B). The red arrows point the head (H), forelimbs (F), right hindlimbs (HI(r)), left hindlimbs (HI(l)), and tail (T) of fetus.

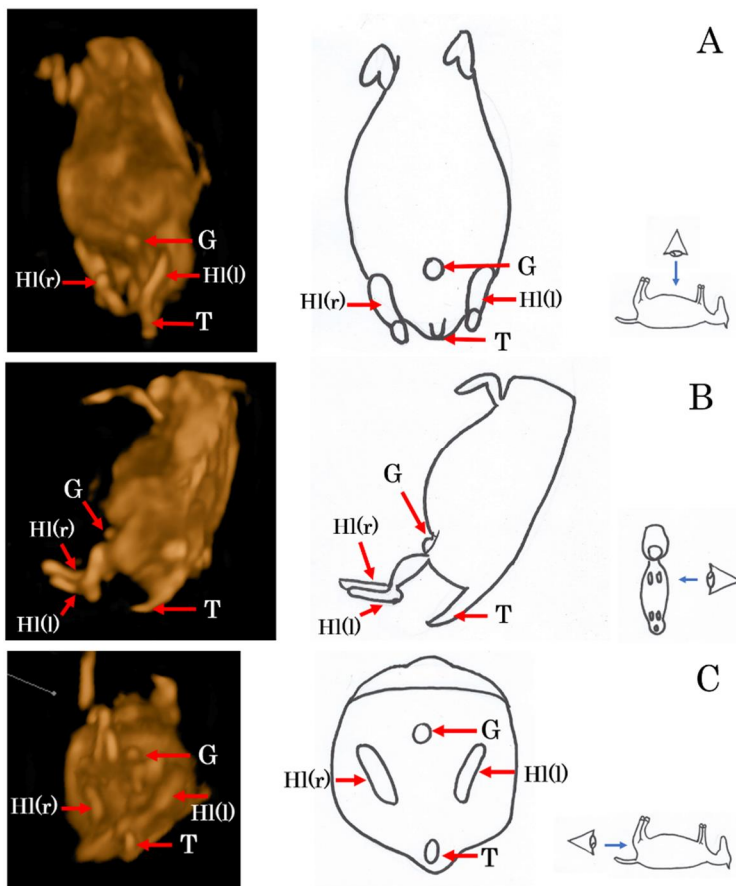


Fig3-4 the 3D volume of fetal lower body in gestation day of 80 in front (A), side (B) and tail view (C). The red arrows point the right hindlimbs (HI(r)), left hindlimbs (HI(l)), tail (T), and genital tubercle (G) of fetus.

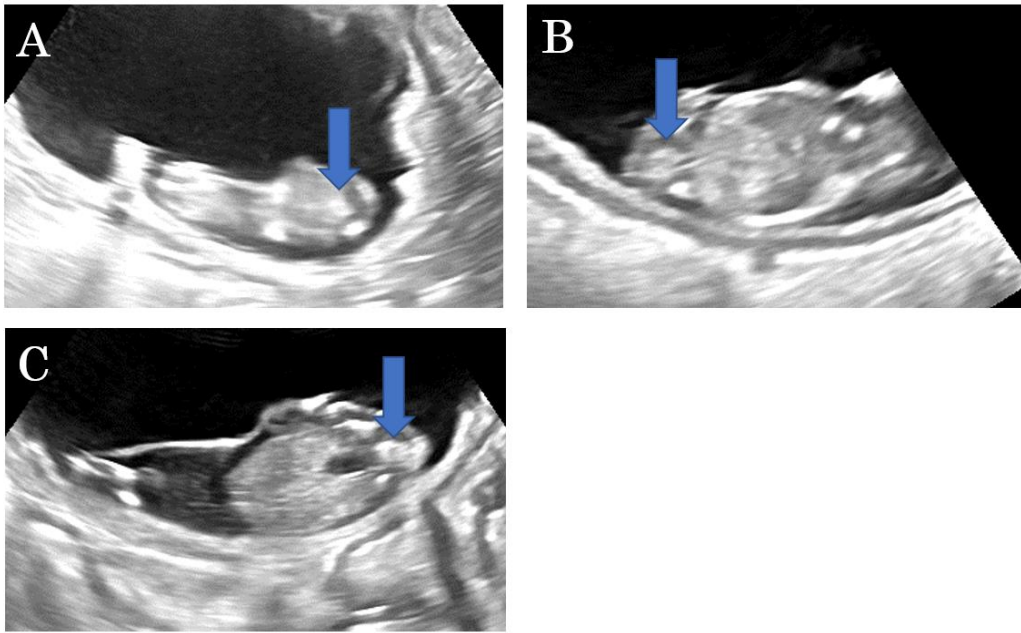


Fig3-5 The 2D ultrasound images at gestation day of 50 (A), 60(B), 70 (C). The blue arrows point the fetal genital tubercle.

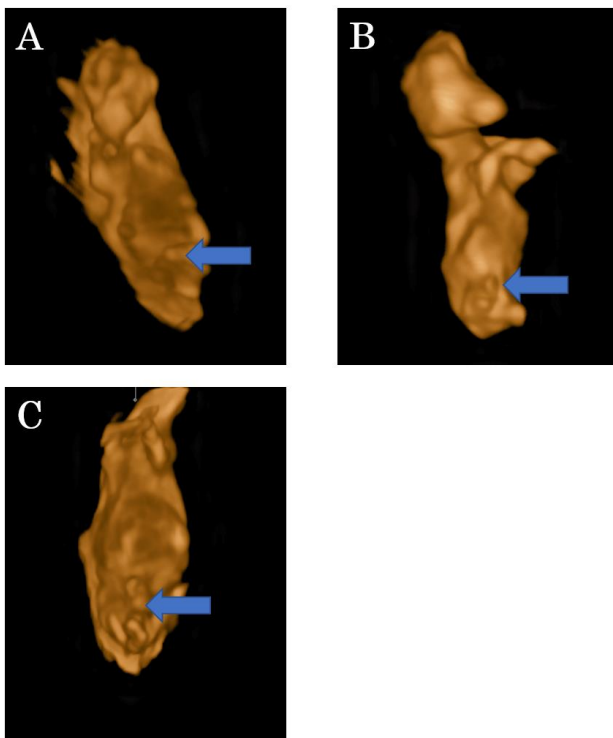


Fig3-6 The 3D ultrasound images at gestation day of 50 (A), 60 (B), 70 (C). The blue arrows point the fetal genital tubercle.

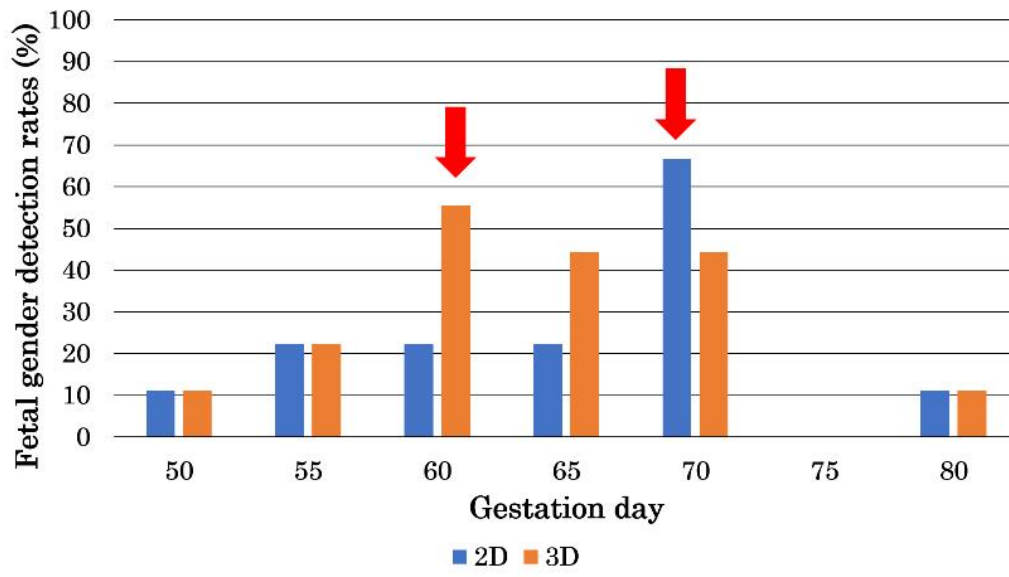


Fig3-7 The fetal gender detected rate from gestation day 50 to 100 using 2D and 3D ultrasound. The red arrows show the highest detection rate in 2D and 3D respectively.

