

乳牛の炎症性疾患が繁殖成績に与える影響に関する研究

北出 泰之

乳牛の炎症性疾患が繁殖成績に与える影響に関する研究

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

獣医学専攻博士課程

北出 泰之

生産動物外科学

指導教員 教授 鈴木 一由

2022 年度

目次

緒言	・ ・ ・	1
第1章	乳牛における繁殖成績を増悪させる分娩後疾患の解析	・ ・ ・ 6
1.1	タイストール酪農場における発生頻度の高い疾患の特定	・ ・ ・ 7
1.1.1	供試データ	
1.1.2	分析	
1.1.3	結果	
1.1.4	考察	
1.2	繁殖成績（AI回数、FAID、空胎日数）に与える影響の調査	・ ・ ・ 10
1.2.1	材料および方法	
1.2.2	統計解析	
1.2.3	結果	
1.2.4	考察	
1.3	乳房炎が繁殖成績に与える影響とリスク因子の特定	・ ・ ・ 12
1.3.1	材料および方法	
1.3.2	統計解析	
1.3.3	結果	
1.3.4	考察	
1.4	小括	・ ・ ・ 15

第2章 分娩後 15 日における子宮内および全身性炎症に基づいた 子宮内膜炎の予測	・ ・ ・ 24
2.1 子宮灌流液中 ETX 活性値の測定方法の検討	・ ・ ・ 25
2.1.1 材料および方法	
2.1.2 結果	
2.1.3 考察	
2.2 分娩後 15 日における子宮内および全身性炎症に基づいた 子宮内膜炎の予測	・ ・ ・ 28
2.2.1 材料および方法	
2.2.2 統計解析	
2.2.3 結果	
2.2.4 考察	
2.3 小括	・ ・ ・ 35
第3章 分娩直後の無結晶酸セフトロラムの全身投与が繁殖成績に 与える影響	・ ・ ・ 41
3.1 材料および方法	・ ・ ・ 42
3.2 統計解析	・ ・ ・ 44
3.3 結果	・ ・ ・ 44
3.4 考察	・ ・ ・ 44
3.5 小括	・ ・ ・ 45
総括	・ ・ ・ 49

謝辞	・ ・ ・ 59
利益相反	・ ・ ・ 61
引用文献	・ ・ ・ 62
略語一覧	・ ・ ・ 70
成績の公表	・ ・ ・ 72
英文要旨	・ ・ ・ 73

緒言

繁殖成績は酪農収益性に対して直接的に影響を及ぼす[4]。過去 30 年間で、牛の繁殖成績は世界的に低下してきた[16]。以前は、乳牛における繁殖成績の低下は乳量の増加が原因であるという考えが一般的であった [42]。しかし乳量以外にも、産次数、分娩の季節、分娩後疾患などの要因によって繁殖成績が低下することが明らかになってきている[48]。特に、分娩後疾患は影響が大きいとされる[53]。

過去の研究では、生殖器疾患（卵巣機能障害、子宮炎、胎盤停滞、難産、および流産）だけでなく、代謝性疾患（ケトーシスおよび乳熱）および乳房炎も乳牛の繁殖成績に関連していることが示されている [11, 31]。乳房炎と繁殖成績の関係はあまり知られていないが、過去に Windig ら（2005）は体細胞数が多いほど繁殖成績が低いという結果を報告している。また乳房炎は、臨床型、潜在性を問わず繁殖成績を低下させる可能性を示唆する研究結果もある[1, 12]。

乳房炎が繁殖成績を低下させる原因として、グラム陽性菌の細胞外毒素およびグラム陰性菌のエンドトキシンそれぞれが卵胞の成長に影響を与えることが示唆されている [12]。一方で、乳房炎はその原因菌により、炎症の重症度や持続性に違いがあるため[41]、どのような乳房炎の病態が繁殖成績に影響を及ぼすかについては明らかではない。

繁殖計画を考える上で全身または生殖器の炎症程度を評価することの重要性は言うまでもない。子宮内膜炎には、臨床型子宮内膜炎と潜在性子宮内膜炎がある[45]。Sheldon ら（2006）は臨床型、潜在性を問わず子宮内膜炎は受胎率を低下させ、空胎日数を延長することを報告している[45]。臨床型子宮内膜炎は子宮からの膿および滲出液の排出を特徴とし、分娩後 21 日目以降になっても上記の症状があるものを指す[45]。この疾患は乳牛のおよそ 20%が罹患するとされており、農場ごと

の発生率は 5 - 30%と指摘されている[14]。一方、潜在性子宮内膜炎は乳牛のおよそ 30 %が罹患するとされており、農場ごとの発生率は 11 - 70 %と推察されている[14]。潜在性子宮内膜炎は臨床型子宮内膜炎に特徴的な臨床症状を示さず、多くの症例は超音波検査でも子宮内に異常が認められない。潜在性子宮内膜炎では子宮内の多形核白血球 (PMN) の割合 (PMN%) が増加する[21]ことから、潜在性子宮内膜炎の診断には PMN%が利用される[45]。潜在性子宮内膜炎を診断するための PMN% は研究によって相違があるものの、PMN%が分娩後 21 から 33 日目において 10%以上または分娩後 37 から 50 日目において 5%以上とされている[13]。

分娩後初期に子宮内に感染する機会が多いのはグラム陰性菌である大腸菌群 (Coliform) であることが知られている[43]。グラム陰性菌はリポポリサッカライド (LPS:Lipopolysaccharide) で構成される細胞壁をもち、これがエンドトキシン (ETX) に由来した全身性炎症を惹起する。反芻動物では ETX に対する病態生理学的影響は用量依存であり、さまざまな代謝的および臨床兆候を誘発する[29]。ETX は炎症の原因物質であるため子宮灌流液中の ETX 活性値を測定することは子宮内の炎症状況を把握する上で有用な指標と考えられる。さらに、子宮内での ETX 活性値の上昇は子宮内でのグラム陰性菌の存在を示し、培養検査にて菌検出ができなかった場合でも子宮内の感染状況を把握する上で有用であると思われる。もし、子宮灌流液中の ETX 活性値による子宮内膜炎の診断が PMN%を用いたそれと比較してより早期に行うことが可能であれば、子宮内膜炎の予防または早期治療が可能となり、ひいては受胎率の低下を防ぐことに貢献すると考えられる。

子宮炎の治療法は、抗生物質の子宮内もしくは全身投与が主流である[6, 28]。子宮内膜炎の治療法としては抗生物質の子宮内投与が主たる選択肢として挙げられている[6,28]。過去には子宮内注入用のアンピシリン製剤やオキシテトラサイクリンを主剤とした腔内発泡剤などが我が国でも市販されていたが、今日ではこれらの販売は行われていない。一方で、従来のアンピシリンやオキシテトラサイクリンなどの抗生物質療法では臨床症状の改善は得られても繁殖成績を回復させる効果は期待できないという報告もある[15]。近年、異常産による子宮炎の治療法として分娩後 24 時間以内に無結晶酸セフトオフルの全身投与の有用性が報告されている[35]。我が国においても無結晶酸セフトオフルは剤形によりいくつかの製品が販売されている。そのうちのエクセーデ C (Zoetis Japan、東京) は 1 回の全身投与で 1 週間にわたって効果が持続する徐放性のセフトオフル製剤であり、さらに日本および米国においては乳汁の出荷制限が設定されていない。セフトオフルは炎症組織への移行性が高いことから、炎症を伴う子宮へも移行性がよい[34]。もし、徐放性の無結晶酸セフトオフル製剤の全身投与によって子宮内膜炎を予防することが可能であるならば、子宮内膜炎に起因する繁殖成績の低下に対する新たなアプローチとなるかもしれない。

そこで本研究の目的は乳牛における炎症性疾患が繁殖成績に与える影響について明らかにするとともに、子宮内膜炎の炎症評価および予防法を確立することとした。そのために (1) 乳牛の代表的な産後の炎症性疾患である乳房炎と繁殖成績の関係を評価、(2) 子宮灌流液中 ETX 活性値を用いた子宮内膜炎の評価、(3) 無結晶酸セフトオフル製剤の全身投与による子宮内膜炎の予防効果を検証した。

詳述すると、第1章では乳牛における乳房炎が繁殖成績に与える影響を疫学的に調査した。すなわち、第1章第1節ではタイストール酪農場における分娩後疾患および生殖器疾患の発生頻度を診療記録簿より調査した。第1章第2節では繁殖成績に対するそれら分娩後疾患および生殖器疾患が繁殖成績に与える影響を調査した。さらに第1章第3節では乳房炎の原因菌種やその炎症グレードの違いが繁殖成績の低下に影響を与えるか否かについて明らかにした。繁殖計画を考える上で生殖器の炎症程度を早期に評価することは極めて重要である。第2章では炎症の直接物質である ETX と全身性炎症の指標となる血清アミロイド A (SAA) を指標として、分娩後 15 日の子宮内炎症の状態を評価し、これらの炎症指標によって分娩後 45 日目の子宮内膜炎の発症を予測できるか否かを検討した。すなわち、第2章第1節では子宮灌流液中 ETX 活性値の測定方法の確立を行った。第2章第2節ではこの技術を用いて分娩後 15 日における子宮内および全身性炎症に基づいた子宮内膜炎の予測が可能か否かを検討した。第3章では、子宮内膜炎の予防策として無結晶酸セフトロフル製剤の全身投与が子宮内膜炎の予防に効果を示すか否か、また繁殖成績を好転させるか否かを検討した。

本研究は、生産動物の臨床現場において重要な問題の一つと位置付けられている乳牛の繁殖成績の低下に対して、炎症性疾患が繁殖成績に与える影響について明らかにするとともに、新たな子宮内膜炎の炎症評価および予防法を検討した。これは酪農業において避けては通れない繁殖成績の改善という大きな問題に貢献するものである。

第 1 章

乳牛における繁殖成績を増悪させる分娩後疾患の解析

繁殖成績は酪農収益性に対して直接的に影響を及ぼす[4]。繁殖成績の低下は乳牛の乳量の増加に伴って顕著であることから[42]、乳量増加を続けている近代酪農において極めて深刻な問題である。一方、乳量との関係だけでは説明がつかない繁殖成績に影響を及ぼす因子についても多くの研究者が指摘をしている[10, 11, 31, 48]。特に、Windigら(2005)は、分娩後疾患こそが空胎日数を延長することを示している。しかし、我が国において乳牛の繁殖成績を増悪させる分娩後疾患の解析やその影響について詳細な報告はなく、これまで指摘されてきた分娩時の季節および産次数の影響[17, 39]との比較もされていない。従って、本章では、繁殖成績に影響を及ぼす分娩後疾患を調査し、それらの疾患がどのような繁殖成績に影響を及ぼすのか、分娩時の季節および産次数を含めて因子解析を行なうことでより強い影響力を持つ因子を割り出した。また、乳房炎は臨床型、潜在性を問わず繁殖成績を低下させる可能性を示唆する研究結果[1, 12]がある。従って、本章では繁殖成績を低下させる乳房炎の原因菌種やその炎症グレードの違いが繁殖成績の低下に影響を与えるか否かについての検証も併せて行った。

1.1 タイストール酪農場における発生頻度の高い疾患の特定

第1章第1節では、発生頻度の高い分娩後疾患を特定した。飼養形態は乳牛の疾病分布に大きく影響することが知られている[51]。北海道道南地区では我が国の他の地域と同様に酪農場の大半がタイストール農場であることから、本章ではタイストール農場を対象に検討を行った。

1.1.1 供試データ

本研究では、2016年4月から2018年3月までの間に9箇所の民間タイストール酪農場において、814回の分娩（473頭のホルスタイン種乳牛、複数分娩あり）に関連した治療記録簿のデータを解析に用いた。本研究で対象とした9酪農場は全て、ゴム製のマットレスを備えたタイストール牛舎で、1日2回搾乳、分離給餌にて管理していた。表1.1.1に各農場の飼養頭数、供試牛の平均年齢、産次数および自発的待機期間（VWP）を要約した。

全ての供試牛に対して、発情発見は陰部充血と外陰部腫脹、粘液の分泌、うなり声を含む一般的な発情兆候に基づいて各農場の酪農家が行った。発情発見された際には、酪農家よりみなみ北海道農業共済組合所属の獣医師に人工授精（AI）が依頼され、臨床獣医師が酪農家による発情発見後6-15時間以内にAIを実施した。全ての酪農場において、みなみ北海道農業共済組合に所属する臨床獣医師が2週間ごとに繁殖障害の治療と妊娠診断を含む繁殖健診を実施している。本検診では、分娩後40日から妊娠までを検診対象とした。妊娠は、AIの30日後および60日後に超音波検査によって確認した。

全ての分娩において、分娩時の牛の年齢、分娩産次数、分娩後から受胎するまでの治療記録、分娩年月日、全てのAI実施年月日（特に、分娩後最初のAI日（FAID））、妊娠確認された牛では妊娠年月日（最終授精日）、妊娠が確認されなかったまたは淘汰された牛では死亡または淘汰日を記録した。治療記録はみなみ北海道農業共済組合で管理されているデータを用いた。

分娩から妊娠または死亡または淘汰までの期間で発生した疾患の第一病名を治療記録として記録した。本研究では、分娩後60日までに死亡、または淘汰されるまでAIを受けなかった牛の分娩を除外した。

1.1.2 分析

全ての分娩において、分娩から受胎までの間に発生した疾患の第一病名の記録を集計した。合併症がある場合でも第一病名のみ記録した。分娩と受胎の間に複数回、診療カルテが発生した場合、全ての第一病名を記録し、そのそれぞれを集計に加えた。全ての疾患を合計し、最も頻度の高い 15 の疾患を決定した。

1.1.3 結果

全 814 回の分娩に対して、除外基準に該当したものは 94 回の分娩であり、分娩後 60 日以内の死亡および淘汰までに AI を受けなかったものはそれぞれ 34 および 60 回の分娩で認められた。分娩後 60 日以内の死亡原因はそれぞれ、乳房炎 (n = 10)、乳熱・ダウンナー症候群 (n = 8)、運動器疾患 (n = 5、関節炎、股関節脱臼および筋炎) およびその他 (n = 11、心不全、産褥熱、脊髄炎、腹膜炎、第四胃変位、第四胃食滞、脂肪肝および急性鼓張症) だった。AI を実施されずに淘汰された原因は、老齢、成績の不振、または乳中体細胞数の増加であった。従って、解析に用いたのは 720 回の分娩であった。

274 回の分娩で分娩後疾患の発症を認めなかった。最も発生頻度の高い上位 15 疾患を表 1.1.2 に要約した。つまり、高頻度の疾患から順に、乳房炎 (n = 207)、子宮内膜炎 (n = 164)、乳熱 (n = 97)、卵胞嚢腫 (n = 75)、卵巣静止 (n = 53)、難産 (n = 33)、ケトーシス (n = 29)、肺炎 (n = 25)、第四胃変位 (n = 25)、死産 (n = 22)、胎盤停滞 (n = 17)、血乳 (n = 16)、産褥熱 (n = 11)、下痢 (n = 11)、および子宮捻転 (n = 10) であった。