第 3 章

超音波胎子健康検査および母体血中ホルモン測定を用いて

妊娠異常の早期発見の 1 例

4.1 背景

第 1 章に紹介されたように、妊娠中の馬胎子健康検査は非常に重要である。ところが、馬の流産率は未だ高い数値を示している。その中の 14~25% のケースは原因不明である[66,67]。その原因は妊娠中期および後期の胎子健康診断法がまだ普及されてないためであると考えられる。経腹壁による超音波胎子診断は妊娠中期および後期馬流産を早期発見する有用な方法である。胎子は平均妊娠 200 日から経腹壁により超音波検査が可能である。胎子心臓、肝臓、胃、腎臓、腸管および性腺などの臓器は経腹壁超音波検査より観測可能である[46,47]。定期的な経腹胎子超音波検査は流産の原因を早期発見し、流産率を下げるための重要な手段として考えられている。一方、妊娠馬に対する血中ホルモン測定も流産早期発見の重要な手段の 1 つである[61]。特に妊娠中期および後期の P₄ および E₂ 値の変動は流産を示唆している。

胎子の泌尿器官の発育はとても複雑な過程である。そのため、発育の段階での泌尿器官奇形の発生は珍しいことではなかった[95]。その中で胎子巨大膀胱は[96,97]、妊娠中の胎子膀胱の異常な拡張を特徴とする先天性泌尿器科疾患の 1 つである。ヒトでは、妊娠前期において報告された胎児膀胱の発生率は 0.06%~0.3%であった。さらに、発生率は女性よりも男性で高い (1:8) [98]。しかし、馬では巨大膀胱が報告されることはほとんどない。Denys ら[99]の報告では、フレンチチェイサーの妊娠馬で巨大膀胱 1 例が発見された。症例では妊娠 288 日目に胎子経腹超音波検査により直径 17.7cm の拡張な膀胱を示した。さらに、胎子の片方の腎臓は著しい水腎症であり、また両側の尿管の異常な拡張が確認された。Denys らの報告は馬巨大膀胱に関する非常に貴重な情報を提供したが、残念ながら、経腹胎子超音波検査は流産の約 1 週間前にしか実施されていないため、馬胎子巨大膀胱の発展および早期診断の方法に関する情報は提供されていない。したがって、馬胎子巨大膀胱についてまだ不明な点が多い。

本症例報告は初めて経腹超音波検査を用いて妊娠中の胎子巨大膀胱の発展と結末を示し、更に胎子および妊娠馬指標を記録した症例であった。本症例を報告する目的として、妊娠期間中に経腹超音波検査およびホルモン検査を用いて馬胎子巨大膀胱のモニタリングおよび胎子巨大膀胱を持つ異常妊娠した妊娠馬の内分泌に関する変化を調べる。最後に、経腹胎子超音波検査および妊娠馬内分泌のモニタリングが胎子異常早期発見に非常に重要であることを再認識する。

4.2 症例紹介

4.2.1 妊娠馬

本症例では、2021 年 6 月 18 日に北海道帯広畜産大学（日本北部）で飼養された 8 歳の北海道和種の雌馬は遠隔受精卵輸送および移植により妊娠した。妊

妊娠馬は 1 年前に健康な仔馬を出産した。遠隔受精卵輸送および移植について、長野県（日本中部）で飼養されたドナーとなる木曾馬の繁殖牝馬から排卵 8 日後に受精卵回収を実施した。回収された受精卵は同日飛行機およびバスにより帯広畜産大学に輸送した。帯広畜産大学に到着後本症例のレシピエントとなった北海道和種馬に受精卵移植を行った。その後受精卵 13 日および 15 日目に 2 回妊娠鑑定を行い、妊娠が確認された。受精卵移植日がレシピエント馬排卵日の 3 日後であったため、受精卵移植日から妊娠 50 日目まで妊娠維持するためにレグメイト®（アルトレノゲスト）0.22%（8mL/日）を妊娠馬に経口投与した。

4.2.2 飼養管理

冬の間、妊娠馬はパドックで飼養された。乾草 10kg および混合飼料 0.5kg を毎日与え、水は自由に飲むことができた。春と夏には、妊娠中の雌馬は日中、牧草地で放牧され、日没後パドック内に集牧した。妊娠期間ボディコンディションは 5~6 に維持された。

4.2.3 胎子超音波およびホルモン検査

妊娠鑑定後、妊娠馬に週 1 回、経直腸および経腹壁胎子超音波検査を行った。7.5MHz リニア型超音波探触子と 5MHz コンベックス探触子（Noblus, Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan）が使用された。胎子の健康指標として、FHR、FEO、CTUP を経直腸、FGL、FKL は経腹壁により測定した。一方、妊娠馬に対して週 1 回 10ml の血液採取を行った。真空ヘパリンチューブを用いて採取された血液は研究室で遠心分離（1500 g × 10 min）した。その後、上清の血漿を保存した。保存した血漿は、後日 EIA 法（AIA360, Tosoh Bioscience, Tokyo, Japan）による P₄ および E₂ 濃度の測定に使用した。超音波およびホルモン検査の方法は全て第 1 章と同じであった。また、第 1 章から得られた胎子指標データおよび母体ホルモンデータは本症例の胎子検査時の参考値となった[46]。

4.2.4 経過

胎子の異常は妊娠 215 日（31 週）から初めて観察された。健康な胎子では、妊娠期間経腹超音波検査の際、胎子の腹腔内の低エコーエリアは胃と腸管のみである。ところが、検査の際に胃の他に直径 72.5mm（Fig4-1A）の円い低エコーエリアが観察された。その後妊娠 229 日目（33 週）の検査の際には、他の臓器の解剖学的位置関係から低エコーエリアは膀胱であると疑われた（Fig4-1B）。また、低エコーエリアは前回検査時より著しく拡大し、形状も円形から楕円形に近い形に変化した。

また、超音波検査により、膀胱が尿道とつながっていることがわかった。妊娠

243 日目、膀胱が異常に拡張し、形状も不定形に変化し始めた (Fig4-1 C)。妊娠 257 日目、膀胱は完全に 2 つの繋がっている空間に分かれた (Fig4-1 D)。妊娠 285 日目、膀胱を 2 つに分ける強い高エコーの線が現れた (Fig4-1 E)。膀胱の異常が検出された場合、膀胱の長軸と短軸を測定した。膀胱軸の測定は、妊娠 31~42 週まで行った (Fig4-2)。妊娠 43 週以降、膀胱の大きさを一度に測定することができなくなった。327 日目の時点で、膀胱の短軸は 244.8mm、長軸は 250mm 以上であった (Fig4-1 F)。

FHR、FEO、CTUP および他の胎子指標は毎週測定された。今回測定した指標は参考範囲と比較し、全て参考範囲内であった (Fig4-3)。胎子腎臓は妊娠 36 週以降に測定することができ、その後の妊娠期間を通じて形態的な異常は確認されなかった。同時に、胃や肝臓などの腹腔臓器が膀胱に圧迫され、胸腔に近い位置にあることが確認された。しかし、超音波画像上、形態的な異常は確認されなかった。

妊娠期間中、妊娠馬の P_4 と E_2 濃度をモニターした。 E_2 濃度は、妊娠期間中、全て参考範囲内にあった (Fig4-4 A)。一方、 P_4 濃度は妊娠 33 週から 39 週および 41 週、45 週は参考範囲外の高値を示した (Fig4-4 B)。

妊娠 363 日 (52 週) の時、分娩予定日 (335 日) より 1 ヶ月以上延長したため、分娩を誘発することにした。分娩を誘発した後、子馬を無事に出産した (Fig4-5)。分娩後、4.8L の尿が尿カテーテルにより排出された。残念ながら、生まれたばかりの子馬は巨大膀胱に加え、口蓋裂および排尿や自力での立ち上がりができないため、新生子馬は予後不良と診断され、治療は行わなかった。生後 2 日後に子馬の解剖を行った (Fig4-6)。その結果、子馬の膀胱は、生前診断と同様に 2 つの大きな膀胱がつながっていることが判明した。膀胱の形成時間から、第 1 膀胱と第 2 膀胱と名前を付けた。第 1 膀胱の大きさは約 125mm × 100mm (Fig4-6 A)、第 2 膀胱の大きさは約 300mm × 225mm (Fig4-6 B) であった。膀胱以外の泌尿器系には異常は見られず、特に腎臓の形態的な異常は見られず、尿を作る機能を持つと考えられる (Fig4-6 C)。臍帯の周囲には尿膜管の構造は見られなかったが、第 2 膀胱の病理組織学的解析の結果は第 2 膀胱の由来を判明するには至らなかった。その結果から本症例の病因はまだ不明であった。

4.3 考察

本研究では、我々は馬胎子巨大膀胱の症例において、胎子超音波検査および母体ホルモン測定法を用いてモニターした。我々の知る限り、本研究は、初めて馬胎子巨大膀胱の発症経過を詳細に記述した症例報告であった。また胎子巨大膀胱時の母体 P_4 と E_2 の濃度変化を明らかにした初めての症例であった。この画期的な報告は、今後の馬胎子巨大膀胱の研究にとって貴重なデータとなる。

胎子巨大膀胱を示したフレンチチェイサー馬の先行研究では[99]、診断時胎子経腹超音波検査を用いた点で、本症例と類似している。しかし、本症例では、膀胱が2つに分かれており、水腎症は観察されなかった。それらの点では先行研究とは異なる。このことから、馬の巨大膀胱の病因は様々であり、症状も複雑であると考えられる。

馬では先天性泌尿器科奇形はほとんど報告されておらず、妊娠中に異常を早期発見することは困難である。ヒトの胎児では、膀胱の発達は妊娠9~10週で始まり、膀胱の構造は妊娠10~12週で初めて超音波で観察することができる[100]。泌尿生殖器の発達は複雑な過程であるため、これらの臓器の先天性欠陥の発生率は高い。泌尿生殖器の発育不全は、劇的な結果をもたらす可能性がある。したがって、妊娠中の超音波検査は非常に重要であると考えられる。正常な馬胎子では、膀胱から尿を排出する能力を持ち、連続的に充満することはほとんどない。このため、超音波検査で膀胱が検出されることはまれである。胎子検査の際に膀胱の持続的な充満および異常な拡張が観察される場合は、巨大膀胱を疑う必要がある。

先行研究とは異なり、本症例では妊娠243日目に第2膀胱の形成が進行し、257日目に完全に形成された。このような状況は1つの仮説として、第1膀胱の肥大は、尿を排出する機能が失われた結果であると考えられる。その後、膀胱が破裂しないように、新たな尿の貯蔵庫として第2膀胱が生成された。また、水腎症の原因となる尿の逆流によって胎子の腎臓が影響を受けないことも、第2膀胱の生成に起因していると考えられる。しかし、その後形成された第2膀胱の細胞由来が、膀胱であるか尿膜であるかは、組織学的に判断することはできなかった。馬の文献ではこれまで報告されていないにもかかわらず、ヒトの医学では、今回の症例の超音波画像は、膀胱憩室で観察される画像と最も類似していた[101]。とはいえ、馬胎子巨大膀胱の説明するためには、さらなる研究が必要と考えられる。

妊娠中期および後期における母体ホルモンのモニタリングは、胎子死亡や流産を予防する重要な方法の1つと考えられている[61]。正常妊娠の場合、母体の P_4 濃度は、妊娠中期から後期の雌馬では非常に低いレベルに維持され、分娩の3週間前に上昇し始める。 P_4 濃度の早期上昇は、通常、胎盤障害または胎子ストレスのシグナルと考えられる[70]。上行性胎盤炎は胎盤障害の重要な代表である。母体血漿 P_4 濃度とCTUPは、馬の上行性胎盤炎を示唆する重要な指標である[69-72,102]。本症例では、胎子異常の検出日から分娩日までの間、妊娠中の雌馬に対して投薬や治療は行われてなかった。33週目から分娩までの間、 P_4 濃度は通常より高かった。一方、母体の E_2 濃度とCTUP値は、いずれも妊娠期間中、参考範囲内であった[46]。興味深いことに、本症例では、胎子巨大膀胱が胎

盤機能に影響を与えない可能性を示唆している。したがって、妊娠馬 P₄ 濃度の上昇は、胎子ストレスに関連している可能性が考えられた。

馬巨大膀胱において P₄ と E₂ 濃度変化が報告されたのは、本例が初めてであった。母体ホルモンは、馬巨大膀胱の診断において重要な指標であると考えべきである。

日常の胎子健康モニタリングの一環として、この症例では他の胎子パラメータも記録された。FHR は、胎子の低酸素状態や子宮内ストレスを確認できるだけでなく、自律神経系の発達に関する情報も提供する[46,47]。本症例では、FHR の異常変動は観察されなかった。したがって、泌尿器系臓器が胎子の成長過程で神経系などの発達に影響を与えないことが推測される。また FEO は、胎子成長パラメータの 1 つである。本症例では、FEO は常に正常範囲に留まっていた。このことから、胎子成長は巨大膀胱の影響を受けていないことが推測された。

超音波検査は、雌馬の生殖評価における「ゴールドスタンダード」となっている[35]。しかし、胎子生前診断はまだ広く普及されてなかった。ほとんどの馬のオーナーは、妊娠が確認された後に胎子の健康診断、特に妊娠中期と後期の腹部検査を実施することを好まないのである。そのため、馬の巨大膀胱やその他の妊娠異常の早期発見や臨床診断の難易度が高くなった。本症例から、馬の繁殖効率を高めるために、経済価値の高い繁殖牝馬や流産リスクの高い繁殖牝馬に対して、少なくとも毎月、妊娠中期・後期の胎子超音波健康診断および母体血漿ホルモン検査を実施すべきことを再認識した。

4.4 まとめ

本症例は、初めて経腹超音波検査および母体ホルモン検査を用いて妊娠中馬の胎子巨大膀胱の発生および経過を詳細に報告した稀な症例であった。経腹超音波検査により、妊娠中の胎子膀胱の形成およびその後 2 つの区間に分かれた膀胱の形態変化を明らかにした。母体血漿 P₄ 濃度は、妊娠中期から後期にかけて高値を示した。また、本症例から母体血漿ホルモン測定は、馬胎子巨大膀胱のモニタリングが有用であることを認識されるべきである。馬巨大膀胱に関する理解を更に深めるためには、妊娠中期および後期の妊娠馬の定期的な経腹超音波検査およびホルモン検査が不可欠であると考えべきである。

4.5 图表

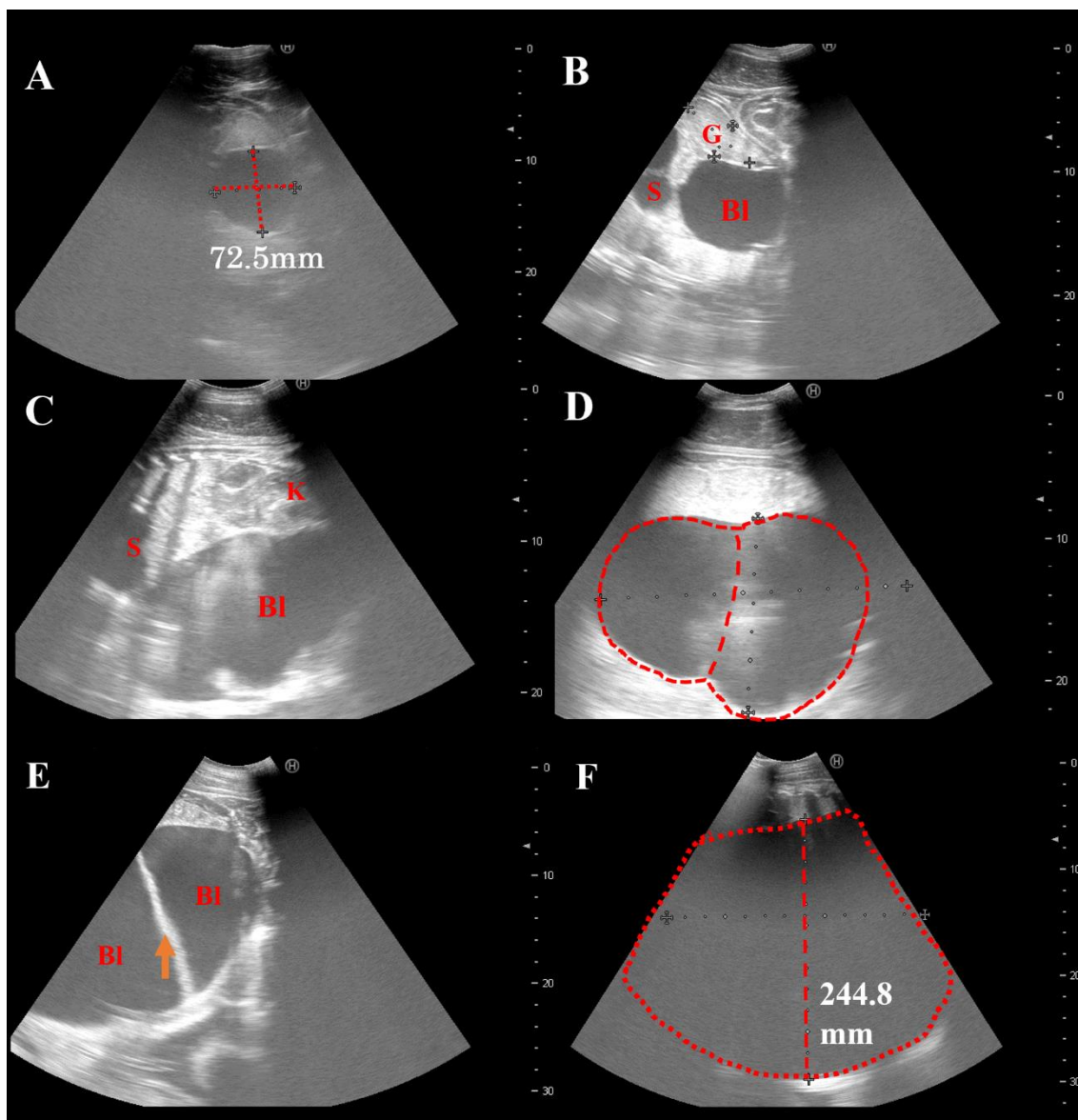


Fig 4-1 Ultrasonographic examination of fetal bladder size progression during gestation:

(A) At 215 days of gestation, the hypoechoic area in the fetal abdomen was first observed. Measurements of long and short axes are indicated as the red dashed line.