1.1.4 考察

民間の9酪農場における発生頻度の高い分娩後疾患のうち上位15疾患を特定できた。過去の調査においては特定の分娩後疾患のみを対象とする研究が多く、本研究のように農場で発生する全ての分娩後疾患を網羅的に調査する内容は著者の知る限りない。特にタイストール形態に着目する研究は見られず、今回、新しい知見を得ることができた。

1.2 繁殖成績（AI回数、FAID、空胎日数）に与える影響の調査

第1章第1節において、タイストール農場で発生頻度の高い分娩後疾患を特定した。これらの分娩後疾患がAI回数、FAIDおよび空胎日数に与える影響をロジスティック回帰分析により評価した。この評価にあたり、分娩時の季節および産次数の与える影響と比較する目的で、分娩時の季節および産次数と同時に因子解析を行なった。

1.2.1 材料および方法

第1章第1節で用いた全814回の分娩データのうち、除外基準に該当した94回の分娩データを除いた720回の分娩データを用いた。除外基準とは分娩後60日以内の死亡および淘汰までにAIを受けなかった個体のデータであり、それぞれ34および60回の分娩で認められた。

1.2.2 統計解析

全ての統計解析にはオープンソース・フリーソフトウェア、General Public License (GPL) 2.0 ライセンスの統計ソフト (R ver. 3.6.0、The Comprehensive R Archive Network が公開) を用いた。繁殖成績に関連し

た目的変数を AI 回数、FAID、および空胎日数と定めた。ロジスティック回帰分析を実施して、前述の繁殖成績に関する 3 つの目的変数に対して、農場、分娩時の季節および産次数との関連性を評価した（モデル 1）。そして、説明変数として第 1 節で明らかとなった分娩後に多発した 15 疾患を逐次導入した（モデル 2）。目的変数として使用するために、AI 回数（= 2）、FAID（= 83）および空胎日数（= 134）を中央値で区切り、中央値を超えるものをイベントあり、中央値以下をイベントなしと定めた。説明変数である農場、分娩時の季節および産次数のグレード分けを次のように定めた。すなわち、農場要因は各個別農場、季節要因は春（3 月～5 月）、夏（6 月～8 月）、秋（9 月～11 月）、冬（12 月～2 月）の季節、産次数要因は初産、2 産、および 3 産以上の 3 分類に定めた。解析結果として、オッズ比、95% 信頼区間、および p 値を示した。多重共線性は、分散膨張係数を使用して評価した。分散膨張係数は、全てのロジスティック回帰分析で 2 未満であった。

1.2.3 結果

農場、分娩時の季節、産次数について集計した結果を表 1.2.1 に示した。

表 1.2.2、1.2.3 および 1.2.4 にそれぞれ繁殖成績と AI 回数、FAID および空胎日数の関係を要約した。AI 回数において、中央値（= 2）を超えるリスク因子は子宮内膜炎、卵胞嚢胞、および下痢であった。これらの分娩後疾患のオッズ比（95% 信頼区間、 p 値）は、それぞれ 3.97（2.63 - 5.99、 $p < 0.001$ ）、1.94（1.11 - 3.39、 $p = 0.019$ ）および 9.02（1.52 - 53.38、 $p = 0.015$ ）であった。AI 回数については肺炎もリスク因子であることが示された。肺炎におけるオッズ比（95% 信頼区間、 p 値）は、

0.31 (0.11 - 0.86、 $p = 0.025$) であった (表 1.2.2、モデル 2)。

FAID について、農場と季節がリスク因子として示された。すなわち、秋に出産した牛は、FAID を延長する可能性が有意に低減し、この時のオッズ比 (95% 信頼区間、 p 値) は、0.53 (0.33 - 0.85、 $p = 0.008$) であった (表 1.2.3、モデル 1)。次に FAID と分娩後疾患との関係について、中央値 (= 83) を超えるリスク因子は卵巣静止のみであり、オッズ比 (95% 信頼区間、 p 値) は、それぞれ 11.09 (4.46 - 27.6、 $p < 0.001$) であった (表 1.2.3、モデル 2)。

空胎日数を延長するリスク因子は乳房炎、子宮内膜炎、卵胞嚢胞、および卵巣静止であった。これらのオッズ比 (95% 信頼区間、 p 値) はそれぞれ、2.49 (1.67 - 3.72、 $p < 0.001$)、5.45 (3.37 - 8.82、 $p < 0.001$)、2.33 (1.27 - 4.29、 $p = 0.006$) および 3.95 (1.77 - 8.78、 $p < 0.001$) であった (表 1.2.4、モデル 2)。

1.2.4 考察

多重ロジスティック回帰分析により AI 回数、FAID および空胎日数の延長に対するリスク因子となる分娩後疾患を特定したところ、生殖器疾患が繁殖成績に与える影響が大きいことが明らかとなった。その一方で、生殖器疾患以外では乳房炎が空胎日数を有意に延長することが示唆された。生殖器疾患が繁殖成績に大きく影響することは既報の通りであるが[11]、乳房炎が直接的に繁殖成績に影響を及ぼすという情報については一般的ではない。従って、乳房炎がどのように繁殖成績に影響を及ぼすかについて調査する必要がある。

1.3 乳房炎が繁殖成績に与える影響とリスク因子の特定

第 1 章第 2 節において、生殖器疾患と乳房炎が繁殖成績に影響を及ぼす疾患であることが疫学的に証明された。生殖器疾患が繁殖成績に大きく影響することは既報の通りであるが[11]、乳房炎がどのように繁殖成績に影響を及ぼすかについては知られていない。よって、第 1 章第 3 節ではどのような乳房炎が繁殖成績に影響を与えるのか、起因菌種および炎症の程度を指標に統計学的に精査した。

1.3.1 材料および方法

第 1 章第 1 節で用いた全 814 回の分娩データのうち、除外基準に該当した 94 回の分娩データを除いた 720 回の分娩データを用いた。除外基準とは分娩後 60 日以内の死亡および淘汰までに AI を受けなかった個体のデータであり、それぞれ 34 および 60 回の分娩で認められた。

1.3.2 統計解析

全ての統計解析にはオープンソース・フリーソフトウェア、GPL 2.0 ライセンスの統計ソフト（R ver 3.6.0、The Comprehensive R Archive Network が公開）を用いた。ロジスティック回帰分析を実施して、空胎日数と農場、分娩時の季節および産次数との関連性を評価し（モデル 1）、続いて、乳房炎の原因菌（モデル 2）、および乳房炎の炎症グレード（モデル 3）を説明変数として順次導入した。受胎までの期間で乳房炎を発症しなかった牛は乳房炎なし（ $n = 513$ ）、乳房炎を発症した牛を乳房炎あり（ $n = 207$ ）とした。

乳房炎として集計された治療記録によると、全ての治療記録で乳汁の異常を伴い、California Mastitis Test 変法（CMT）陽性であった。乳房炎起因菌が同定された場合は、それらを記録した。なお、乳房炎の原

因菌として、黄色ブドウ球菌、環境性連鎖球菌、コアグラゼ陰性ブドウ球菌、トウルペセラ・ピオゲネス（化膿菌）、大腸菌群、酵母に分類し、説明変数として各菌種を導入した（モデル 2）。

乳房炎の炎症グレードの分類には Wenz ら（2001）によって規定された全身性炎症徴候に基づくスコアリングシステムを用いた[52]。すなわち、乳房炎は Mild（軽度）、Moderate（中程度）および Severe（重度）の 3 つの炎症グレードに分類した。詳述すると、まずは直腸温、脱水状態、第一胃運動および沈鬱の 4 つの項目についてそれぞれ点数をつけた。直腸温は 37.8 - 39.2 °C を 0 点、39.3 - 39.8 °C を 1 点、39.9 °C 以上および 37.7 °C 以下を 2 点とした。脱水状態は全くないものを 0 点、軽度を 1 点、中程度を 2 点、重度を 3 点とした。第一胃運動については、1 分間に 2 回以上動いているものを 0 点、1 分間に 1 回のものを 1 点、1 分間全く動かないものを 2 点とした。沈鬱については、全くないものを 0 点、軽度に沈鬱のものを 1 点、重度に沈鬱のものを 2 点とした。これらの点数を合計し、0 - 2 点を Mild（軽度）、3 - 5 点を Moderate（中程度）、6 - 9 点を Severe（重度）と分類した。グレードは同じ牛においては診療経過中の最高スコアを採用した。多重共線性は、分散膨張係数を使用して評価した。分散膨張係数は、全てのロジスティック回帰分析で 2 未満であった。

1.3.3 結果

本節では、黄色ブドウ球菌と環境性連鎖球菌が空胎日数を延長する可能性が示唆された。それぞれのオッズ比（95% 信頼区間、 p 値）は、7.49（0.87 - 64.85、 $p = 0.067$ ）および 2.82（0.97 - 8.22、 $p = 0.058$ ）であり、黄色ブドウ球菌と環境性連鎖球菌に由来する乳房炎は、有意では

ないものの繁殖成績に影響を及ぼす可能性が高いことが示唆された（表 1.3.1、モデル 2）。続いて炎症グレードを導入して解析すると、炎症グレードが Mild（軽度）である場合、オッズ比（95% 信頼区間、 p 値）は 1.73（1.13 - 2.66、 $p = 0.012$ ）となり、軽度炎症を伴う乳房炎が空胎日数を有意に延長するリスク因子であることが明らかとなった（表 1.3.1、モデル 3）。

1.3.4 考察

繁殖成績に影響を及ぼす乳房炎について、起因菌種および炎症程度を指標に評価したところ、黄色ブドウ球菌と環境性連鎖球菌が空胎日数を延長する可能性があることが示唆された。乳房炎の炎症の程度については、重度炎症というよりも軽度の乳房炎が空胎日数の延長に大きく関与していることが示唆された。黄色ブドウ球菌と環境性連鎖球菌などのグラム陽性菌由来で軽度の炎症を伴う乳房炎は、その多くが潜在性乳房炎である可能性が高い。よって、臨床型乳房炎よりも潜在性乳房炎が繁殖成績へのリスク因子であることについては、臨床現場ではなかなか認知し難い結果であり、本節での知見は臨床獣医師や酪農家にとって有用な警鐘となり得る。

1.4 小括

本章第 1 節では、民間のタイストール酪農場において発生頻度の高い分娩後疾患の上位 15 疾患を特定できた。このような報告は過去に例がなく、大変貴重な情報が得られた。

本章第 2 節では、ロジスティック回帰分析により、発生頻度の高い疾患の中でも特に生殖器疾患と乳房炎が繁殖成績低下へ大きく寄与す

ることが判明した。生殖器疾患による繁殖成績低下は既報の通りであるが、乳房炎が有意に空胎日数を延長することは一般的に知られておらず、追加の分析が必要であった。

そこで本章第 3 節では、乳房炎の起因菌種および炎症の程度を指標に、ロジスティック回帰分析を用いて繁殖成績低下との関係を精査した。その結果、軽度炎症を伴う乳房炎が有意に空胎日数を延長することが明らかとなった。

以上、本章では生殖器疾患や乳房炎などの炎症性疾患と繁殖成績との間に関連性があることが示唆される結果となった。次章では、本章にて繁殖成績低下への影響が最も大きいことがわかった、子宮内膜炎について調査する。

表1.1.1 本試験に供された9件の牧場の特徴

Farm	Herd size	VWP	Calving (n)	Age	Parity	Dead by 60 days postpartum (%)	No AI culling (%)
A	20	60	35	5.3 ± 2.1	3.8 ± 1.9	3 (8.6%)	6 (17.1%)
B	30	60	63	4.9 ± 2.3	3.6 ± 2.0	1 (1.6%)	6 (9.5%)
C	40	40	85	4.3 ± 2.0	2.9 ± 1.7	5 (5.8%)	5 (5.8%)
D	50	60	102	4.8 ± 2.4	3.1 ± 1.9	8 (7.8%)	3 (2.9%)
E	30	50	55	5.2 ± 2.9	3.8 ± 2.5	2 (3.6%)	1 (1.8%)
F	40	40	82	4.5 ± 2.3	3.2 ± 1.9	2 (2.4%)	3 (3.6%)
G	80	60	149	4.2 ± 1.9	2.7 ± 1.3	5 (3.3%)	7 (4.6%)
H	70	60	150	4.2 ± 2.1	3.0 ± 1.8	2 (1.3%)	25 (16.3%)
I	40	40	93	4.0 ± 1.7	2.9 ± 1.6	6 (6.5%)	4 (4.3%)

VWP: 自発的待機期間

表 1.1.2 発生頻度の高い 15 の分娩後疾患

Belong		Calving(n)	Percentage
Diseases	Mastitis	207	28.8%
	Endometritis	164	22.8%
	Milk fever	97	13.5%
	Follicular cyst	75	10.4%
	Ovarian quiescence	53	7.4%
	Dystocia	33	4.6%
	Ketosis	29	4.0%
	Pneumonia	25	3.5%
	Displaced abomasum	25	3.5%
	Stillbirth	22	3.1%
	Retained placenta	17	2.4%
	Bloody milk	16	2.2%
	Puerperal fever	11	1.5%
	Diarrhea	11	1.5%
	Uterine torsion	10	1.4%
Control (Without diseases)	247	34.3%	

表 1.2.1 農場、分娩時の季節、産次数のまとめ

Belong		Calving(n)	Percentage
Farm	A	26	3.6%
	B	56	7.8%
	C	75	10.4%
	D	91	12.6%
	E	52	7.2%
	F	77	10.7%
	G	137	19.0%
	H	123	17.1%
	I	83	11.5%
Season	spring [March - May]	173	24.0%
	summer [June - August]	170	23.6%
	fall [September - November]	186	25.8%
	winter [December - February]	191	26.5%
Parity	1	151	21.0%
	2	173	24.0%
	≥ 3	396	55.0%

表 1.2.2 人工授精 (AI) 回数を増加させる因子の解析

Risk factor	model 1			model 2		
	Crude OR(95% CI)	Adjusted OR(95% CI)	p-value	Crude OR(95% CI)	Adjusted OR(95% CI)	p-value
Farm						
A	reference	-	-	reference	-	-
B	0.96 (0.37,2.5)	0.92 (0.35,2.44)	0.867	0.96 (0.37,2.5)	0.89 (0.32,2.5)	0.826
C	2.04 (0.87,5.07)	2 (0.79,5.03)	0.142	2.04 (0.87,5.07)	1.94 (0.77,5.18)	0.187
D	1.79 (0.73,4.35)	1.83 (0.74,4.52)	0.192	1.79 (0.73,4.35)	2 (0.77,5.2)	0.156
E	2.56 (0.97,6.74)	2.56 (0.97,6.81)	0.059	2.56 (0.97,6.74)	2.18 (0.77,6.2)	0.143
F	1.48 (0.6,3.67)	1.48 (0.59,3.74)	0.406	1.48 (0.6,3.67)	1.13 (0.44,3.18)	0.713
G	1.32 (0.56,3.12)	1.24 (0.52,2.96)	0.632	1.32 (0.56,3.12)	1.08 (0.42,2.67)	0.901
H	0.8 (0.33,1.92)	0.78 (0.32,1.9)	0.593	0.8 (0.33,1.92)	0.82 (0.32,2.08)	0.673
I	1.49 (0.61,3.66)	1.5 (0.6,3.74)	0.386	1.49 (0.61,3.66)	1.89 (0.72,4.94)	0.197
Season						
spring	reference	-	-	reference	-	-
summer	1.06 (0.69,1.62)	1.12 (0.72,1.75)	0.611	1.06 (0.69,1.62)	1.24 (0.77,2)	0.37
fall	1.1 (0.72,1.66)	1.16 (0.76,1.78)	0.493	1.1 (0.72,1.66)	1.11 (0.7,1.76)	0.658
winter	1.13 (0.75,1.71)	1.26 (0.83,1.94)	0.28	1.13 (0.75,1.71)	1.19 (0.75,1.88)	0.462
Parity						
1	reference	-	-	reference	-	-
2	1.88 (1.21,2.91)	1.95 (1.23,3.07)	0.004**	1.88 (1.21,2.91)	1.79 (1.1,2.93)	0.020*
≥ 3	1.5 (1.02,2.21)	1.52 (1.03,2.25)	0.036*	1.5 (1.02,2.21)	1.29 (0.84,1.98)	0.242
Mastitis						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.52 (1.1,2.1)	1.42 (0.97,2.07)	0.068
Endometritis						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	3.78 (2.59,5.5)	3.97 (2.63,5.99)	< 0.001**
Milk fever						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.11 (0.72,1.7)	1.3 (0.8,2.13)	0.288
Follicular cyst						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	2.4 (1.45,3.95)	1.94 (1.11,3.39)	0.019*
Ovarian quiescence						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.44 (0.82,2.53)	1.17 (0.61,2.26)	0.637
Dystocia						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	2.1 (1.02,4.34)	1.73 (0.8,4.03)	0.158
Ketosis						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.26 (0.6,2.64)	1.45 (0.63,3.34)	0.378
Pneumonia						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	0.54 (0.23,1.26)	0.31 (0.11,0.86)	0.025*
Displaced abomasum						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.0755 (0.4839,2.3903)	1.0001 (0.4103,2.438)	1
Stillbirth						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.71 (0.72,4.04)	1.23 (0.47,3.5)	0.621
Retained placenta						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	0.63 (0.23,1.71)	0.52 (0.17,1.58)	0.246
Bloody milk						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.17 (0.43,3.14)	1.2 (0.39,3.68)	0.749
Puerperal fever						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.4 (0.42,4.64)	1.37 (0.37,4.82)	0.658
Diarrrhea						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	5.35 (1.15,24.92)	9.02 (1.52,53.38)	0.015*
Uterine torsion						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	2.75 (0.7,10.71)	2.55 (0.57,11.4)	0.221

*, $p < 0.05$

***, $p < 0.01$

表 1.2.3 初回授精までの日数（FAID）を増加させる因子の解析

Risk factor	model 1			model 2		
	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI)	p-value	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI)	p-value
Farm						
A	reference	-	-	reference	-	-
B	1.71 (0.64,4.58)	1.7 (0.67,4.66)	0.30*	1.71 (0.64,4.58)	1.63 (0.57,4.63)	0.359
C	0.23 (0.09,0.58)	0.23 (0.09,0.61)	0.003**	0.23 (0.09,0.55)	0.22 (0.08,0.61)	0.003**
D	0.73 (0.3,1.78)	0.7 (0.28,1.74)	0.445	0.73 (0.3,1.78)	0.6 (0.23,1.55)	0.287
E	0.5 (0.19,1.3)	0.49 (0.19,1.31)	0.155	0.5 (0.19,1.3)	0.36 (0.13,1.01)	0.052
F	0.4 (0.16,0.99)	0.38 (0.15,0.98)	0.045*	0.4 (0.16,0.99)	0.3 (0.11,0.82)	0.019*
G	0.9 (0.38,2.14)	0.91 (0.38,2.18)	0.827	0.9 (0.38,2.14)	0.8 (0.32,2.02)	0.642
H	0.8 (0.34,1.9)	0.82 (0.34,1.98)	0.664	0.8 (0.34,1.9)	0.72 (0.29,1.82)	0.49
I	0.27 (0.11,0.68)	0.27 (0.11,0.69)	0.006**	0.27 (0.11,0.68)	0.25 (0.09,0.67)	0.006**
Season						
spring	reference	-	-	reference	-	-
summer	0.71 (0.47,1.09)	0.68 (0.43,1.07)	0.092	0.71 (0.47,1.09)	0.66 (0.42,1.06)	0.055
fall	0.68 (0.45,1.03)	0.66 (0.42,1.02)	0.062	0.68 (0.45,1.03)	0.53 (0.33,0.85)	0.008**
winter	0.9 (0.6,1.37)	0.83 (0.54,1.28)	0.399	0.9 (0.6,1.37)	0.67 (0.42,1.06)	0.067
Parity						
1	reference	-	-	reference	-	-
2	1.5 (0.96,2.33)	1.44 (0.91,2.29)	0.124	1.5 (0.96,2.33)	1.25 (0.76,2.05)	0.377
> 3	1.68 (1.15,2.46)	1.66 (1.12,2.48)	0.012*	1.68 (1.15,2.46)	1.41 (0.92,2.17)	0.115
Mastitis						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.36 (0.98,1.88)	1.33 (0.91,1.94)	0.141
Endometritis						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.7 (1.22,2.48)	1.46 (0.98,2.17)	0.065
Milk fever						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.81 (1.17,2.81)	1.4 (0.85,2.3)	0.183
Follicular cyst						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.07 (0.66,1.73)	1.36 (0.79,2.34)	0.267
Ovarian quiescence						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	9.19 (3.37,21.78)	11.09 (4.46,27.6)	< 0.001**
Dystocia						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	0.66 (0.32,1.35)	0.51 (0.22,1.18)	0.116
Ketosis						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.11 (0.53,2.34)	0.9 (0.38,2.13)	0.806
Pneumonia						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.33 (0.59,2.97)	0.77 (0.28,2.09)	0.604
Displaced abomasum						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	0.81 (0.36,1.8)	1.5 (0.6,3.77)	0.39
Stillbirth						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.03 (0.44,2.42)	0.75 (0.28,2.06)	0.58
Retained placenta						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.17 (0.45,3.06)	0.96 (0.33,2.79)	0.976
Bloody milk						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.34 (0.49,3.63)	1.1 (0.37,3.27)	0.858
Puerperal fever						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	0.59 (0.17,2.02)	0.98 (0.25,3.75)	0.974
Diarhea						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	0.53 (0.17,2.02)	0.74 (0.17,3.21)	0.688
Uterine torsion						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	9.52 (1.2,75.54)	7.98 (0.86,73.77)	0.067

*, $p < 0.05$

***, $p < 0.01$

表 1.2.4 空胎日数を増加させる因子の解析

Risk factor	model 1			model 2		
	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI)	p-value	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI)	p-value
Farm						
A	reference	-	-	reference	-	-
B	1.43 (0.55,3.71)	1.3 (0.49,3.46)	0.603	1.43 (0.55,3.71)	1.16 (0.41,3.32)	0.779
C	0.79 (0.32,1.95)	0.81 (0.32,2.02)	0.646	0.79 (0.32,1.95)	0.68 (0.25,1.85)	0.446
D	1.29 (0.53,3.13)	1.26 (0.51,3.13)	0.618	1.29 (0.53,3.13)	1.21 (0.45,3.24)	0.703
E	0.86 (0.33,2.21)	0.84 (0.32,2.2)	0.718	0.86 (0.33,2.21)	0.49 (0.17,1.44)	0.194
F	0.75 (0.31,1.85)	0.71 (0.28,1.78)	0.463	0.75 (0.31,1.85)	0.44 (0.16,1.21)	0.112
G	1.24 (0.53,2.9)	1.2 (0.5,2.88)	0.679	1.24 (0.53,2.9)	0.91 (0.35,2.34)	0.841
H	0.72 (0.31,1.7)	0.72 (0.3,1.72)	0.458	0.72 (0.31,1.7)	0.67 (0.26,1.71)	0.4
I	0.72 (0.29,1.74)	0.71 (0.28,1.76)	0.454	0.72 (0.29,1.74)	0.84 (0.31,2.25)	0.728
Season						
spring	reference	-	-	reference	-	-
summer	0.77 (0.5,1.17)	0.78 (0.5,1.21)	0.268	0.77 (0.5,1.17)	0.76 (0.47,1.24)	0.271
fall	0.95 (0.62,1.44)	0.97 (0.63,1.5)	0.907	0.95 (0.62,1.44)	0.85 (0.53,1.37)	0.5
winter	1.13 (0.74,1.72)	1.16 (0.73,1.78)	0.508	1.13 (0.74,1.72)	0.92 (0.6,1.46)	0.721
Parity						
1	reference	-	-	reference	-	-
2	1.95 (1.25,3.04)	1.9 (1.21,2.98)	0.005**	1.95 (1.25,3.04)	1.61 (0.98,2.66)	0.061
≥ 3	2.05 (1.4,3)	2.04 (1.38,3)	< 0.001**	2.05 (1.4,3)	1.6 (1.03,2.46)	0.035*
Mastitis						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	2.37 (1.67,3.34)	2.49 (1.67,3.72)	< 0.001**
Endometritis						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	5.49 (3.52,8.57)	5.45 (3.57,8.52)	< 0.001**
Milk fever						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.7 (1.08,2.67)	1.58 (0.94,2.65)	0.085
Follicular cyst						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	2.33 (1.37,3.98)	2.33 (1.27,4.29)	0.006**
Ovarian quiescence						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	4.17 (2.8,6.8)	3.95 (1.77,8.78)	< 0.001**
Dystocia						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.6 (0.76,3.34)	1.12 (0.48,2.62)	0.795
Ketosis						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	0.96 (0.46,2.03)	0.78 (0.33,1.88)	0.585
Pneumonia						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	0.84 (0.38,1.87)	0.4 (0.15,1.11)	0.08
Displaced abomasum						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	0.84 (0.38,1.87)	1.21 (0.49,2.98)	0.686
Stillbirth						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.38 (0.57,3.34)	0.83 (0.29,2.42)	0.738
Retained placenta						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.12 (0.42,2.98)	0.79 (0.26,2.44)	0.679
Bloody milk						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.01 (0.37,2.73)	0.7 (0.23,2.19)	0.546
Puerperal fever						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	0.44 (0.13,1.52)	0.49 (0.12,2.05)	0.327
Diarrhoea						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	2.11 (0.55,8.01)	1.29 (0.95,19.36)	0.058
Uterine torsion						
no	-	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	7.18 (0.9,56.94)	3.38 (0.59,49.15)	0.136

*, $p < 0.05$

** , $p < 0.01$

表1.3.1 乳房炎関連因子のうち西胎日数を追加させる区への解析

Risk factor	model 1			model 2			model 3		
	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI)	p-value	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI)	p-value	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI)	p-value
Farm									
A	reference	-	-	reference	-	-	reference	-	-
B	1.43 (0.55,3.71)	1.3 (0.49,3.46)	0.603	1.43 (0.55,3.71)	1.14 (0.42,3.09)	0.803	1.43 (0.55,3.71)	1.17 (0.42,3.21)	0.764
C	0.79 (0.32,1.95)	0.81 (0.32,2.02)	0.646	0.79 (0.32,1.95)	0.53 (0.2,1.39)	0.196	0.79 (0.32,1.95)	0.54 (0.2,1.45)	0.224
D	1.29 (0.53,3.13)	1.26 (0.51,3.13)	0.618	1.29 (0.53,3.13)	1.21 (0.48,3.05)	0.685	1.29 (0.53,3.13)	1.26 (0.5,3.23)	0.623
E	0.86 (0.33,2.21)	0.84 (0.32,2.2)	0.718	0.86 (0.33,2.21)	0.82 (0.31,2.19)	0.699	0.86 (0.33,2.21)	0.75 (0.28,2.04)	0.571
F	0.75 (0.31,1.85)	0.71 (0.28,1.78)	0.463	0.75 (0.31,1.85)	0.7 (0.28,1.79)	0.458	0.75 (0.31,1.85)	0.72 (0.28,1.85)	0.49
G	1.24 (0.53,2.9)	1.2 (0.5,2.88)	0.679	1.24 (0.53,2.9)	1.13 (0.47,2.75)	0.781	1.2366 (0.5277,2.898)	0.9989 (0.4019,2.483)	0.998
H	0.72 (0.31,1.7)	0.72 (0.31,1.7)	0.458	0.72 (0.31,1.7)	0.73 (0.3,1.76)	0.479	0.72 (0.31,1.7)	0.77 (0.31,1.88)	0.563
I	0.72 (0.29,1.71)	0.71 (0.28,1.76)	0.454	0.72 (0.29,1.74)	0.73 (0.29,1.82)	0.497	0.72 (0.29,1.74)	0.77 (0.3,1.95)	0.575
Season									
spring	reference	-	-	reference	-	-	reference	-	-
summer	0.77 (0.5,1.17)	0.78 (0.5,1.21)	0.268	0.77 (0.5,1.17)	0.72 (0.46,1.13)	0.156	0.77 (0.5,1.17)	0.71 (0.45,1.13)	0.15
fall	0.95 (0.62,1.41)	0.97 (0.63,1.5)	0.907	0.948 (0.6273,1.4396)	1.0022 (0.649,1.5476)	0.992	0.948 (0.6243,1.4396)	1.0013 (0.6455,1.5509)	0.995
winter	1.13 (0.74,1.72)	1.16 (0.75,1.78)	0.508	1.13 (0.74,1.72)	1.19 (0.77,1.84)	0.432	1.13 (0.74,1.72)	1.15 (0.74,1.78)	0.537
Parity									
1	reference	-	-	reference	-	-	reference	-	-
2	1.95 (1.25,3.01)	1.9 (1.21,2.98)	0.005**	1.95 (1.25,3.04)	1.77 (1.11,2.8)	0.016*	1.95 (1.25,3.04)	1.77 (1.11,2.82)	0.016*
> 3	2.05 (1.4,3)	2.04 (1.38,3)	< 0.001**	2.05 (1.4,3)	1.91 (1.29,2.83)	0.001**	2.05 (1.4,3)	1.88 (1.27,2.78)	0.002**
Staphylococcus aureus									
no	-	-	-	reference	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	7.99 (1.02,62.76)	11.63 (1.37,98.93)	0.025*	7.99 (1.02,62.76)	7.79 (0.87,64.85)	0.067
Environmental Streptococcus									
no	-	-	-	reference	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	4.28 (1.62,11.27)	4.2 (1.51,11.7)	0.006**	4.28 (1.62,11.27)	2.82 (0.97,8.22)	0.058
Coagulase negative staphylococcus									
no	-	-	-	reference	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	2.11 (0.55,8.01)	1.53 (0.34,6.83)	0.577	2.11 (0.55,8.01)	1.16 (0.26,5.13)	0.847
Trueperella pyogenes									
no	-	-	-	reference	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.57 (0.14,17.36)	0.74 (0.06,9.5)	0.818	1.57 (0.14,17.36)	0.75 (0.08,9.43)	0.825
Escherichia coli									
no	-	-	-	reference	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	3.22 (1.05,9.72)	3.48 (1.08,11.25)	0.037*	3.22 (1.06,9.72)	1.96 (0.55,6.96)	0.295
Yeast									
no	-	-	-	reference	-	-	reference	-	-
yes	-	-	-	1.57 (0.17,17.36)	2.9 (0.25,34.11)	0.397	1.57 (0.14,17.36)	1.79 (0.11,19.77)	0.763
Mastitis grade									
no mastitis	-	-	-	-	-	-	reference	-	-
mild	-	-	-	-	-	-	2.25 (1.57,3.18)	1.73 (1.13,2.66)	0.012*
moderate	-	-	-	-	-	-	4.91 (1.07,22.78)	2.97 (0.55,15.93)	0.205
severe	-	-	-	-	-	-	4.94 (0.57,42.6)	3.27 (0.34,31.61)	0.306