(B) At 229 days of gestation, the hypoechoic area was determined to be the fetal bladder (BL) based on the location of the fetal stomach (S) and gonads (G).

(C) At 243 days of gestation, the bladder was abnormally dilated, and the shape had changed. A fetal kidney (K) was observed beside the bladder.

(D) At 257 days of gestation, the bladder was clearly divided into two interconnected parts. The bladder was indicated by the dotted line.

(E) At 285 days of gestation, ultrasonography showed that the bladder was divided into two parts by the hyperechoic line (arrow).

(F) At 327 days of gestation, the short axis of the bladder was measured as 244.8 mm, and the long axis was over 250 mm.

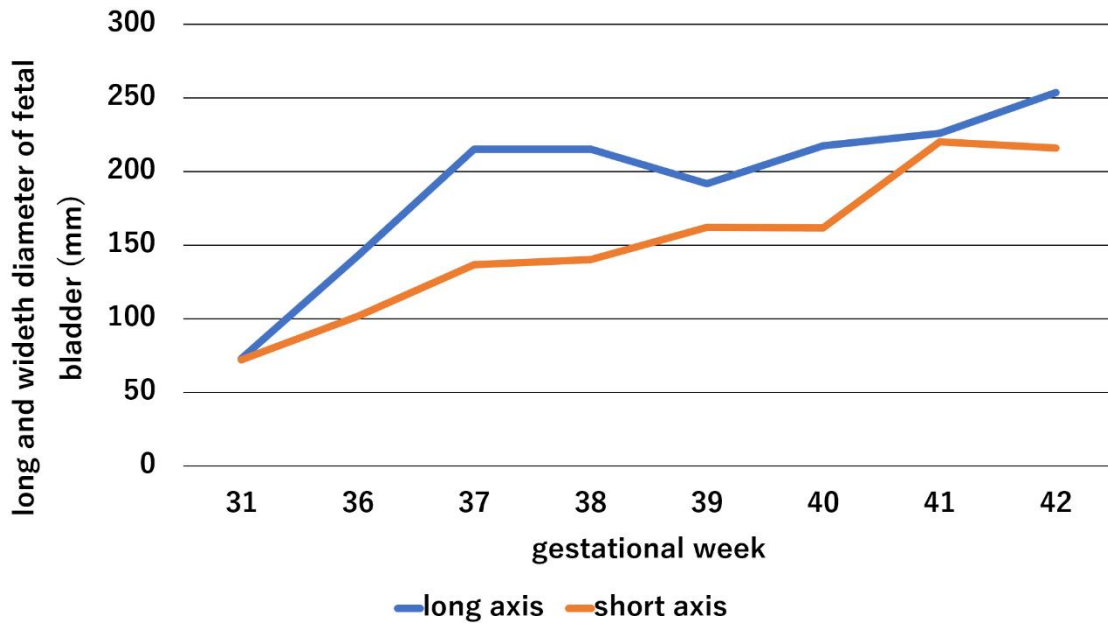


Fig 4-2 Progression of fetal bladder (long and short axes) size from 31–42 weeks of gestation.

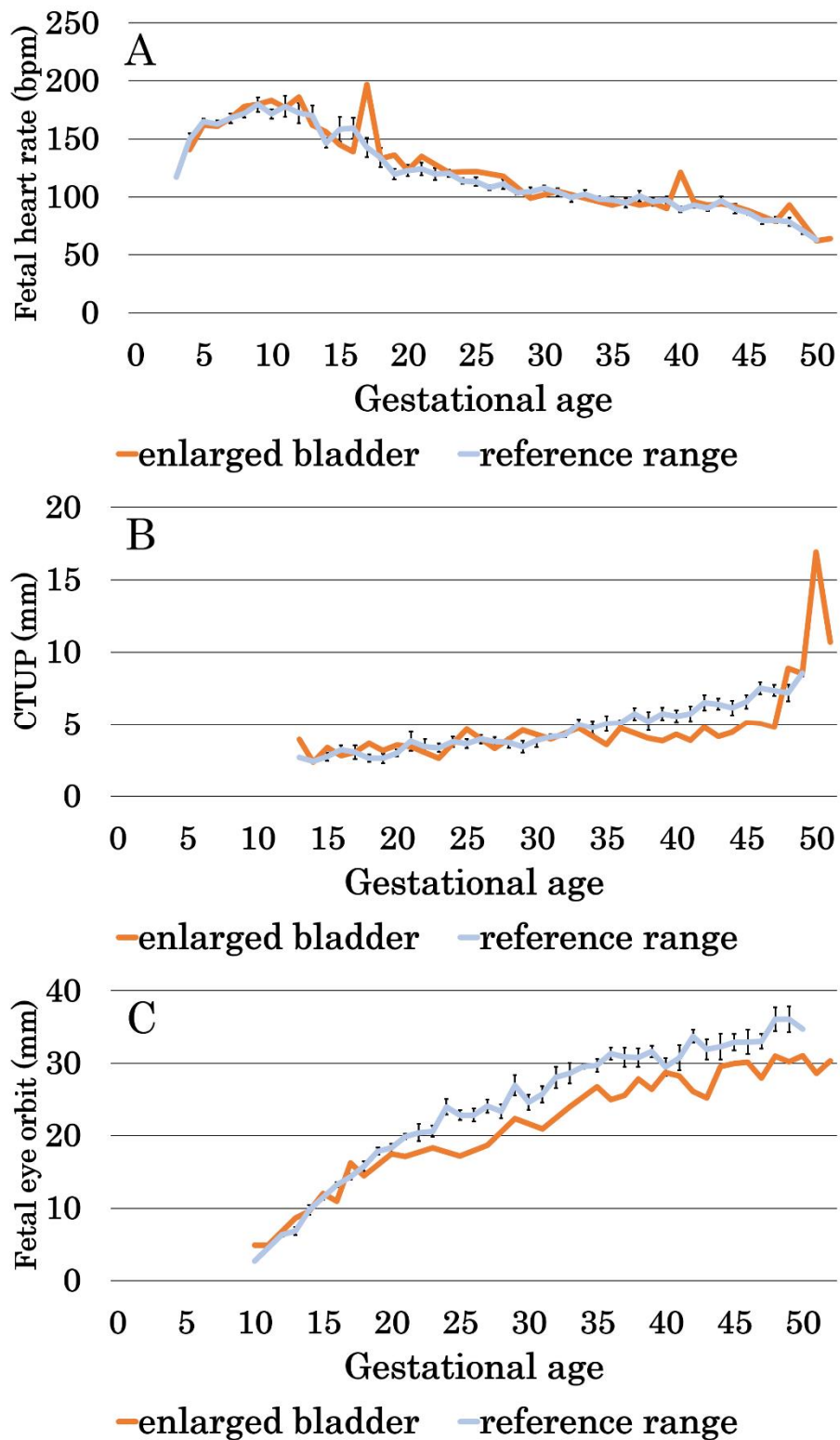


Fig 4-3 Comparison of fetal heart rate (A), CTUP (B) and fetal eye orbit size (C) variations in the enlarged bladder pregnancy in this case versus normal pregnancies.