*, p < 0.05

***, p < 0.001

第 2 章

分娩後 15 日における子宮内および全身性炎症に基づいた

子宮内膜炎の予測

第1章では、酪農場で飼育されている乳牛の分娩後疾患において発生頻度の高い分娩後疾患とその繁殖成績への影響について疫学調査を実施した。その結果、生殖器疾患だけでなく、潜在性乳房炎が繁殖成績に影響を及ぼす因子であることが明らかとなった。潜在性乳房炎を引き起こす原因菌として黄色ブドウ球菌と環境性連鎖球菌が挙げられるが、このどちらもインターロイキン-6を活性化させ、さらにはSAAなどの炎症マーカーを上昇させることが知られている[41]。従って、炎症と繁殖成績が強く関連していることが十分に考え得るため、繁殖計画を立案する上で全身または生殖器の炎症程度を評価することは有用と思われる。

子宮内でのエンドトキシン(ETX)活性値の上昇は子宮内でのグラム陰性菌の存在を示し、培養検査にて菌検出ができなかった場合でも子宮内の感染状況を把握することが可能である。また、分娩後初期に子宮内に感染する機会が多いのはグラム陰性菌である大腸菌群(Coliform)であることが知られており[43]、ETXは炎症を強力に惹起することから、子宮内膜炎とETX活性値は関連があることが予想された。しかし、生きている牛から子宮内灌流液を採取し、その子宮灌流液中ETX活性値を測定した報告は過去に見られない。そこで本章第1節では子宮灌流液中ETX活性値の測定の技術を確立した。

2.1 子宮灌流液中ETX活性値の測定方法の検討

第2章第1節では子宮内から灌流液を得る方法、さらに、得られる灌流液を用いてETX活性値を測定する技術を確立した。また、その精度を確認した。

2.1.1 材料および方法

本研究は、National Research Council Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals [37]に従い、酪農学園大学動物実験委員会の承認（承認番号：VH18C10）を得て実施した。

本試験には、北海道農業共済組合道南支所（実施当時：みなみ北海道農業共済組合道南支所）管内で飼育されていた5頭のホルスタイン種泌乳牛を供試した。供試牛の子宮頸管に滅菌済みのバルーンカテーテル（シリコーンフォーリーカテーテル FR-14/2WAY 30ML、ファイコン、東京）を挿入し、滅菌済みの生理食塩液（動物用生食 V 注射液、日本全薬工業）100 mLを注入して灌流させた。灌流液を滅菌済みのディスポーザブルシリンジによって回収し、ETX フリー遠沈管（ビオラモ遠沈管Ⅱ、アズワン、大阪）に分注し、測定まで10°Cで保存した。

子宮灌流液中 ETX 活性値は、市販の *Limulus amoebocyte lysate* (LAL) - Kinetic Chromogenic Assay (KCA) を用いて測定した。測定直前に灌流液を ETX フリー蒸留水（大塚蒸留水、大塚製薬株式会社、東京）で希釈なし、20 および 200 倍に希釈し、これらの検体を 10 秒間ボルテックスで混合したものを試料とした。これらの試料は 2 本のチューブ（非加熱：ポリスチレンラウンドボトムチューブ、コーニング、米国 NY、加熱：リルムテストチューブ S、和光純薬工業株式会社、大阪）に分離し、一方を非加熱、残りを 80°C で 10 分間加熱処理した。

10 ng の ETX を含むコントロールスタンダード ETX (CSE, CONTROL STD ENDOTOXIN, Charles River) を ETX フリー蒸留水で 30 ETX unit (EU) /vial になるよう溶解し、これをポジティブコントロール (PC) とした。各試料に対して 10 倍希釈の PC 添加（スパイク）および非添加試料を作成し、回収率を求めた。LAL-KCA 測定用の LAL 試薬

(Endosafe® Endochrome-K, Charles River) を、β グルカンの干渉を避けるため ETX に特異的な Buffer Solution (Endotoxin-Specific Buffer Solution, Charles River) で溶解した。LAL を用いた測定は、96 ウェルのマイクロプレート (Endosafe® 96-well, flat bottom microplate M9001, Charles River) を用いて行った。ETX 活性値はマイクロプレートリーダー (Sunrise™, Tecan Group Ltd.) および ETX 測定ソフトウェア (EndoScan-V™, Charles River) を用いて測定した。測定波長は 405 nm とした。ETX 回収率 (%) は、以下の式より求めた。

回収率 (%) = (スパイク済みサンプルの ETX 活性値 - サンプルの ETX 活性値) / (PC の ETX 活性値) ×100

それぞれの試料の回収率が米国 Food and Drug Administration (FDA) の基準である 50~200% の範囲であれば適正、それ以外を不適正と評価した。データは平均値 ± 標準偏差 (SD) で示した。

2.1.2 結果

各前処理条件における子宮灌流液中 ETX 活性値の回収率を図 2.1.1 に示した。非加熱処理試料の ETX 回収率は希釈なし、20 および 200 倍希釈においてそれぞれ 124.68 ± 170.85、82.57 ± 15.78 および 90.80 ± 11.91% であった。同様に加熱処理試料の ETX 回収率は希釈なし、20 および 200 倍希釈においてそれぞれ 249.44 ± 445.72、76.74 ± 19.51 および 92.82 ± 5.48% であった。非加熱および加熱処理試料を 20 または 200 倍希釈した場合に全てのサンプルにおいて ETX 回収率が 50~200% の範囲に含まれた。

2.1.3 考察

子宮灌流液中 ETX 活性値測定において、試料を 20 倍希釈・非加熱の条件でも良好な ETX 回収率が得られたことから、子宮灌流液中 ETX 活性値測定の前処理条件は以下の通りと結論付けた。

子宮灌流液中 ETX 活性値測定のための前処理条件

試料を 20 倍希釈・非加熱。ただし、ETX 活性値が測定範囲を越える場合には、200 倍希釈することが望ましい。

2.2 分娩後 15 日における子宮内および全身性炎症に基づいた子宮内膜炎の予測

分娩後 45 日の時点で子宮内に炎症が存在する場合、これは臨床症状の有無にかかわらず子宮内膜炎を発症している[14]。臨床型、潜在性を問わず、子宮内膜炎は受胎率を低下させ、空胎日数を延長することが知られている[11]。分娩後 15 日の時点で分娩後 45 日に子宮内膜炎を発症することを正確に予測することができるのであれば、子宮内膜炎の予防または早期治療が可能となり、ひいては受胎率の低下を防ぐことができると思われる。従って、第 1 節で確立した子宮灌流液中 ETX 活性値および牛の全身性炎症の指標となりうる血漿中血清 SAA 濃度を用いて分娩後 15 日の子宮内炎症の状態を評価し、これらの炎症指標によって分娩後 45 日目に子宮内膜炎の発症を予測できるか否かを検討した。

2.2.1 材料および方法

本試験は、2018 年 11 月から 2019 年 11 月までの 1 年間で分娩した北海道、道南地域の 4 つの民間酪農場で飼養されているホルスタイン種

乳牛 32 頭について実施した。供試された 32 頭は全て経産牛であり、その平均産次数は 2.69、標準偏差は 1.33 であった。採材は分娩後 15 および 45 日目を基準にそれぞれ 2 回実施した。その結果、初回および 2 回目の平均採材実施日は、 16.5 ± 3.92 および 46.7 ± 5.18 日目であった。

各採材実施日において、全ての供試牛に対して血漿中 ETX 活性値、血漿中 SAA 濃度、子宮灌流液中 ETX 活性値を測定し、また子宮内膜細胞診を実施した。血液サンプルは頸静脈から採血（10 mL）し、ヘパリン添加真空採血管（Venoject II、TERUMO、東京）に保存した。血漿は室温で $1500 \times g$ 、15 分間の遠心分離を行った後、測定まで -30°C で保存した。

子宮内灌流液は、バルーンカテーテル（シリコーンフォーリーカテーテル FR-14/2WAY 30ML、ファイコン、東京）を子宮内に挿入し、生理食塩液によって灌流した試料（灌流液）を回収した。まず、バルーンカテーテルを子宮内に留置し、注射器（JMS シリンジ カテーテルフィット、ジェイ・エム・エス、東京）に入れた 100 mL の生理食塩液（動物用生食 V 注射液、日本全薬工業株式会社、福島）を子宮内に注入して数秒後に回収した。回収率は全ての牛で 50% 以上であった。

1) 血漿中 ETX 活性値の測定

血漿サンプルを用いて ETX 活性値を大塚ら（2020）の方法に従い、市販の *Limulus amoebocyte lysate* (LAL) -Kinetic Turbidimetric Assay (KTA) を用いて測定した。測定直前に血漿試料を ETX フリー蒸留水（大塚蒸留水、大塚製薬株式会社、東京）で 20 倍に希釈した。これらの検体を 10 秒間ボルテックスで混合した後、プロテアーゼインヒビターなどの反応阻害物質を不活化するために 80°C で 10 分間加熱した。10 ng の

ETX を含むコントロールスタンダード ETX (CSE, CONTROL STD ENDOTOXIN、Charles River、Charlston、サウスカロライナ州、米国) を ETX フリー蒸留水で 30 EU/vial になるよう溶解し、これをポジティブコントロールとした。LAL-KTA 測定用の LAL 試薬 (Endosafe® KTA2, Charles River) を、 β グルカンの反応をなくすために ETX に特異的な Buffer Solution (Endotoxin-Specific Buffer Solution, Charles River) で溶解した。LAL を用いた測定は、96 ウェルのマイクロプレート (Endosafe® 96-well, flat bottom microplate M9001, Charles River) を用いて行った。ETX 活性値はマイクロプレートリーダー (Sunrise™, Tecan Group Ltd., Männedorf、スイス) および ETX 測定ソフトウェア (EndoScan-V™, Charles River) を用いて測定した。測定波長は 340 nm とした。

2) 血漿中 SAA 濃度の測定

血漿サンプルを用いて SAA 濃度を測定した。なお、再凍結したサンプルは SAA 測定に影響を及ぼす可能性が示唆されているため本試験において再溶解試料は使用しなかった。血漿中 SAA 濃度は大塚ら (2020) の方法に従って測定した。つまり、SAA 濃度の測定には、動物用 LATIA-SAA 試薬 (VET-SAA 'Eiken'、栄研化学株式会社、東京) を使用した。動物用 LATIA-SAA 試薬を用いた SAA 濃度測定は汎用自動分析装置 (Hitachi 7170S、Hitachi Ltd.、東京) に検査試薬を実装して行った。

3) 子宮灌流液中 ETX 活性値

子宮灌流液中 ETX 活性値は第 1 節によって確立した方法を用いて測定した。すなわち、子宮灌流液中 ETX 活性値は、市販の *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) - Kinetic Chromogenic Assay (KCA) を用いて

測定した。測定直前に試料を ETX フリー蒸留水（大塚蒸留水、大塚製薬株式会社、東京）で 20 倍に希釈し、これらの検体を 10 秒間ボルテックスで混合した。10 ng の ETX を含むコントロールスタンダード ETX（CSE, CONTROL STD ENDOTOXIN, Charles River）を ETX フリー蒸留水で 30 ETX unit (EU) /vial になるよう溶解し、これをポジティブコントロールとした。LAL-KCA 測定用の LAL 試薬（Endosafe® Endochrome-K, Charles River）を、 β グルカンの反応をなくすために ETX に特異的な Buffer Solution（Endotoxin-Specific Buffer Solution, Charles River）で溶解した。LAL を用いた測定は、96 ウェルのマイクロプレート（Endosafe® 96-well, flat bottom microplate M9001, Charles River）を用いて行った。ETX 活性値はマイクロプレートリーダー（Sunrise™, Tecan Group Ltd.）および ETX 測定ソフトウェア（EndoScan-V™, Charles River）を用いて測定した。測定波長は 405 nm とした。ETX 回収率を算出し、FDA の基準である 50~200% の範囲を満たさない検体については、ETX フリー蒸留水（大塚蒸留水、大塚製薬株式会社、東京）で 200 または 2000 倍希釈し、再度測定を行った。

4) 子宮内膜細胞診

子宮内膜細胞をサイトブラシにて回収した。サイトブラシ（メトリブラシ、富士平工業、東京）を外筒に収納した状態で子宮内に挿入した後、ブラシ部分を子宮内に出して 90 度回転させ子宮内膜を擦過し、速やかにブラシ部分を外筒に戻すことで子宮内膜細胞を回収した。回収した細胞はスライドグラスに載せるように塗布し、直ちに乾燥させた。乾燥させたスライドグラスを 12 時間以内に火炎固定した後、簡易ギムザ染色（簡易迅速染色液 ディフ・クイック、シスメックス株式会社、兵庫）

にて染色し、光学顕微鏡で鏡検した。鏡検にて 100 - 300 個の白血球を多形核白血球 (PMN) とそれ以外に分類した。PMN の割合を算出し、その百分率を求めた (PMN%)。

2.2.2 統計解析

全ての統計分析にはオープンソース・フリーソフトウェア、GPL 2.0 ライセンスの統計ソフト (R ver. 3.6.0、The Comprehensive R Archive Network が公開) を使用した。

45 日目において PMN% が 5% を超えた牛を子宮内膜炎陽性牛として定義した [49]。子宮内膜炎陽性をイベントあり、陰性をイベントなしとして全ての測定項目に対して ROC 解析を行なった。説明変数として分娩後 15 日目の血漿中 SAA 濃度、血漿中 ETX 活性値、子宮灌流液 ETX 活性値および PMN% を検討した。またこの 4 つの ROC 解析曲線を Delong の ROC 曲線の曲線下面積 (AUC) に対する検定を用いて比較した。

2.2.3 結果

45 日目における子宮内膜細胞診に基づいた子宮内膜炎イベント陽性および陰性牛はそれぞれ 15 および 17 頭であり、発症率は 46.9% であった。

子宮内膜炎イベント陽性および陰性牛の分娩後 15 日目での血漿中 ETX 活性値はそれぞれ 0.036 ± 0.019 および 0.046 ± 0.029 EU/mL であり、統計学的に差が認められなかった ($p = 0.71$)。

図 2.2.1 に ROC 解析に基づく分娩後 15 日目の子宮灌流液中 ETX 活性値と 45 日目の子宮内膜炎発生との関係を示した。ROC 解析の結果、

カットオフ値が 0.046 EU/mL の時、特異度が 0.706、感度が 0.733 で有意に分娩後 45 日目の子宮内膜炎の発症を予測することが可能であった (AUC = 0.745)。

図 2.2.2 に分娩後 15 日目の血漿中 SAA 濃度と 45 日目の子宮内膜炎発生との関係を示した。ROC 解析の結果、カットオフ値が 4.00 mg/dL の時、特異度が 0.647、感度が 0.533 であった (AUC = 0.553)。

図 2.2.3 に分娩後 15 日目の PMN%と 45 日目の子宮内膜炎発生との関係を示した。ROC 解析の結果、カットオフ値が 11.5%の時、特異度が 0.471、感度が 0.733 であった (AUC = 0.500)。

分娩後 45 日目に子宮内膜炎の発症を予測する因子として、分娩後 15 日目における血漿中 ETX 活性値、子宮灌流液中 ETX 活性値、血漿中 SAA 濃度および PMN%のいずれが有用な指標であるかを明らかにするため、それぞれの ROC 曲線の比較を Delong 法によって比較した (図 2.2.4)。

分娩後 15 日目の子宮灌流液中 ETX 活性値と 45 日目の子宮内膜炎発生の関係を示した子宮灌流液 ETX -ROC 曲線、および分娩後 15 日目の血漿中 SAA 濃度と 45 日目の子宮内膜炎発生の関係を示した SAA-ROC 曲線を Delong 法で比較した結果、有意な差は認められなかった ($p = 0.13$)。

分娩後 15 日目の子宮灌流液中 ETX 活性値と 45 日目の子宮内膜炎発生の関係を示した子宮灌流液 ETX -ROC 曲線、および分娩後 15 日目の PMN%と 45 日目の子宮内膜炎発生の関係を示した PMN-ROC 曲線を Delong 法で比較した結果、子宮灌流液 ETX -ROC 曲線の方が有意に高精度であった ($p = 0.048$)。

分娩後 15 日目の血漿中 SAA 濃度と 45 日目の子宮内膜炎発生の関係

を示した SAA-ROC 曲線、および分娩後 15 日目の PMN%と 45 日目の子宮内膜炎発生の関係を示した PMN-ROC 曲線を DeLong 法で比較した結果、有意な差は認められなかった ($p = 0.71$)。

2.2.4 考察

子宮内膜炎の発症は予測が困難であると一般的に考えられているが [8]、本研究により分娩後 15 日目における子宮灌流液中 ETX 活性値が、PMN%などこれまで基準とされてきた指標よりも診断能が高いことが明らかとなった。詳述すると、PMN%の子宮内膜炎診断能を示す ROC 曲線の AUC は 0.500 であり、本研究では 15 日目の PMN%で 45 日目の子宮内膜炎発症の予測は極めて難しいことが明らかとなった。これに対して、子宮灌流液中 ETX 活性値と子宮内膜炎発生の関係を示す ROC 曲線の AUC は 0.745 であり、これは従来の子宮内膜炎の診断指標として用いられてきた PMN%の ROC 曲線による診断能と比較しても予測精度が有意に高いことが示唆された。

子宮灌流液中 ETX 活性値の上昇は子宮内でのグラム陰性菌の存在を示し、培養検査にて菌検出ができなかった場合でも子宮内の感染状況の指標となり得る。分娩後初期に子宮内に感染する機会が多いのはグラム陰性菌である大腸菌群 (Coliform) であることが知られている [43]。ETX は炎症の原因物質であるため子宮灌流液中の ETX 活性値を測定することでより正確に子宮内の炎症状況を把握することが可能となり、その後の予測に有用であったと考えられる。

本章第 2 節では分娩後 15 日目の血漿中 SAA 濃度による分娩後 45 日目の子宮内膜炎発症を予測可能か否かについても検討した。SAA は動物種間でアミノ酸配列がよく保存されており、動物種に関係なく広汎

な炎症マーカーとして利用できる可能性が高い。SAA の血液中濃度は、ウシの炎症の初期段階で上昇することがよく知られている[5, 9]。また、SAA は感染に対して最も早く反応する[18, 19]。子宮内膜炎は子宮内の感染であり、炎症を伴う疾患であるので、SAA を指標として重症度の判定や、子宮内膜炎発症の予測能が期待された。しかし、本章第 2 節での検討では成績は振るわなかった。SAA はインターロイキン-6 から始まる炎症カスケードによって上昇しやすく、ETX による炎症カスケードはインターロイキン-1 や TNF- α の発現を促す[23, 41]。このような違いから、血漿中 SAA 濃度では予測精度が比較的低くなってしまったかもしれない。

2.3 小括

第 1 章では繁殖成績に炎症が強く関連していることが示唆されたため、本章では子宮内膜炎に注目し、子宮内膜炎由来の炎症が繁殖成績にどのような影響を及ぼすかについて検討を行った。第 1 章で明らかになったとおり、子宮内膜炎は発生頻度が極めて高い分娩後疾患であり、かつ最も空胎日数への影響が大きい疾患であるため早期診断と治療が求められる。子宮内膜炎の発生の予測が可能になるならば、より適切な時期に治療を開始することが可能となる。

本章では子宮灌流液中 ETX 活性値の測定技術を確立し、また子宮灌流液中 ETX 活性値の子宮内膜炎発生予測をする上での有用性を示した。分娩後早期の子宮灌流液中 ETX 活性値の上昇は子宮内での感染と炎症の発生を示唆するものであり、子宮内膜炎発生の予防にはこのような子宮内での感染と炎症に対して対策する必要があることが推察される。続く第 3 章では子宮内での感染および子宮内膜炎の発生を予防するこ

とが可能であるか否かを検討する。

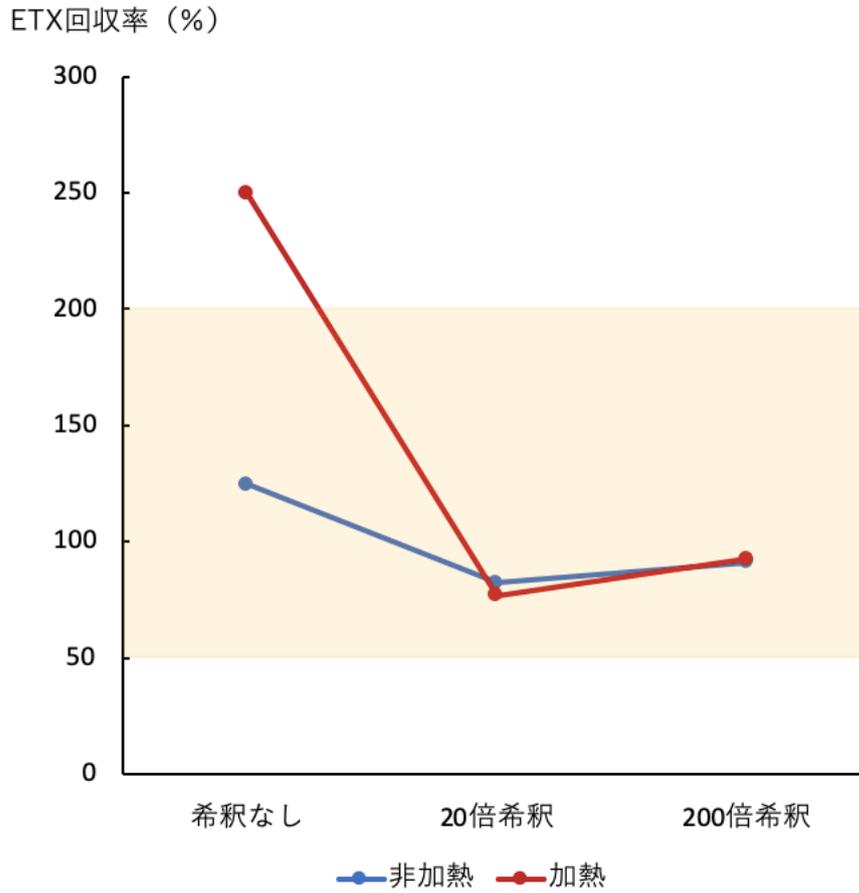


図 2.1.1 各前処理条件における子宮洗浄液中 ETX 回収率
着色部分は米国 FDA の定める基準範囲を示す。

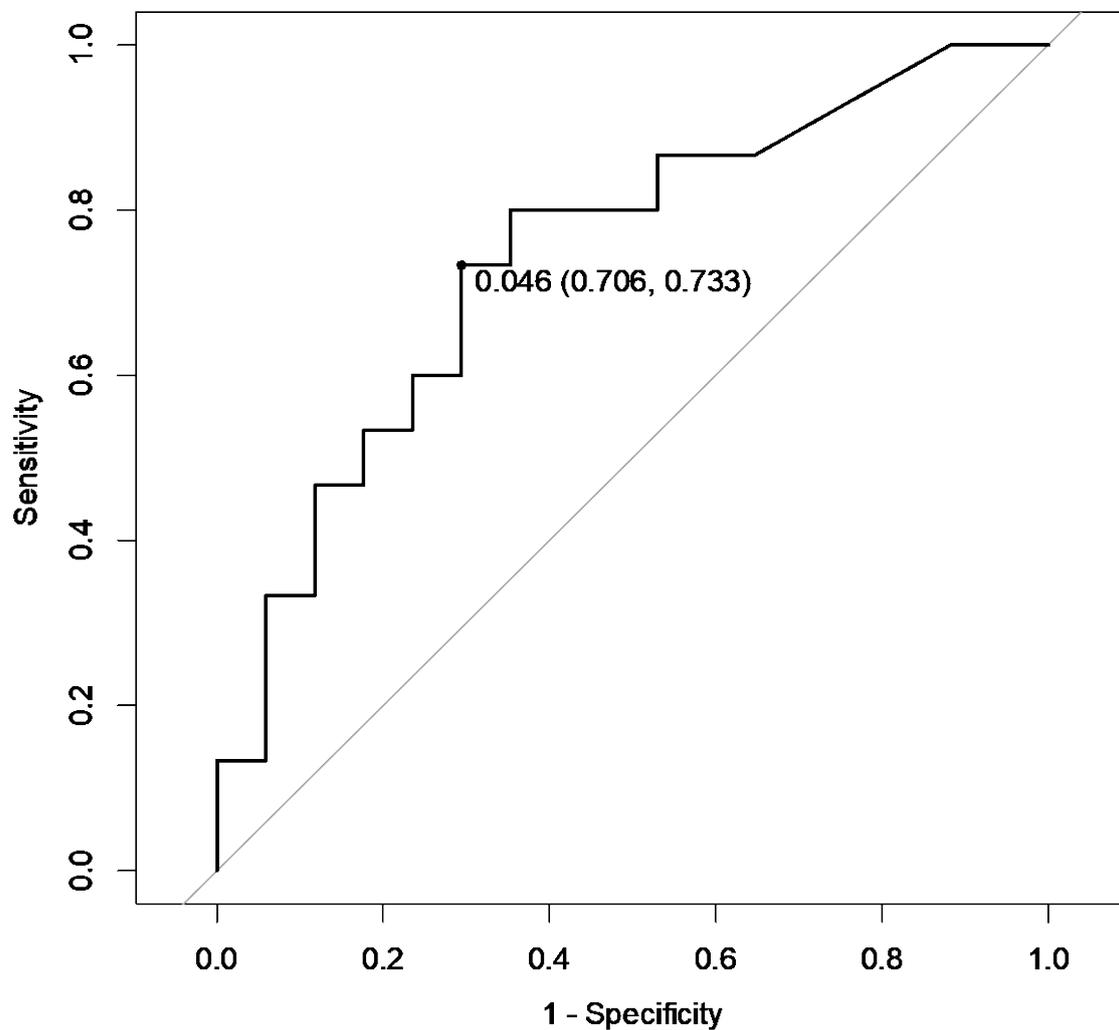


図 2.2.1 分娩後 15 日目の子宮灌流液中エンドトキシン活性値と
 分娩後 45 日目の子宮内膜炎発生との関係を表す ROC 曲線
 図中の数字はカットオフ値（特異度、感度）を表す

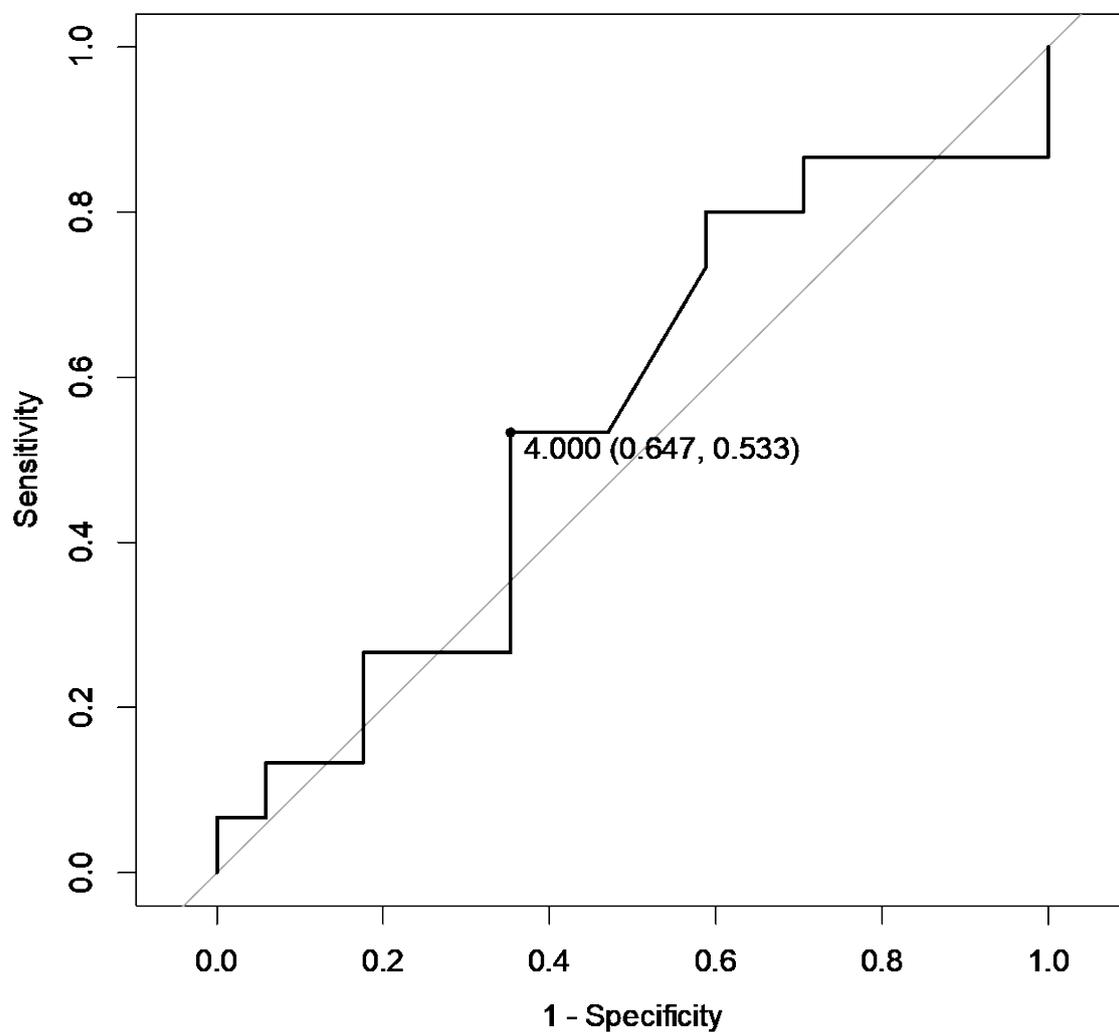


図 2.2.2 分娩後 15 日目の血漿中血清アミロイド A 濃度と
 分娩後 45 日目の子宮内膜炎発生との関係を表す ROC 曲線
 図中の数字はカットオフ値（特異度、感度）を表す