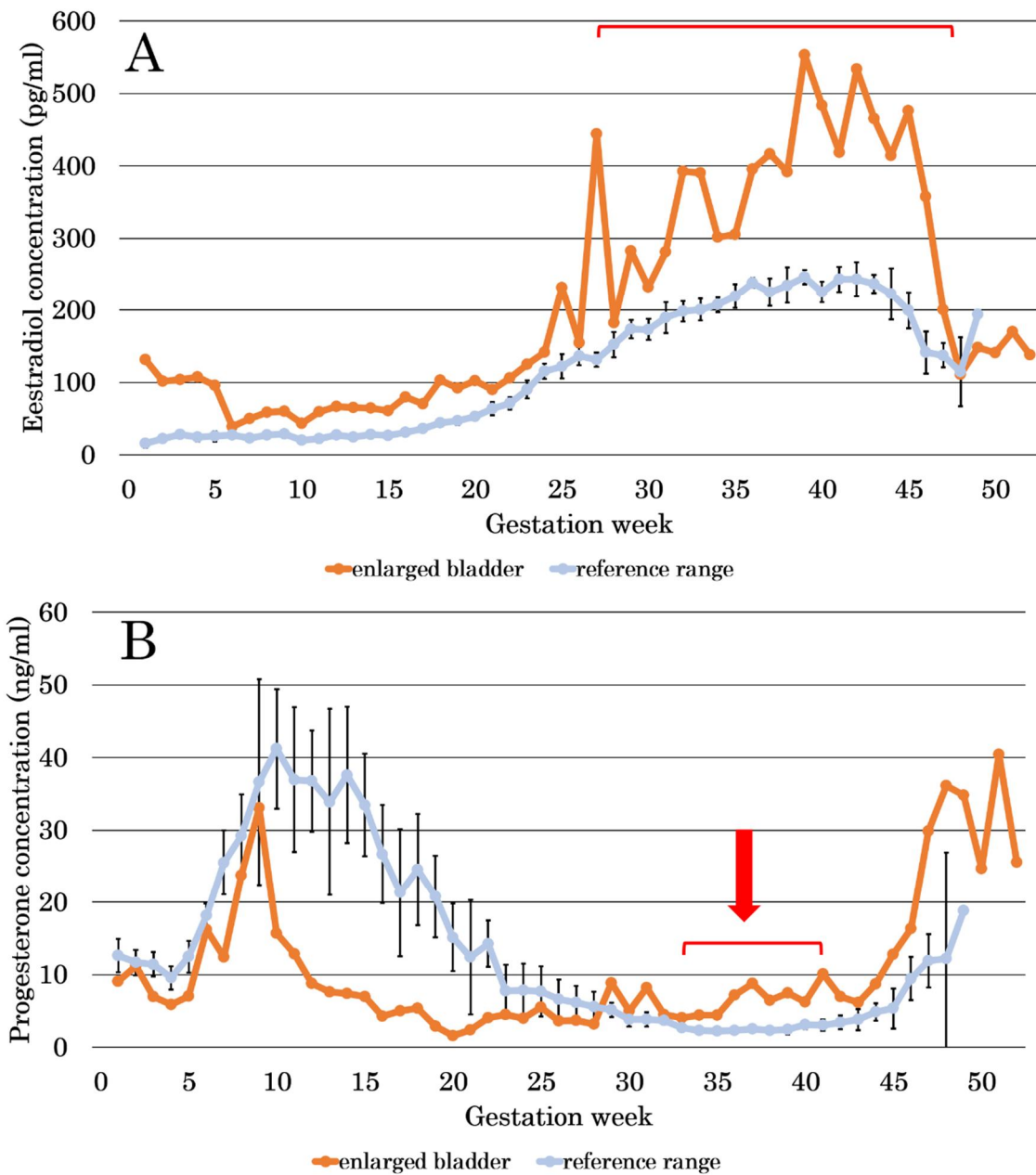


Fig 4-4 (A) Maternal plasma estradiol concentration variation in a pregnancy with fetal enlarged bladder versus the reference ranges over the gestational period. Estradiol levels were higher than reference ranges start from 27 to 47 weeks of gestation.

(B) Maternal plasma progesterone concentration variation in fetal enlarged bladder versus the reference ranges range for the duration of the gestational period. Progesterone levels were higher than reference ranges start from 33 to 39 weeks of gestation, in additional, 41 and 45 weeks of gestation (arrow).



Fig 4-5 At 363 days of gestation, the foal was born by parturition induction. The foal was unable to urinate and stand on its own after birth.

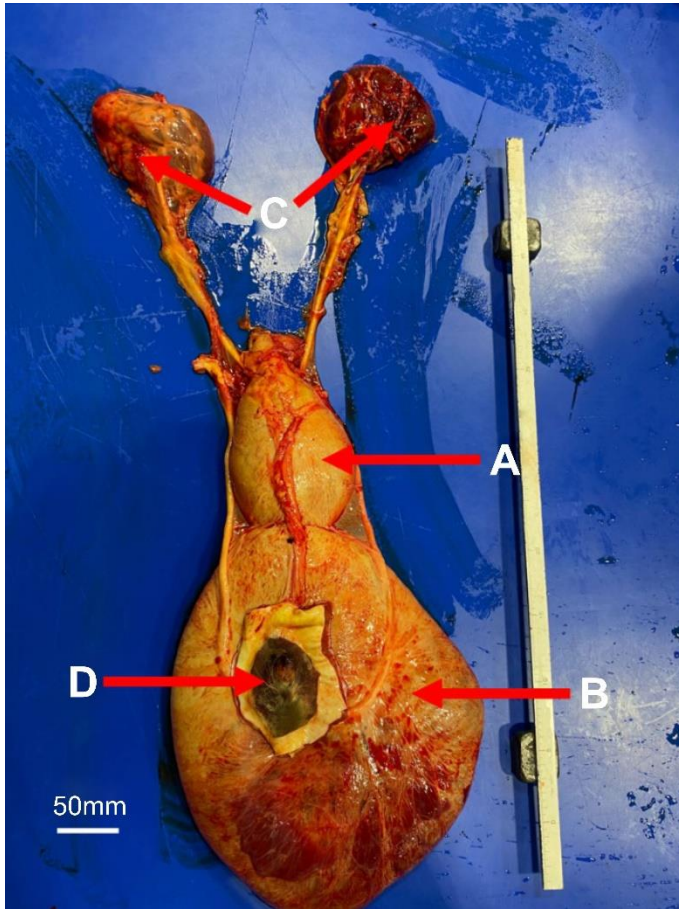


Fig 4-6 Autopsy findings of the fetal bladder and kidneys: the primary (arrow A, 125 mm in the long axis and 100 mm in the short axis) and secondary bladder (arrow B, 300 mm in the long axis and 225 mm in the short axis) were divided; fetal kidney (arrow C) and ureter without morphological abnormalities. No urachal structures were observed around the fetal umbilical cord (arrow D).

総括

北海道和種馬は日本において重要な動物である。保有数が年々減少する現状の中で、如何に保護するのが重要な課題の1つである。生産性向上の要として、流産防止は馬繁殖効率向上の一番の課題である。そのため、本研究は北海道和種馬妊娠馬に関する研究に着目し、第1章から第3章までの実験を行った。この研究を通じて、より効率的な北海道和種馬の生産を可能とすることを目標とした。

第1章では、北海道和種馬の正常妊娠時の胎子健康指標を計測した。妊娠時胎子のFEO、CTUP、FHR、FGL、FKL並びに妊娠馬の血中ホルモン測定は胎子評価の大事な指標である。後程の第3章においてもその重要性を表している。また本実験における最大の発見は胎子性腺の大きさと母体E₂濃度の相関が発見したことである。この結果から妊娠中の妊娠維持のためのE₂産生メカニズムと胎子性腺との関係が更に明らかになった。

第2章では、初めて馬を用いて3D超音波検査を使用し、妊娠早期胎子性別判断を行った。馬においての生前胎子性別判断は従来ほとんど2D超音波検査を使用した。本実験から、2D超音波検査より3D超音波検査は性別判断が容易になり、更に2D超音波検査より10日早めに性別判断が出来ることが判明した。将来3D超音波検査はより有用な胎子性別判断法として期待できる。

第3章は馬胎子巨大膀胱の症例報告である。馬の巨大膀胱は非常に稀な症例であり、この章では、馬胎子巨大膀胱の妊娠全期間の経過、胎子指標および母体ホルモン変化を詳細に記録した。この症例から得られたデータは将来馬胎子巨大膀胱の診断に有用と思われる。また本症例の観測はほとんど経腹壁超音波検査のみ可能であるため、改めて妊娠後期の経腹壁超音波検査の重要性も重視すべきと思われる。

最後に以上の実験から、更に北海道和種馬の妊娠に関する知見が深まり、将来的な北海道和種馬の生産に役立つこと、また、この知見を他の保有数の少ない馬でも応用できることが期待される。

謝辭

本研究の遂行ならびに本論文の執筆にあたり、終始御懇篤なるご指導およびご鞭撻、そして御校閲を賜りました帯広畜産大学教授 南保泰雄博士に心から拝謝いたします。

また、本論文を御審査していただきました、帯広畜産大学教授 松井基純博士、羽田真悟博士、滄木孝弘博士に深甚なる謝意を表します。

本研究の推敲および執筆にあたり、貴重なご指導ご助言を賜りました、Tsogtgerel Munkhtuul 博士、Reza Rajabi-toustani 博士および佐々木静香さん、そして、本研究のサポートにご協力いただいた南保研究室の皆様へ深謝申し上げます。

Abstract

The Hokkaido Native Pony is one of the eight native Japanese Native horse breeds that live in Japan. The Hokkaido Native Pony is 120-130 cm in height and has a mild temperament, making it suitable for horse-assisted therapy. However, the number of Hokkaido Native Pony is decreasing year by year. In addition, little research has been conducted on the breeding of Hokkaido Native Pony.

Ultrasound imaging is an important tool in the examination of equine reproduction. In order to improve the breeding efficiency of Hokkaido Native Pony, this study was conducted to investigate fertility in Hokkaido Native Pony using multifunctional ultrasound technology by conducting Experiments 1-3.

Experiment 1 measured fetal well-being parameters in normal Hokkaido Native Pony for the whole gestation period.

Embryo transplants were performed on 5 Hokkaido Native Pony and crossbreds from 2018-2020, totaling 7 gestational periods. Examinations were performed every week using an ultrasound imaging system to measure utero-placental thickness (CTUP); fetal eye orbital length (FEO); gonadal length (GL); and fetal heart rate (FHR) through the rectal or abdominal wall using linear and convex probes.

FHR reached a peak of 180 ± 6.3 beats/min from 9-13 weeks of gestation and then decreased until full-term; FEO could be measured from 10 weeks gestation and increased until full-term, reaching 35 ± 2.5 mm before delivery; CTUP could be measured from 13 weeks of gestation and increased until full-term, reaching 8.6 ± 0.6 mm before delivery; and GL was measured from 9 weeks of gestation and increased until full-term. GL was measurable from 16 weeks of gestation to full term and was peaked at 27-37 weeks of gestation, then decreased until full term.