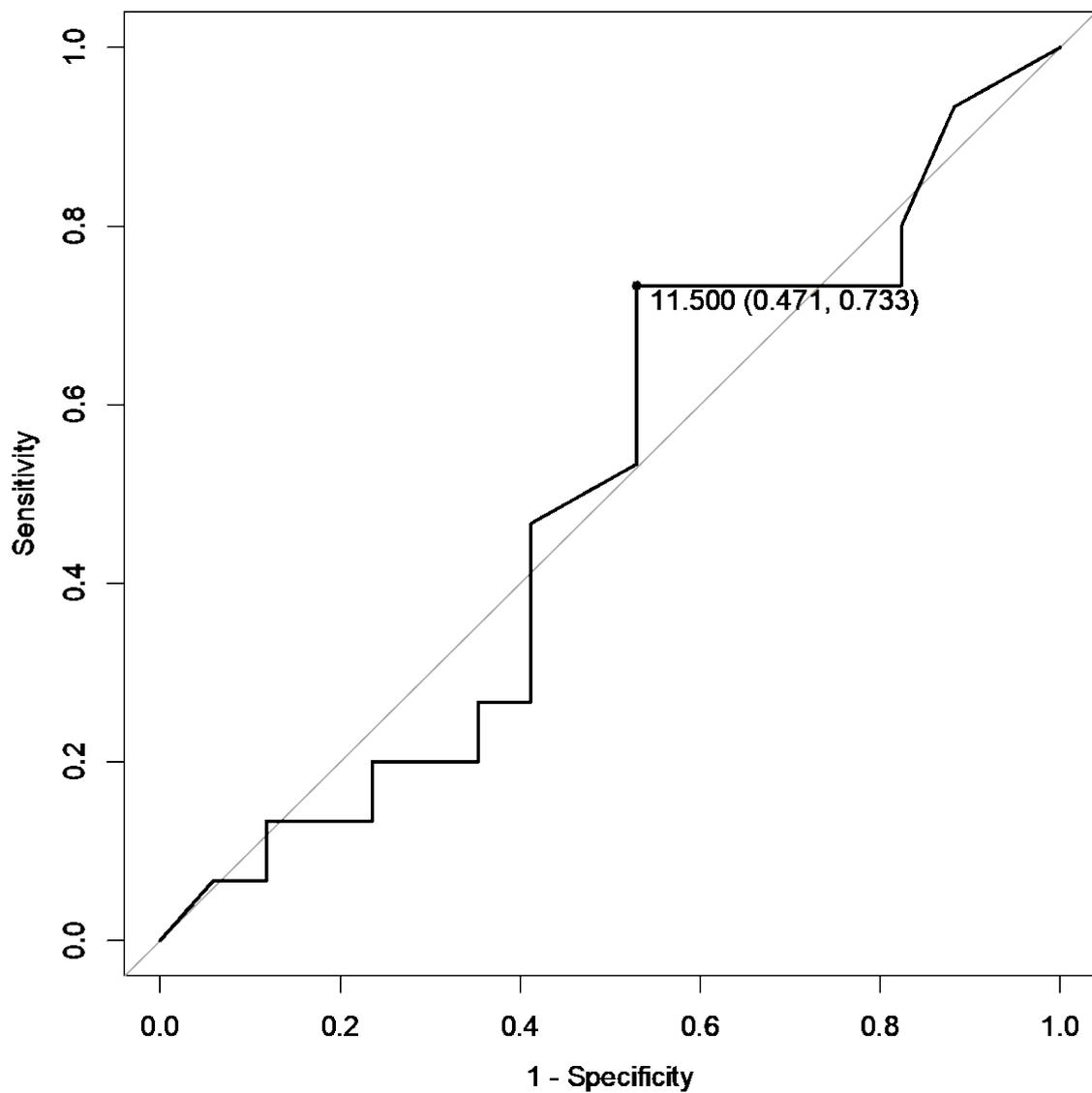


図 2.2.3 分娩後 15 日目の子宮内膜における多形核白血球の割合と分娩後 45 日目の子宮内膜炎発生との関係を表す ROC 曲線
 図中の数字はカットオフ値（特異度、感度）を表す

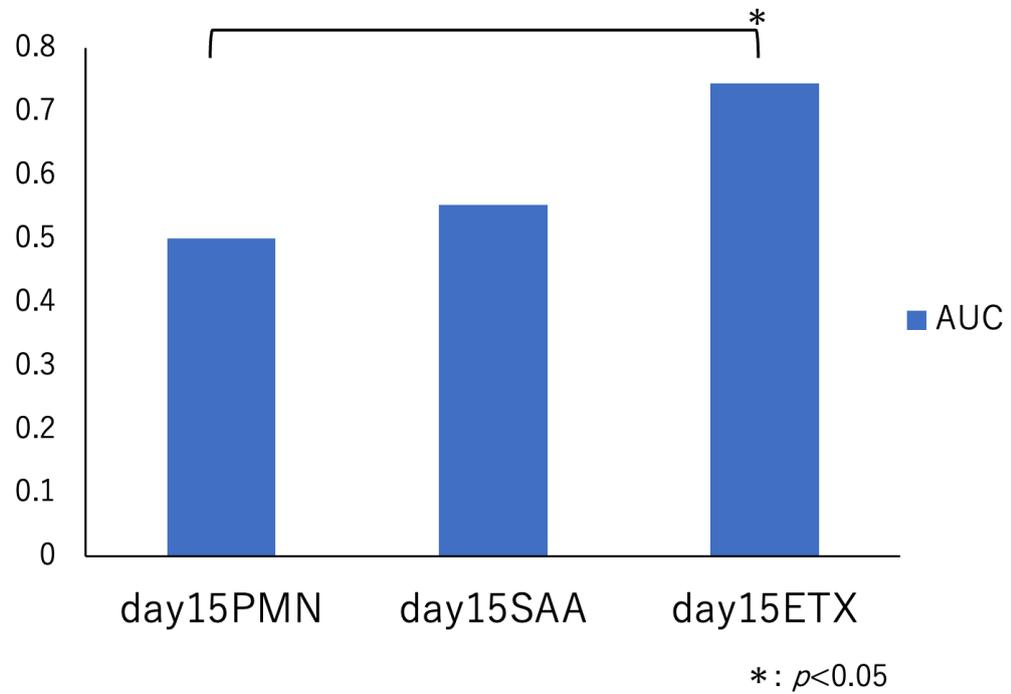


図 2.2.4 分娩後 15 日目における、子宮内膜の多形核白血球割合、血漿中血清アミロイド A および子宮灌流液中エンドトキシン活性値と分娩後 45 日目の子宮内膜炎発生との関係を表す ROC 曲線の曲線下面積 (AUC) を Delong 法により比較した結果

第 3 章

分娩直後の無結晶酸セフトロラムの全身投与が繁殖成績に与える影響

子宮内膜炎の定義が「分娩後 21 日以上経過した子宮内で発生した炎症」であることから[45]、そもそも子宮内膜炎は分娩後 21 日以内では診断ができない。第 2 章では、子宮内膜炎の発生が分娩後 15 日で子宮灌流液中 ETX 活性値を指標に予測できることを示した。これは、分娩後の早い時期に子宮内でグラム陰性菌の汚染が子宮内膜炎を誘起する可能性を強く示唆するものである。ここで、エクセーデ C（有効成分：無結晶酸セフトロフル）は炎症を伴う子宮への薬剤移行性が良い抗生物質であることが知られている[34]。また、エクセーデ C は分娩後早期の子宮炎に対して治療効果があることが知られている[35]。そこで、本章では、子宮内膜炎の予防として分娩後早期に無結晶酸セフトロフルの全身投与をすることにより、子宮内膜炎の発症に至るリスクを軽減できるか否かについて検証した。

3.1 材料および方法

本試験は、北海道農業共済組合道南支所（実施当時：みなみ北海道農業共済組合道南支所）管内の 3 つの民間酪農場で飼養され、2019 年 5 月から 2019 年 11 月までの半年間で分娩したホルスタイン種乳牛 29 頭を用いて実施した。供試された 29 頭は全て経産牛であり、その平均産次数は 2.41、標準偏差は 1.27 であった。

試験牛は無作為性を担保するために分娩順を基準にコントロールおよびエクセーデ群を交互に群分けした。なお、エクセーデ群は分娩後 24 時間以内に用法用量に従い耳根部に無結晶酸セフトロフル（エクセーデ C、Zoetis Japan、東京）を 6.6 mg / kg 投与し、コントロール群は無処置とした。エクセーデおよびコントロール群の供試数はそれぞれ 14 および 15 頭であった。

全ての試験牛について分娩後 15 および 45 日目を基準日として採材を実施した。実際の初回および 2 回目の平均採材実施日は、それぞれ 16.6 ± 5.28 および 48.3 ± 7.17 日目であった。

各採材実施日において、全ての供試牛に対して超音波診断装置（イメージ、IMV、販売代理：フロンティアインターナショナル、東京）を使用して卵巣所見を評価、記録し、また子宮内膜細胞診を実施した。

超音波による卵巣所見評価では、左右どちらかの卵巣に黄体を認める場合には「黄体あり」、それ以外の所見を「黄体なし」として記録した。

子宮内膜細胞診では、サイトブラシ（メトリブラシ、富士平工業、東京）によって子宮内膜細胞を常法に従い回収した。詳述すると、サイトブラシを外筒に収納した状態で子宮内に挿入した後、ブラシ部分を子宮内に露出させて 90 度回転させ子宮内膜を擦過し、速やかにブラシ部分を外筒に戻すことで子宮内膜細胞を回収した。回収した細胞はスライドグラスに載せるように塗布し、直ちに乾燥させた。乾燥させたスライドグラスを 12 時間以内に火炎固定した後、簡易ギムザ染色（簡易迅速染色液 ディフ・クイック、シスメックス株式会社、兵庫）にて染色し、光学顕微鏡で鏡検した。鏡検にて白血球を 100~300 個カウントし、そのうちの多形核白血球（PMN）数に基づいて PMN の百分率（PMN%）を求めた。

全ての試験牛の初回授精までの日数（FAID）を記録した。本研究では、分娩後 45 日目の検査において、 $PMN\% \geq 5\%$ であった牛を子宮内膜炎陽性牛と定義した[13]。また、初回授精とは、飼養している酪農家が発情兆候を発見して獣医師に往診依頼したのち、獣医師が発情兆候を確認して人工授精をおこなったものと定義した。

3.2 統計解析

全ての統計分析にはオープンソース・フリーソフトウェア、GPL 2.0 ライセンスの統計ソフト（R ver. 3.6.0、The Comprehensive R Archive Network が公開）を使用した。エクセーデおよびコントロール群の子宮内膜炎陽性率、および分娩後 15 および 45 日目における黄体形成率をフィッシャーの正確確立検定によって比較した。

被験薬剤（エクセーデ C）の全身投与の有無が FAID にどのような変化をもたらすかを調べる目的で、エクセーデおよびコントロール群の FAID に対する生存曲線を作成し、ログランク検定によって比較した。

3.3 結果

エクセーデ C の全身投与の有無による PMN%、黄体形成率および子宮内膜炎陽性率を表 3.1 に要約した。分娩後 45 日目においてエクセーデ群の黄体形成率は 79%であり、コントロール群の 27%に対して有意に高値であった（フィッシャーの正確確立検定、 $p = 0.014$ ）。また、エクセーデ群の FAID はコントロール群よりも有意に短縮した（ログランク検定、 $p = 0.01$ 、図 3.2）。

3.4 考察

無結晶酸セフチオフルの全身投与により分娩後 45 日目の黄体形成率が上昇し、FAID を短縮することが明らかとなった。一方で、分娩後 24 時間以内の無結晶酸セフチオフルの全身投与では子宮内膜炎の発生率は改善しなかった。また、初回授精の受胎率にも変化がなかった（エク

セーデ群：35.7% vs. コントロール群：46.7%)。

子宮内膜炎は感染性の炎症性疾患であることから、無結晶酸セフトロフルでは子宮内の感染およびその後の炎症を予防することはできないと考えられた。ただし、分娩後45日目の黄体形成率は向上していた。黄体形成にはIGF-1などの成長因子が関与しているとされており[47]、子宮内膜以外での無結晶酸セフトロフルの効果が黄体形成率に関与した可能性が示唆される結果となった。

今後は無結晶酸セフトロフルの全身投与をする時期の検討および抗炎症剤の併用などのプログラムについて評価を行い、子宮内膜炎の発生予防および受胎率の向上につながるプログラムの設計が期待される。

3.5 小括

第2章の結果より、子宮内膜炎は分娩後早期の子宮内の感染と炎症が関与していると考えられた。子宮内膜炎に対しては子宮内に注入用の抗生物質を投与することで治療効果が得られているが[20, 28]、日本国内では以前にはこのような注入薬の使用が認可されていたが、現状では認可薬は存在しない。一方、エクセーデ C は日本国内では呼吸器と趾間フレグモーネに対して認可されている抗生物質だが、米国など海外では分娩後の子宮炎への効果が承認されており

(https://www2.zoetisus.com/content/_assets/docs/dairy/Excede-Marketing-Package-Insert.pdf)、研究報告も散見される[6, 34]。このエクセーデ C を分娩直後に全身投与することで子宮内膜炎を予防することが可能か否かを検討することは酪農業において極めて重要なことであった。従って、本章では分娩直後に無結晶酸セフトロフルを全身投与することによって、子宮内膜炎の発症予防および繁殖成績改善に効

果があるか否かを評価した。その結果、子宮内膜炎の予防効果は確認できなかった。しかし、黄体形成率の向上、FAIDの短縮など、繁殖成績改善への一定の効果が明らかとなった。

表 3.1 分娩後 24 時間以内における無結晶酸セフトロフル全身投与の有無による子宮内多形核白血球の割合、黄体形成率、子宮内膜炎陽性率および初回授精受胎率の変化

	Control	EXCEDE	<i>p</i> -value
PMN(day15)	23.60±27.09	17.93±15.65	0.79
PMN(day45)	5.00±5.06	4.50±4.15	0.89
CL(day15)	0%	21%	0.10
CL(day45)	27%	79%	0.01 *
Subclinical endometritis	40%	36%	1.00
FAID	88.27±39.38	81.64±14.31	0.01 *
First AI pregnancy rate (%)	47%	36%	0.71