FHR has the ability to detect fetal abnormalities such as fetal acid deficiency and cardiovascular system stunting, CTUP was used for ascending placentitis, and FEO was reported to be useful as a simple indicator of fetal development. In addition, GL was found to be consistent with estradiol secretion dynamics, which is important for the maintenance of pregnancy. This experiment will enable early detection of pregnancy abnormalities in Hokkaido Native Pony and is expected to improve equine productivity.

Experiment 2 used 3D ultrasound to determine the fetal gender of pony in early pregnancy.

A total of 9 pregnancies of 5 Hokkaido Native Pony were performed from 2020 to 2023. Fetal gender determination was performed once every 5 days between 50 and 100 days of gestation. At the time of examination, the fetal was first determined by transrectal examination with a linear type probe. Then, the probe was replaced with a 3D probe of the convex type, and the subabdominal region of the fetal was moved to the center of the screen. The fetal 3D volume was scanned three times when mares were at rest and then analyzed posteriorly.

Results showed that all 2D and 3D examination results were consistent with postpartum fetal sex. The gestational age at which fetal gender could be determined by 2D and 3D ultrasound ranged from 50 to 80 days of gestation. For 2D ultrasound, the highest detection rate was at 70 days gestation (66.7%). For 3D ultrasound, the highest detection rate was 60 days (55.6%).

Fetal gender determination in pregnant horses is a technique of enormous benefit. This experiment was the first study to evaluate the utility of 3D ultrasound fetal gender determination in pony. In this experiment, all fetal 3D ultrasound images from gestation 50 to 100 days were feasible. The advantage of 3D ultrasound is that it can scan the fetus without changing the angle of the probe during the examination, which is considered to be more accurate than 2D ultrasound.

Experiment 3 was a case report of early detection of fetal enlarge bladder by transabdominal ultrasound prenatal diagnosis.

The pregnant mare in this case was an 8-year-old Hokkaido Native Pony whose embryo was transferred from a Kiso-pony in Nagano on June 10, 2021, and arrived at Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine on the same day. At 215 days of gestation, a low-intensity ultrasound image of a fetal abdominal abnormality was observed for the first time during transabdominal ultrasound examination. Subsequently, at 229 days of gestation, it was determined that the abnormal image was the bladder, based on its position in relation to the other organs. Thereafter, the abnormal bladder was visible until delivery, and its volume increased as the pregnancy progressed.

Since the fetus did not appear to give birth until 30 days past the due date,

delivery was induced at 363 days of gestation, and a live foal was born. The foal was euthanized without treatment due to congenital defects other than an enlarged bladder.

This was the first case in which a giant bladder in a fetus was observed during prenatal diagnosis, and the fetus was subsequently born alive. In this case, the fetal enlarged bladder was found to have no effect on other health parameters. Surprisingly, the fetus was born alive without bladder rupture. Thus, the enlarged bladder in an equine fetus can be detected by ultrasonography even at the gestational stage. Compared to the fetus that was not examined prenatally, the treatment can be performed more quickly and precisely. On the other hand, in the clinical enlarged bladder can also be associated with hydronephrosis. In the present case, the kidneys were not abnormal until delivery. Further studies are required to clarify the mechanism of enlarged bladder complications. Finally, although there are still many unclear issues regarding equine congenital diseases, widespread prenatal examination of equine fetuses can be expected to increase the survival rate of equine fetuses by identifying the condition of the fetus at the gestational stage and preparing for treatment of fetal abnormalities before delivery.

The data collected in this study is expected to be fundamental research that can contribute to improving the productivity of Hokkaido Native Pony in the future.

参考文献

- [1] 近藤誠司. 日本の馬 在来馬過去・現在・未来. 東京大学出版会; 2021.
- [2] 公益社団法人日本馬事協会. 日本在来馬の飼養頭数の推移. 2023.
- [3] Promerová M, Andersson LS, Juras R, Penedo MCT, Reissmann M, Tozaki T, et al. Worldwide frequency distribution of the “Gait keeper” mutation in the DMRT3 gene. *Anim Genet* 2014;45:274–82. <https://doi.org/10.1111/age.12120>.
- [4] Sudhadevi M. Equine assisted therapy. *International Journal of Multidisciplinary Educational Research* 2020;9:136–40.
- [5] Araujo TB de, Oliveira RJ de, Martins WR, Pereira M de M, Copetti F, Safons MP. Effects of hippotherapy on mobility, strength and balance in elderly. *Arch Gerontol Geriatr* 2013;56:478–81. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2012.12.007>.
- [6] Kwon J-Y, Chang HJ, Lee JY, Ha Y, Lee PK, Kim Y-H. Effects of hippotherapy on gait parameters in children with bilateral spastic cerebral palsy. *Arch Phys Med Rehabil* 2011;92:774–9.
- [7] Tseng S-H, Chen H-C, Tam K-W. Systematic review and meta-analysis of the effect of equine assisted activities and therapies on gross motor outcome in children with cerebral palsy. *Disabil Rehabil* 2013;35:88–99.
- [8] Benda W, McGibbon NH, Grant KL. Improvements in muscle symmetry in children with cerebral palsy after equine-assisted therapy (hippotherapy). *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 2004;9:817–25.
- [9] Bronson C, Brewerton K, Ong J, Palanca C, Sullivan SJ. Does hippotherapy improve balance in persons with multiple sclerosis: A systematic review. *Eur J Phys Rehabil Med* 2010;46:347–53.
- [10] Cuypers K, Ridder K de, Strandheim A. The Effect of Therapeutic Horseback Riding on 5 Children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder: A Pilot Study. *J Altern Complement Med* 2011;17:901–8. <https://doi.org/10.1089/acm.2010.0547>.
- [11] Borioni N, Marinaro P, Celestini S, del Sole F, Magro R, Zoppi D, et al. Effect of equestrian therapy and onotherapy in physical and psycho-social performances of adults with intellectual disability: A preliminary study of evaluation tools based on the ICF classification. *Disabil Rehabil* 2012;34:279–87. <https://doi.org/10.3109/09638288.2011.605919>.
- [12] McDaniel Peters BC, Wood W. Autism and Equine-Assisted Interventions: A Systematic Mapping Review. *J Autism Dev Disord* 2017;47:3220–42. <https://doi.org/10.1007/s10803-017-3219-9>.
- [13] L.Gabriels R, Pan Z, Dechant B, Agnew JA, Brim N, Mesibov G. Randomized

- Controlled Trial of Therapeutic Horseback Riding in Children and Adolescents With Autism Spectrum Disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2015;54:541–9.
- [14] Jacobson BH, Thompson B, Wallace T, Brown L, Rial C. Independent static balance training contributes to increased stability and functional capacity in community-dwelling elderly people: a randomized controlled trial. *Clin Rehabil* 2011;25:549–56. <https://doi.org/10.1177/0269215510392390>.
- [15] O.J. Ginther. *Reproductive Biology of the Mare. Basic and Applied Aspects*. Equiservices, Cross Plains, Wisconsin; 1979.
- [16] Ginther OJ. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. *J Reprod Fertil* 1990;90:311–20. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0900311>.
- [17] Zawilska JB. Melatonin as a chemical indicator of environmental light-dark cycle. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 1996;56:757–67.
- [18] Benarroch EE. Suprachiasmatic nucleus and melatonin. *Neurology* 2008;71:594. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000324283.57261.37>.
- [19] Scraba ST, Ginther OJ. Effects of lighting programs on onset of the ovulatory season in mares. *Theriogenology* 1985;24:667–79.
- [20] Walsh CM, Prendergast RL, Sheridan JT, Murphy BA. Blue light from light-emitting diodes directed at a single eye elicits a dose-dependent suppression of melatonin in horses. *Veterinary Journal* 2013;196:231–5. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.09.003>.
- [21] Guerin M V., Wang XJ. Environmental temperature has an influence on timing of the first ovulation of seasonal estrus in the mare. *Theriogenology* 1994;42:1053–60. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90127-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90127-5).
- [22] *Reproduction E. Defective Oocytes as a Cause of Subfertility in Old Mares* 1. vol. 1. 1995.
- [23] Stout TAE. Equine embryo transfer: Review of developing potential. *Equine Vet J* 2006;38:467–78. <https://doi.org/10.2746/042516406778400529>.
- [24] Allen WR, Stewart F. Equine placentation. *Reprod Fertil Dev* 2002;13:623–34.
- [25] McCue PM. Superovulation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 1996;12:1–11. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30291-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30291-2).
- [26] Allen WR, Rowson LEA. Transfer of ova between horses and donkeys. *Proceedings of the seventh international congress on animal reproduction and artificial insemination, 1972*, p. 484–7.
- [27] Oguri N, Tsutsumi Y. Non-surgical egg transfer in mares. *J Reprod Fert*

- 1974;41:313–20.
- [28] Hannan MA, Haneda S, Itami Y, Wachi S, Saitoh T, Cheong SH, et al. Successful embryo transfer from hokkaido native pony after artificial insemination with frozen semen. *Journal of Veterinary Medical Science* 2019;81:241–4. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0414>.
- [29] Samper J, Estrada AJ, Kinnon AO. Embryo Storage. *Current Therapy in Equine Reproduction*, 20007, p. 322–4.
- [30] Wilson J, Caceci T, Potter GD. Ultrastructure of cryopreserved horse embryos. *J Reprod Fertil* 1987;35:405–17.
- [31] Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at –196 °C by vitrification. *Nature* 1985;313:573–5. <https://doi.org/10.1038/313573a0>.
- [32] Stout TAE. Cryopreservation of equine embryos: current state-of-the-art. *Reproduction in Domestic Animals* 2012;47:84–9. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02030.x>.
- [33] Rajabi-Toustani R, Watanabe H, Tsogtgerel M, Gao Y, Canbo L, Haneda S, et al. Evaluating the use of piezo manipulator, laser or their combination for blastocoel cavity puncture to improve cryopreservation outcomes of large equine embryos. *Reproduction in Domestic Animals* 2021;In press:1–5. <https://doi.org/10.1111/rda.13990>.
- [34] Rajabi-toustani R, Tsogtgerel M, Gao Y, Sakato M, Haneda S, Hon CHEONG S, et al. First Kiso pony foal produced via transfer of long-distance shipped fresh embryo to Hokkaido native pony. *J Reprod Dev* 2023;69:125–8.
- [35] Ortega-Ferrusola C, Gómez-Arrones V, Martín-Cano FE, Gil MC, Peña FJ, Gaitskell-Phillips G, et al. Advances in the ultrasound diagnosis in equine reproductive medicine: New approaches. *Reprod Domest Anim* 2022;57:34–44. <https://doi.org/10.1111/rda.14192>.
- [36] Cuervo-Arango J, Martín-Peláez MS, Claes AN. A practical guide to estimate the age of the early CL by ultrasonography in mares examined for the first time to be used as recipients in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology* 2020;153:48–53. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.003>.
- [37] Galvão AM, Ferreira-Dias G, Skarzynski DJ. Cytokines and Angiogenesis in the Corpus Luteum. *Mediators Inflamm* 2013;2013:420186. <https://doi.org/10.1155/2013/420186>.
- [38] Harrison RJ. The early development of the corpus luteum in the mare. *J Anat* 1946;80:160–6.
- [39] Ferreira CSC, Morais R de CL, de Andrade ABP, Balaro MFA, Ribas JAS, Gomes

- GM, et al. Spectral Doppler ultrasound in selecting an equine embryo receiver. *Reproduction in Domestic Animals* 2020;55:747–52. <https://doi.org/10.1111/rda.13676>.
- [40] Panzani D, Di Vita M, Lainé AL, Guillaume D, Rota A, Tesi M, et al. Corpus Luteum Vascularization and Progesterone Production in Autumn and Winter Cycles of the Mare: Relationship Between Ultrasonographic Characteristics of Corpora Lutea and Plasma Progesterone Concentration in the Last Cycles Before Anestrus. *J Equine Vet Sci* 2017;56:35–9. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.05.001>.
- [41] Liu IKM, Troedsson MHT. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. *Theriogenology* 2008;70:415–20. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.040>.
- [42] Abdelnaby EA, Emam IA, Salem NY, Ramadan ES, Khattab MS, Farghali HA, et al. Uterine hemodynamic patterns, oxidative stress, and chromoendoscopy in mares with endometritis. *Theriogenology* 2020;158:112–20. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.09.012>.
- [43] Hong CB, Donahue JM, Giles RC, Petrites-Murphy MB, Poonacha KB, Roberts AW, et al. Equine abortion and stillbirth in central Kentucky during 1988 and 1989 foaling seasons. *J Vet Diagn Investig* 1993;5:560–6. <https://doi.org/10.1177/104063879300500410>.
- [44] Reef VB, Vaala WE, Worth LT, Sertich PL, Spencer PA. Ultrasonographic assessment of fetal well-being during late gestation: Development of an equine biophysical profile. *Equine Vet J* 1996;28:200–8. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1996.tb03773.x>.
- [45] Bucca S, Fogarty U, Collins A, Small V. Assessment of feto-placental well-being in the mare from mid-gestation to term: Transrectal and transabdominal ultrasonographic features. *Theriogenology* 2005;64:542–57. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.011>.
- [46] Gao Y, Hannan MA, Murase K, Rajabi-Toustani R, Nambo Y. Ultrasonographic examination of equine fetal growth parameters throughout gestation in pony for Equine-Assisted Therapy. *J Vet Med Sci* 2022;84:74–81. <https://doi.org/10.1292/jvms.21-0301>.
- [47] Murase H, Endo Y, Tsuchiya T, Kotoyori Y, Shikichi M, Ito K, et al. Ultrasonographic evaluation of equine fetal growth throughout gestation in normal mares using a convex transducer. *J Vet Med Sci* 2014;76:947–53. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0259>.

- [48] Vincze B, Baska F, Papp M, Szenci O. Introduction of a new fetal examination protocol for on-field and clinical equine practice. *Theriogenology* 2019;125:210–5. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.004>.
- [49] Bollwein H, Mayer R, Stolla R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during early pregnancy in mares. *Theriogenology* 2003;60:597–605. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00080-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00080-3).
- [50] Bollwein H, Weber F, Kolberg B, Stolla R. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology* 2002;57:2129–38. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00703-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00703-3).
- [51] Dugoff L, Lynch AM, Cioffi-Ragan D, Hobbins JC, Schultz LK, Malone FD, et al. First trimester uterine artery Doppler abnormalities predict subsequent intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:1208–12. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.06.054>.
- [52] Bollwein H, Weber F, Woschée I, Stolla R. Transrectal Doppler sonography of uterine and umbilical blood flow during pregnancy in mares. *Theriogenology* 2004;61:499–509. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00225-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00225-5).
- [53] Ohkuchi A, Minakami H, Sato I, Mori H, Nakano T, Tateno M. Predicting the risk of pre-eclampsia and a small-for-gestational-age infant by quantitative assessment of the diastolic notch in uterine artery flow velocity waveforms in unselected women. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2000;16:171–8. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0705.2000.00192.x>.
- [54] Bower S, Kingdom J, Campbell S. Objective and subjective assessment of abnormal uterine artery Doppler flow velocity waveforms. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 1998;12:260–4. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0705.1998.12040260.x>.
- [55] Curran S, Ginther OJ. Ultrasonic diagnosis of equine fetal sex by location of the genital tubercle. *J Equine Vet Sci* 1989;9:77–83. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(89\)80032-2](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(89)80032-2).
- [56] Kotoyori Y, Yokoo N, Ito K, Murase H, Sato F, Korosue K, et al. Three-dimensional ultrasound imaging of the equine fetus. *Theriogenology* 2012;77:1480–6. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.020>.
- [57] Renaudin CD, Gillis CL, Tarantal AF. Transabdominal ultrasonographic determination of fetal gender in the horse during mid-gestation. *Equine Vet J* 1999;31:483–7. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1999.tb03855.x>.
- [58] Pricking S, Spilker K, Martinsson G, Rau J, Tönißen A, Bollwein H, et al. Equine Fetal Gender determination in mid- and advanced gestation by transabdominal

- approach - Comparative study using 2D B-Mode ultrasound, Doppler sonography, 3D B-Mode and following tomographic ultrasound imaging. *Pferdeheilkunde* 2019;35:11–9. <https://doi.org/10.21836/PEM20190102>.
- [59] Conley AJ, Ball BA. Steroids in the establishment and maintenance of pregnancy and at parturition in the mare. *Reproduction* 2019;158:197–208. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0179>.
- [60] Hannan MA, Murata K, Takeuchi S, Haneda S, Cheong SH, Nambo Y. Secretion of equine chorionic gonadotropin (eCG) and its association with supplementary corpus luteum formation and progesterone concentration in Hokkaido native pony recipient mares. *Domest Anim Endocrinol* 2019;72:106424. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2019.106424>.
- [61] Shikichi M, Iwata K, Ito K, Miyakoshi D, Murase H, Sato F, et al. Abnormal pregnancies associated with deviation in progesterin and estrogen profiles in late pregnant mares: A diagnostic aid. *Theriogenology* 2017;98:75–81. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.024>.
- [62] Hay MF, Allen WR. An ultrastructural and histochemical study of the interstitial cells in the gonads of the fetal horse. *J Reprod Fertil Suppl* 1975;23:557–61.
- [63] Weeson JA, Ginther OJ. Fetal and maternal gonads and gonadotropins in the pony. *Biol Reprod* 1980;22:735–43. <https://doi.org/10.1095/biolreprod22.4.735>.
- [64] Pashen RL, Allen WR. Endocrine changes after foetal gonadectomy and during normal and induced parturition in the mare. *Anim Reprod Sci* 1979;2:271–88. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(79\)90053-8](https://doi.org/10.1016/0378-4320(79)90053-8).
- [65] Allen WR, Wilsher S, Tiplady C, Butterfield RM. The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. Endocrinology of pregnancy. *Reproduction* 2004;127:67–77. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00024>.
- [66] Ricard RM, St-Jean G, Duizer G, Atwal H, Wobeser BK. A 13-year retrospective study of equine abortions in Canada. *Can Vet J* 2022;63:715–21.
- [67] Laugier C, Foucher N, Sevin C, Leon A, Tapprest J. A 24-year retrospective study of equine abortion in Normandy (France). *J Equine Vet Sci* 2011;31:116–23. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2010.12.012>.
- [68] Tengelsen LA, Yamini B, Mullaney TP, Bell TG, Render JA, Patterson JS, et al. A 12-year retrospective study of equine abortion in Michigan. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1997;9:303–6. <https://doi.org/10.1177/104063879700900312>.
- [69] Cummins C, Carrington S, Fitzpatrick E, Duggan V. Ascending placentitis in the mare: A review. *Ir Vet J* 2008;61:307–13. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-61-5->

307.