Subclinical endometritis: PMN5%< at day45 post partum

PMN: U-test

CL, Subclinical endometritis, First AI pregnancy rate: Fisher test

FAID: log-rank test

PMN: 多形核白血球

CL: 黄体形成率

FAID: 初回授精までの日数

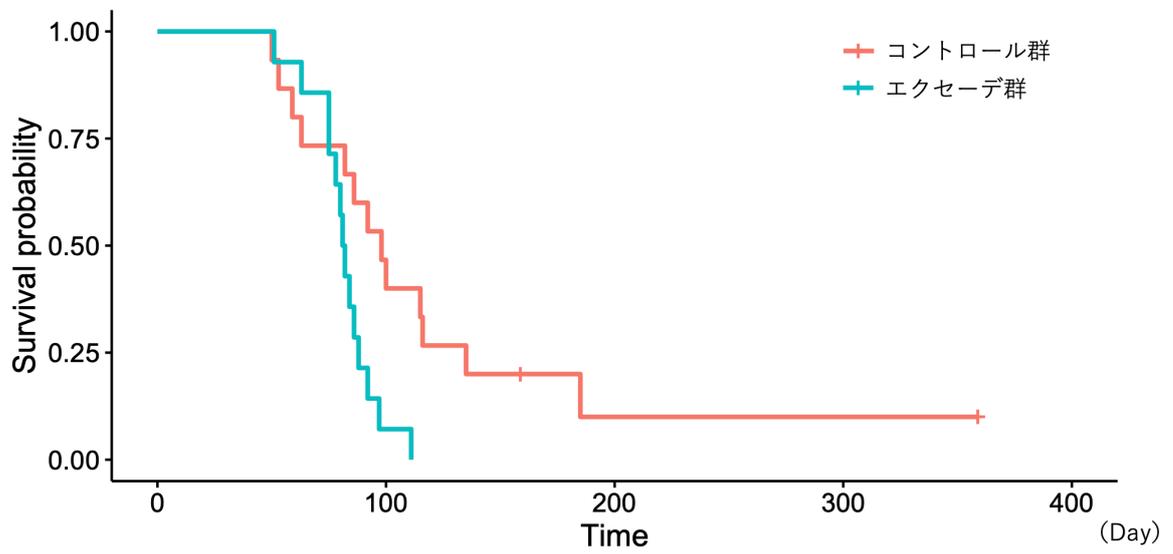


図 3.2 無結晶酸セフチオフルの全身投与による初回授精までの日数の変化

総括

酪農家の収益性を向上させるためには、繁殖成績に影響を与える分娩後疾患を予防することが重要だが、酪農場におけるこれらの分娩後疾患の発生頻度に関する報告は少なく、また、分娩後に発生する多様な疾患がどの程度繁殖成績に影響を与えるのかを比較した研究はほとんどない。分娩後疾患それぞれの発生頻度と繁殖成績に与える影響が明確になれば、繁殖成績を低下させないためにどの分娩後疾患を重点的に対策すべきか、限られた経営資源の優先順位を明確にすることが可能である。

第1章において、酪農場で飼育されている乳牛の分娩後疾患の中で発生頻度の高い分娩後疾患とその繁殖成績への影響について疫学調査を実施したところ、生殖器疾患だけでなく、潜在性乳房炎が繁殖成績に影響を及ぼす因子であることが抽出された。

詳述すると、本研究第1章では、9酪農場のデータを使用した。これらの9酪農場は共通点が多くあり、一部で相違もあった。空胎日数またはAI回数に農場間の差はなかったが、初回授精までの日数(FAID)は一部の農場で差があった。自発的待機期間(VWP)の設定が短い農場ではFAIDが有意に短かった。従って、VWPを短く設定することでFAIDを短縮する可能性はあるものの、空胎日数は短縮しないということが明らかとなった。空胎日数の短縮こそが酪農場の収益性に直接影響することから、短いVWPは今回の研究では収益性には影響を与えないと考えられた。

産次数が高まると、繁殖成績は低下するとこれまでは考えられてきた[10]。しかし、本研究第1章において、各種分娩後疾患の影響を統計的に調整すると、産次数が高いことによる影響は比較的小さいことが明らかとなった。

ロジスティック回帰分析を用いると、一見して2産目の牛は1産目の牛に比べてAI回数と空胎日数が有意に延長し、3産以上の牛はAI回数、FAID、および空胎日数が有意に延長するように見える。しかし、分娩後疾患の影響を調整すると、産次数による影響は非常に小さいものとなった。つまり、AI回数が中央値を超えるリスクが、1産目の牛に比べて2産目の牛で1.79倍となったものの、3産以上の牛では1産目の牛と差がなく、空胎日数が中央値を超えるリスクが1産目の牛に比べて3産以上の牛で1.6倍となったが2産目の牛は1産目の牛と差がなく、FAIDについては全ての産次数で差がなかった。過去のスウェーデンの報告においても、1産目、2産目、および3産以上で群分けした場合、分娩後疾患による影響を調整すると、乳牛の空胎日数には産次数は影響がなかった[31]。この結果は本研究第1章と一致した。

本研究第1章では、タイストール酪農場で最も頻繁に見られる15の分娩後疾患を特定した。現在、一般の酪農場において獣医療サービスを1つの機関が完全に提供することはまれで、治療をする機関、繁殖管理をする機関、給与する餌の管理をする機関が分かれていることが多い。従って、本研究と類似する研究が少なく、過去の研究と直接に比較することは難しい。ただし、それぞれの疾患ごとに分けて調査すると過去の報告が多くあり、罹患率などを比較することが可能であった。

本研究第1章において、子宮内膜炎は2番目に多い疾患であり、発症率は22.8%であった。この頻度は、牛の15 - 20%が臨床的な子宮内膜炎を発症すると述べたSheldonらによるレビューと一致した[44]。本研究第1章において子宮内膜炎は、AI回数および空胎日数を有意に増加させた。従って、子宮内膜炎は授精時の受胎率を低下させる特性があると考えられた。臨床型子宮内膜炎は、初回AI受胎率を38%から

23% に大幅に低下させることが報告されており、過去の報告とも一致している[30]。

過去に、嚢胞性卵巣疾患は受胎率を低下させるわけではないという報告がある[38]。Probo らによると、卵胞嚢腫発生後のホルモン治療に反応した牛の割合と授精に至った牛の割合はそれぞれ 70%および 71%であり、その結果治療後の妊娠率は約 20%と報告されている。すなわち、嚢胞性卵巣疾患は受胎率そのものを低下させないが、受胎に至る機会を低下させることで、繁殖成績を損なうと報告している。しかし、本研究では、卵胞嚢腫は AI 回数と空胎日数においてそれぞれの中央値を超えるリスク因子であった。従って、卵胞嚢腫は受胎率を低下させると考えられた。卵胞嚢腫のこの特徴は、子宮内膜炎の特徴と類似している。Sheldon らは、子宮の細菌感染と嚢胞性卵巣疾患との関連性を指摘しており[45]、本研究第 1 章においても子宮内膜炎と卵胞嚢腫が繁殖成績に同様の影響を与えていることから、子宮内膜炎と卵胞嚢腫の間には強い関連がある可能性が示唆された。

本研究第 1 章では、供試牛の 7.4%が卵巣静止に罹患した。これは、無排卵が栄養不良に関連していると述べた過去の報告[50]と比較して少数であった。本研究では、過去の報告[33]よりもケトーシス状態の牛も少なく、本研究に供試された牛が比較的良好な栄養状態にあったと見ることができるかもしれない。卵巣静止は、空胎日数と FAID を増加させた。この結果は過去の報告とも一致した[7, 50]。

乳房炎は最も頻度の高い疾患であり、空胎日数に有意に影響を与えた。しかし、AI 回数および FAID には影響がなかった。従って、乳房炎は、発情兆候の検出可能性や受胎率ではなく、発情周期に悪影響を与えるものと考えられた。実際、臨床型乳房炎は発情周期に影響を与え、

発情間隔を延長させることが報告されており[36]、排卵の間隔を延長するという報告もある[24, 27]。

乳房炎原因菌のグラム陽性菌およびグラム陰性菌は、乳房のみならず生殖器に悪影響を与えることが報告されている[2, 26]。本研究第1章では、グラム陽性菌とグラム陰性菌の両方が空胎日数に影響を与える要因に思われたが、乳房炎の炎症グレードで統計的な調整をすると、細菌の種類は重要な要因ではなく、炎症グレードこそが大きな影響力を持っていた。これにより、空胎日数は原因病原体にではなく、軽度乳房炎の炎症に大きく影響を受けていることを明らかにした。過去にも同様の報告がある[25]。

潜在性乳房炎は軽度炎症を伴う。潜在性乳房炎に罹患した乳牛では卵胞中のエストラジオール、アンドロステンジオンなどのホルモン濃度が減少し、30%の牛の排卵が遅延する[25]。潜在性乳房炎を引き起こす原因菌として黄色ブドウ球菌と環境性連鎖球菌が挙げられるが、このどちらもインターロイキン-6を活性化させ、さらにはSAAなどの炎症マーカーを上昇させることが知られている[41]。血液中のTNF- α が黄体の活動と排卵に影響を与えるという報告があるように[46]、炎症によって誘発されたTNF- α は発情周期に悪影響を及ぼし、それによって空胎日数が長くなる可能性がある。また、乳房炎におけるグラム陽性菌の外毒素、およびグラム陰性菌からのエンドトキシン放出は、卵巣内の卵胞に影響を与える[12, 40]。これらの報告から、乳房炎が乳牛の発情周期に関わるホルモン分泌を攪乱し発情周期を乱すことで、本研究第1章においても繁殖成績を悪化させたものと考えられる。

乳房炎が繁殖成績に悪影響を与えることは生産現場においてはあまり知られていない。それゆえに繁殖成績向上のために乳房炎を減らそ

うとする獣医師や農業従事者はこれまではほとんどいなかったと思われる。しかし本研究の結果から、タイストール酪農場においては、獣医師は生殖器疾患だけでなく乳房炎も防除する必要がある。

第2章では子宮内の感染および炎症と子宮内膜炎の発生に関係性があることを前提に、分娩後15日目での炎症評価により45日目の子宮内膜炎が予測できるか否かを評価した。子宮内膜炎を診断するにあたり、子宮内膜炎の定義が「分娩後21日以上経過した子宮内に炎症があること」であることから、そもそも分娩後21日以内では診断ができない。その発生を予測する因子として炎症の直接的物質である子宮灌流液中ETX活性値、並びに全身の炎症症状を示す炎症マーカーとしてSAAを指標に検討を行った。実際に子宮灌流液中のETX活性値を測定するためにはその測定方法の確立が必要であった。そのため、第2章第1節では子宮灌流液中ETX活性値を測定する上での最適な条件を検討した。その結果、試料を20倍希釈・非加熱の条件で良好なETX回収率が得られた。また、ETX活性値が測定範囲を越える場合には、200倍希釈することで良好なETX回収率を得ることができた。この測定系の確立により、子宮内のETXによる汚染度を推し量ることが可能になった。これらの結果を踏まえて第2章第2節において分娩後15日目での炎症評価により45日目の子宮内膜炎が予測できるか否かを検討した。その結果、分娩後15日目における子宮灌流液中ETX活性値が、PMN%などこれまで基準とされた指標よりも診断能が高いことが明らかとなった。詳述すると、PMN%の子宮内膜炎診断能を示すROC曲線のAUCは0.5であり、本研究では15日目のPMN%で45日目の子宮内膜炎発症の予測は極めて難しいことが明らかとなった。これに対して、分娩後15日目の子宮灌流液中ETX活性値を指標としたROC曲線のAUCは0.745

であり、これは従来の子宮内膜炎の診断指標として用いられている PMN%での ROC 解析による診断能と比較しても有意に予測精度が高いことが示唆された。従って、子宮内膜炎を予測する因子として分娩後 15 日目における子宮灌流液中 ETX 活性値が有用であることが示唆された。

分娩後 15 日目で ETX を指標に子宮内膜炎を予測できるということは、分娩後の早い時期に子宮内でグラム陰性菌による汚染によって子宮内膜炎が誘起される可能性を強く示唆するものである。海外では子宮内膜炎に対しては子宮内に注入用の抗生物質を投与することで治療効果が得られているが[20, 28]、この製品は日本および米国では承認されていない。日本国内で子宮内注入薬として以前には認可されていた製品が存在したが、現状では認可薬は存在しない。一方、無結晶酸セフトオフル（エクセーデ C）は国内で呼吸器と趾間フレグモーネに対して認可されている抗生物質で、海外では分娩後の子宮炎への効果が承認されており（<https://www2.zoetisus.com/content/assets/docs/dairy/Excede-Marketing-Package-Insert.pdf>）、研究報告も散見される[6,34]。従って、この無結晶酸セフトオフルを分娩後 24 時間以内に全身投与することで子宮内膜炎を予防することが可能か否かを検討することは酪農業において極めて重要なことである。そこで第 3 章では、子宮内膜炎の予防として無結晶酸セフトオフルの全身投与により、子宮内膜炎の発症に至るリスクを軽減できるか否かについて検証した。その結果、無結晶酸セフトオフルの全身投与により分娩後 45 日目の黄体形成率は上昇し、それに関連して初回授精日数が短縮することを明らかにした。この結果から、繁殖成績の改善を目的とした分娩後 24 時間以内の無結晶酸セフトオフルの全身投与は理に適ったプログラムとなり得ることが示唆された。

一方で無結晶酸セフトオフルの全身投与では子宮内膜炎の発症を予防することはできなかった。セフトオフルは海外において臨床型子宮炎に対する治療効果が確認されているが、子宮内膜炎については予防および治療効果を有するか否か明らかではなかった。本研究第3章の結果でも子宮内膜炎を予防する効果は認められなかった。

分娩時に異常があった牛に、分娩後24時間以内にエクセーデを投与すると、子宮炎の発生および分娩後1週間以内の発熱を抑制することができることが報告されている[35]。また、子宮炎がなかった牛と、中等度の子宮炎が発生した牛では子宮収縮や卵巣機能が正常なままだが、深刻な子宮炎が発生すると正常な子宮収縮および卵巣機能が阻害され、無発情、卵胞嚢腫などが発生することが知られている[32]。第3章では、分娩が正常に経過した牛に対して無結晶酸セフトオフルの全身投与により黄体形成が促進されたことから、卵巣機能の回復を促進したと考えられる。また、分娩後45日目での黄体形成率が上昇した背景には、分娩後の排卵が遅れた牛ではIGF-1が低下することから[47]、セフトオフルの全身投与によってIGF-1などの成長因子の分泌を促進する効果があった可能性が考えられるため、今後の研究で明らかにする必要がある。

健常牛と比較して、子宮内膜炎を経験した牛では空胎日数が延長するため、淘汰率が有意に上昇することが報告されている[22]。この報告では受胎率が下がることとその一因として指摘されている。過去の研究において、無結晶酸セフトオフルの全身投与では臨床型子宮炎を治癒させることはできても受胎率の向上にまでは至らないという報告がある[3]。本研究第3章においても、初回授精における受胎率の向上には至らなかった。