- [70] LeBlanc MM. Ascending placentitis in the mare: An update. *Reprod Domest Anim* 2010;45:28–34. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01633.x>.
- [71] Wynn MAA, Ball BA, May J, Esteller-Vico A, Canisso I, Squires E, et al. Changes in maternal pregnane concentrations in mares with experimentally-induced, ascending placentitis. *Theriogenology* 2018;122:130–6. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.09.001>.
- [72] Bailey CS, Heitzman JM, Buchanan CN, Bare CA, Sper RB, Borst LB, et al. B-mode and Doppler ultrasonography in pony mares with experimentally induced ascending placentitis. *Equine Vet J* 2012;44:88–94. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00658.x>.
- [73] Kelleman AA, Luznar SL, Lester GD, Paccamonti DL, LeBlanc MM. Evaluation of transrectal ultrasonographic combined thickness of the uterus and placenta (CTUP) in a model of induced ascending placentitis in late gestation in the pony mare. *Theriogenology* 2002;58:845–8. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00785-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00785-9).
- [74] Curran S, Ginther OJ. M-MODE ultrasonic assessment of equine fetal heart rate. *Theriogenology* 1995;44:609–17. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(95\)00241-y](https://doi.org/10.1016/0093-691x(95)00241-y).
- [75] Turner RM, McDonnell SM, Feit EM, Grogan EH, Foglia R. Real-time ultrasound measure of the fetal eye (vitreous body) for prediction of parturition date in small ponies. *Theriogenology* 2006;66:331–7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.11.019>.
- [76] Renaudin CD, Gillis CL, Tarantal AF, Coleman DA. Evaluation of equine fetal growth from day 100 of gestation to parturition by ultrasonography. *J Reprod Fertil Suppl* 2000;56:651–60.
- [77] Ferrer MS, Jones M, Anderson DE, Larson R. Ultrasonographic parameters of fetal well-being and development in alpacas. *Theriogenology* 2013;79:1236–46. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.03.011>.
- [78] Efrat Z, Akinfenwa OO, Nicolaides KH. First-trimester determination of fetal gender by ultrasound. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 1999;13:305–7. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0705.1999.13050305.x>.
- [79] Renaudin CD, Gillis CL, Tarantal AF. Transabdominal ultrasonographic determination of fetal gender in the horse during mid-gestation. *Equine Vet J* 1999;31:483–7. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1999.tb03855.x>.
- [80] Bucca S. Equine fetal gender determination from mid- to advanced-gestation by ultrasound. *Theriogenology* 2005;64:568–71.

- <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.013>.
- [81] Velde M Van de, Roels K, Ververs C, Gerits I, Govaere J. Equine foetal gender determination in mid- to late gestational mares: A practical inquiry. *Reproduction in Domestic Animals* 2018;53:1027–32. <https://doi.org/10.1111/rda.13211>.
- [82] Pooh RK, Kurjak A. Three-dimensional ultrasound in detection of fetal anomalies. *Donald School Journal of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2016;10:214–34. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10009-1471>.
- [83] Namburete AIL, Xie W, Noble JA. Robust regression of brain maturation from 3D fetal neurosonography using CRNs. *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, vol. 10554 LNCS, Springer Verlag; 2017, p. 73–80. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67561-9_8.
- [84] Gerards FA, Engels MAJ, Twisk JWR, Van Vugt JMG. Normal fetal lung volume measured with three-dimensional ultrasound. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2006;27:134–44. <https://doi.org/10.1002/uog.2672>.
- [85] El Guindi W, Dreyfus M, Carles G, Lambert V, Herlicoviez M, Benoist G. 3D ultrasound and Doppler angiography for evaluation of fetal cardiovascular anomalies. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2013;120:173–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2012.08.015>.
- [86] Zheng Yong Ping and Lee TTY. 3D Ultrasound Imaging of the Spine. In: Laugier Pascal and Grimal Q, editor. *Bone Quantitative Ultrasound: New Horizons*, Cham: Springer International Publishing; 2022, p. 349–72. https://doi.org/10.1007/978-3-030-91979-5_16.
- [87] Makled AK, Hamed ME-S. Prenatal three-dimensional ultrasonography in diagnosing fetal renal anomalies. *Evidence Based Women’s Health Journal* 2012;2:60–3. <https://doi.org/10.1097/01.ebx.0000413116.90725.7c>.
- [88] Grinbaum ML, Bianchi-Ferraro AMHM, Rodrigues CA, Sartori MGF, Bella ZKLJ Di. Impact of parity and delivery mode on pelvic floor function in young women: a 3D ultrasound evaluation. *Int Urogynecol J* 2023. <https://doi.org/10.1007/s00192-022-05440-x>.
- [89] Ibrahim N, Bleichert S, Klopff J, Kurzreiter G, Knöbl V, Hayden H, et al. 3D Ultrasound Measurements Are Highly Sensitive to Monitor Formation and Progression of Abdominal Aortic Aneurysms in Mouse Models. *Front Cardiovasc Med* 2022;9. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.944180>.
- [90] Vasquez EJ, Kendall A, Musulin S, Vaden SL. Three-dimensional bladder ultrasound to measure daily urinary bladder volume in hospitalized dogs. *J Vet*

- Intern Med 2021;35:2256–62. <https://doi.org/10.1111/jvim.16232>.
- [91] Karadaev M, Fasulkov I, Vasilev N, Hristov K, Fedev I. Three-dimensional (3D) ultrasound investigations for monitoring of the second and third pregnancy trimester in goats. *Tradition and Modernity in Veterinary Medicine* 2019;4:72–6.
- [92] Whitlow BJ, Lazanakis MS, Economides DL. The sonographic identification of fetal gender from 11 to 14 weeks of gestation. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 1999;13:301–4. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0705.1999.13050301.x>.
- [93] Michailidis GD, Papageorgiou P, Morris RW, Economides DL. The use of three-dimensional ultrasound for fetal gender determination in the first trimester. *British Journal of Radiology* 2003;76:448–51. <https://doi.org/10.1259/bjr/13479830>.
- [94] de Zwarte SMC, Teeuw J, He J, Bekker MN, van Sloun RJG, Hulshoff Pol HE. Automated segmentation of fetal intracranial volume in 3D ultrasound using deep learning: identifying sex differences in prenatal brain development. *BioRxiv* 2022:2022.12.19.521094. <https://doi.org/10.1101/2022.12.19.521094>.
- [95] Luetic AT, Kurjak A. Prenatal ultrasound diagnosis of fetal urogenital anomalies. *Donald School Journal of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2016;10:301–7. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10009-1476>.
- [96] Pinette MG, Blackstone J, Wax JR, Cartin A. Enlarged fetal bladder: Differential diagnosis and outcomes. *Journal of Clinical Ultrasound* 2003;31:328–34. <https://doi.org/10.1002/jcu.10179>.
- [97] Whitten SM, Wilcox DT. Enlarged fetal bladders: Aetiology, management and outcome. *Prenat Diagn* 2001;21:958–63. <https://doi.org/10.1002/pd.227>.
- [98] Taghavi K, Sharpe C, Stringer MD. Fetal megacystis: A systematic review. *J Pediatr Urol* 2017;13:7–15. <https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2016.09.003>.
- [99] Denys M, Thomas-Cancian A, Tortereau A, Josson-Schramme A, Buff S. Prenatal diagnosis of megacystitis and hydronephrosis in an equine fetus: How transabdominal ultrasonography can help to diagnose fetal abnormalities. *J Equine Vet Sci* 2020;85:102877. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.102877>.
- [100] Körner I. Fetal bladder development. A current overview. *Urologe A* 2007;46:1643–6. <https://doi.org/10.1007/s00120-007-1579-z>.
- [101] Tublin M, Borhani AA, Furlan A, Heller MT, editors. *Bladder Diverticulum. Diagnostic Imaging: Genitourinary (Third Edition)*, Philadelphia: Elsevier; 2016, p. 368–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-37708-9.50108-2>.
- [102] Kimura Y, Haneda S, Aoki T, Furuoka H, Miki W, Fukumoto N. Combined thickness of the uterus and placenta and ultrasonographic examinations of uteroplacental tissues in normal pregnancy, placentitis, and abnormal

parturitions in heavy draft horses. *J Equine Sci* 2018;29:1–8.