無結晶酸セフトロフルの全身投与には繁殖成績改善効果があったものの、子宮内膜炎の予防や受胎率の向上には至らなかった。今後、無結晶酸セフトロフルの全身投与をする時期および抗炎症剤の併用などの新しいプログラムについて評価を行い、子宮内膜炎の発生予防および受胎率の向上につながるようなプログラムの改善が期待される。

本研究を総括すると、以下のことが明らかとなった。

タイストール形式での酪農場において、発生頻度の高い分娩後疾患とその分娩後疾患の繁殖成績への影響が明らかとなった。特に生殖器疾患と乳房炎が繁殖成績を悪化させる要因であり、その共通点は炎症性疾患であった。乳房炎についても、軽度の炎症こそが繁殖成績に悪影響が大きいことが明らかとなった。

子宮内の感染と炎症を評価する目的で子宮灌流液中 ETX 活性値の測定方法を確立し、その技術を用いて分娩後早期に子宮内膜炎発症の予測精度を向上させることが可能となった。この結果から、分娩後早期の子宮内感染と炎症が子宮内膜炎の誘因となることが示唆された。

子宮内膜炎の予防方法として無結晶酸セフトロフルの全身投与を検討した。その結果、無結晶酸セフトロフルの全身投与により、黄体形成率の向上と初回授精日数が短縮することが明らかとなった。繁殖成績改善のプログラムとして、無結晶酸セフトロフルの全身投与は有用である可能性が示唆された。

本研究は、繁殖成績の低下の原因を明らかにすることを目的とした。

その結果、炎症性疾患と繁殖成績の関係が浮き彫りとなった。乳牛の分娩後疾患のうち、生殖器疾患と乳房炎が問題であること、そして乳房炎に関してはその原因菌よりも炎症程度が問題であり、特に軽度の炎症を引き起こす潜在性乳房炎こそが繁殖成績低下の原因であることを明らかにすることができた。また、生殖器疾患のうち、子宮内膜炎は主要な炎症性疾患であった。この病態を研究する技術として子宮灌流液中 ETX 活性値の測定方法を確立し、この技術によってこれまで困難とされた子宮内膜炎の予測精度を向上することができた。さらに子宮内膜炎の予防方法についても検討し、その結果として無結晶酸セフトロム（注）の全身投与プログラムは繁殖成績を改善する効果があることを明らかにした。繁殖成績と炎症性疾患には関連が強く存在し、その関係を明らかにする研究と技術開発により、繁殖成績低下を予測すること、繁殖成績低下を予防することは可能であることを示すことができた。本研究で得られた知見は、今後さらなる繁殖成績向上の研究に寄与するものである。

謝辭

本論文は筆者が酪農学園大学大学院獣医学研究科獣医学専攻博士課程に在籍し、研究成果をまとめたものです。稿を終えるにあたり、本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行に当たって終始ご指導ご助言を賜りました同獣医学研究科 鈴木 一由 教授（主査）に心より感謝の意を表します。また、同獣医学研究科 樋口 豪紀 教授（副査）および蒔田 浩平 教授（副査）にはご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導を戴き、深謝いたします。

論文執筆において多大なご支援を賜りました北海道農業共済組合道南支所 係長 塚野 健志 博士および同研究科同窓の大塚 まりな 博士に心から感謝いたします。採材、サンプルの測定および論文製作に御協力を戴いた同研究科同窓の西 康暢 博士、福田 達也 博士および村上 義樹 氏、さらに酪農学園大学獣医学群獣医学類生産動物医療学分野生産動物外科学ユニットに所属していた田中 李紗 氏に感謝いたします。そして、私の前職であった北海道農業共済組合 道南支所で当時所長を務められていた宮本 裕一 先生には仕事をしながらの研究に理解と多大なるご協力を賜り、心から感謝申し上げます。また、現職に導いて頂いた さの・かーふさぼーと 院長 佐野 公洋 先生には多大なご理解とご協力を頂き、心から感謝申し上げます。

最後に、長期に渡り仕事も家庭も学業に至るまで支えてくれた妻 佑衣、娘 衣智花、愛猫 なつめに親愛の念を込めて感謝いたします。

利益相反

本主論文で開示すべき利益相反（COI：Conflict of interest）はありません。

引用文献

1. Ahmadzadeh, A., Frago, F., Shafii, B., Dalton, J. C., Price, W. J. and McGuire, M. A. 2009. Effect of clinical mastitis and other diseases on reproductive performance of Holstein cows. *Anim Reprod Sci.* **112**: 273–282.
2. Asaf, S., Leitner, G., Furman, O., Lavon, Y., Kalo, D., Wolfenson, D. and Roth, Z. 2014. Effects of *Escherichia coli*-and *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in lactating cows on oocyte developmental competence. *Reproduction.* **147**: 33–43.
3. Brick, T. A., Schuenemann, G. M., Bas, S., Daniels, J. B., Pinto, C. R., Rings, D. M. and Rajala-Schultz, P. J. 2012. Effect of intrauterine dextrose or antibiotic therapy on reproductive performance of lactating dairy cows diagnosed with clinical endometritis. *J Dairy Sci.* **95**: 1894–1905.
4. Cabrera, V. E. 2014. Economics of fertility in high-yielding dairy cows on confined TMR systems. *Animal.* **8**: 211–221.
5. Ceciliani F, Ceron JJ, Eckersall PD, Sauerwein H. Acute phase proteins in ruminants. *J Proteomics.* 2012;75(14):4207-31.
6. Chenault, J. R., McAllister, J. F., Chester, S. T., Dame, K. J., Kausche, F. M. and Robb, E. J. 2004. Efficacy of ceftiofur hydrochloride sterile suspension administered parenterally for the treatment of acute postpartum metritis in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* **224**: 1634–1639.
7. Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S. and LeBlanc, S. J. 2012. Risk factors and effects of postpartum anovulation in dairy cows. *J Dairy Sci.* **95**: 1845–1854.
8. Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S. and LeBlanc, S. J. 2010. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *J Dairy Sci.* **93**: 5225–5233.
9. Eckersall PD, Bell R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and

- inflammation in veterinary medicine. *Vet J.* 2010;185(1):23-7.
10. EICKER S. W., GROHN Y. T. and HERTL J. A. 1996. The association between cumulative milk yield, days open, and days to first breeding in New York Holstein cows. *Journal of Dairy Science.* **79**: 235–241.
 11. Fourichon, C., Seegers, H. and Malher, X. 2000. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: A meta-analysis. *Theriogenology.* **53**: 1729–1759.
 12. Furman, O., Leitner, G., Roth, Z., Lavon, Y., Jacoby, S. and Wolfenson, D. 2014. Experimental model of toxin-induced subclinical mastitis and its effect on disruption of follicular function in cows. *Theriogenology.* **82**: 1165–1172.
 13. Gabler C, Fischer C, Drillich M, Einspanier R, Heuwieser W. Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010; 8:152.
 14. Galvão, K. N. Postpartum uterine diseases in dairy cows. *Anim Reprod*, vol.9, n3, p.290-296, 2012
 15. Galvão, K. N., Frajblat, M., Brittin, S. B., Butler, W. R., Guard, C. L. and Gilbert, R. O. 2009. Effect of prostaglandin F₂ α on subclinical endometritis and fertility in dairy cows. *J Dairy Sci.* **92**: 4906–4913.
 16. Gunay, A. and Gunay, U. 2008. Effects of clinical mastitis on reproductive performance in Holstein cows. *Acta Veterinaria Brno.* **77**: 555–560.
 17. Gwazdauskas, F. C. 1985. Effects of Climate on Reproduction in Cattle. *J Dairy Sci.* **68**: 1568–1578.
 18. Horadagoda, A., Eckersall, P. D., Hodgson, J. C., Gibbs, H. A. and Moon, G. M. 1994. Immediate responses in serum tnf α and acute phase protein concentrations to infection with *Pasteurella haemolytica* A1 in calves. *Res Vet Sci.* **57**: 129–132.
 19. Horadagoda, N. U., Knox, K. M., Gibbs, H. A., Reid, S. W., Horadagoda, A., Edwards,

- S. E. and Eckersall, P. D. 1999. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet Rec.* **144**: 437–441.
20. Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S. and Johnson, W. H. 2005. The effect of a single administration of cephapirin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis. *Theriogenology.* **63**: 818–830.
21. Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S. and Johnson, W. H. 2004. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology.* **62**: 9–23.
22. Kim, I. H. and Jeong, J. K. 2019. Risk factors limiting first service conception rate in dairy cows and their economic impact. *Asian-Australas J Anim Sci.* **32**: 519–526.
23. Kumar N, Manimaran A, Kumaresan A, Jeyakumar S, Sreela L, Mooventhan P, Sivaram M. Mastitis effects on reproductive performance in dairy cattle: a review. *Trop Anim Health Prod.* 2017; 49(4):663-673.
24. Lavon Y, Leitner G, Goshen T, Braw-Tal R, Jacoby S, Wolfenson D. Exposure to endotoxin during estrus alters the timing of ovulation and hormonal concentrations in cows. *Theriogenology.* 2008; 70(6):956-67.
25. Lavon, Y., Leitner, G., Klipper, E., Moallem, U., Meidan, R. and Wolfenson, D. 2011. Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid concentrations and gene expression in bovine preovulatory follicles. *Domest Anim Endocrinol.* **40**: 98–109.
26. Lavon, Y., Leitner, G., Moallem, U., Klipper, E., Voet, H., Jacoby, S., Glick, G., Meidan, R. and Wolfenson, D. 2011. Immediate and carryover effects of Gram-negative and Gram-positive toxin-induced mastitis on follicular function in dairy cows. *Theriogenology.* **76**: 942–953.

27. Lavon, Y., Leitner, G., Voet, H. and Wolfenson, D. 2010. Naturally occurring mastitis effects on timing of ovulation, steroid and gonadotrophic hormone concentrations, and follicular and luteal growth in cows. *J Dairy Sci.* **93**: 911–921.
28. LeBlanc, S. J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Bateman, K. G., Keefe, G. P., Walton, J. S. and Johnson, W. H. 2002. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci.* **85**: 2223–2236.
29. Lohuis, J. A. C. M., Schukken, Y. H., Henricks, P. A. J., Heyneman, R., Burvenich, C., Verheijden, J. H. M., van Miert, A. S. J. P. A. M. and Brand, A. 1990. Preinfection Functions of Blood Polymorphonuclear Leukocytes and the Outcome of Experimental *Escherichia coli* Mastitis in the Cow. *J Dairy Sci.* **73**: 342–350.
30. Machado, V. S., Oikonomou, G., Ganda, E. K., Stephens, L., Milhomem, M., Freitas, G. L., Zinicola, M., Pearson, J., Wieland, M., Guard, C., Gilbert, R. O. and Bicalho, R. C. 2015. The effect of intrauterine infusion of dextrose on clinical endometritis cure rate and reproductive performance of dairy cows. *J Dairy Sci.* **98**: 3849–3858.
31. Maizon, D. O., Oltenacu, P. A., Gröhn, Y. T., Strawderman, R. L. and Emanuelson, U. 2004. Effects of diseases on reproductive performance in Swedish Red and White dairy cattle. *Prev Vet Med.* **66**: 113–126.
32. Mateus, L., Lopes da Costa, L., Diniz, P. and Ziecik, A. J. 2003. Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE₂ and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis. *Anim Reprod Sci.* **76**: 143–154.
33. McArt, J. A. A., Nydam, D. v. and Oetzel, G. R. 2012. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *J Dairy Sci.* **95**: 5056–5066.
34. McLaughlin, C. L., Stanisiewski, E., Lucas, M. J., Cornell, C. P., Watkins, J., Bryson, L., Tena, J. K. S., Hallberg, J. and Chenault, J. R. 2012. Evaluation of two doses of

- ceftiofur crystalline free acid sterile suspension for treatment of metritis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* **95**: 4363–4371.
35. McLaughlin, C. L., Stanisiewski, E. P., Risco, C. A., Santos, J. E. P., Dahl, G. E., Chebel, R. C., LaGrow, C., Daugherty, C., Bryson, L., Weigel, D., Hallberg, J. and Lucas, M. J. 2013. Evaluation of ceftiofur crystalline free acid sterile suspension for control of metritis in high-risk lactating dairy cows. *Theriogenology.* **79**: 725–734.
 36. Moore, D. A., Cullor, J. S., Bondurant, R. H. and Sisco, W. M. 1991. Preliminary field evidence for the association of clinical mastitis with altered interestrus intervals in dairy cattle. *Theriogenology.* **36**: 257–265.
 37. National Research Council (U.S.). Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. and Institute for Laboratory Animal Research (U.S.) 2011. Guide for the care and use of laboratory animals, National Academies Press.
 38. Probo, M., Comin, A., Mollo, A., Cairoli, F., Stradaoli, G. and Veronesi, M. C. 2011. Reproductive performance of dairy cows with luteal or follicular ovarian cysts after treatment with buserelin. *Anim Reprod Sci.* **127**: 135–139.
 39. de Rensis, F. and Scaramuzzi, R. J. 2003. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow - A review. *Theriogenology.* **60**: 1139–1151.
 40. Roth, Z., Asaf, S., Furman, O., Lavon, Y., Kalo, D., Wolfenson, D. and Leitner, G. 2016. Subclinical mastitis disrupts oocyte cytoplasmic maturation in association with reduced developmental competence and impaired gene expression in preimplantation bovine embryos. *Reprod Fertil Dev.* **28**: 1653–1662.
 41. Schukken, Y. H., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M. C., Goetze, L., Holst, O., Leigh, J., Petzl, W., Schuberth, H. J., Sipka, A., Smith, D. G. E., Quesnell, R., Watts, J., Yancey, R., Zerbe, H., Gurjar, A., Zadoks, R. N. and Seyfert, H. M. 2011. Host-

- response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol.* **144**: 270–289.
42. Shanks, R. D., Freeman, A. E. and Berger, P. J. 1979. Relationship of Reproductive Factors with Interval and Rate of Conception. *J Dairy Sci.* **62**: 74–84.
43. Sheldon IM, Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci.* 2004; 82-83:295-306.
44. Sheldon, I. M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G. and Schuberth, H.-J. 2009. Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle¹. *Biol Reprod.* **81**: 1025–1032.
45. Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S. and Gilbert, R. O. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology.* **65**: 1516–1530.
46. Sina, M., Dirandeh, E., Deldar, H. and Shohreh, B. 2018. Inflammatory status and its relationships with different patterns of postpartum luteal activity and reproductive performance in early lactating Holstein cows. *Theriogenology.* **108**: 262–268.
47. Taylor, V. J., Beever, D. E., Bryant, M. J. and Wathes, D. C. 2003. Metabolic profiles and progesterone cycles in first lactation dairy cows. *Theriogenology.* **59**: 1661–1677.
48. Toni, F., Vincenti, L., Ricci, A. and Schukken, Y. H. 2015. Postpartum uterine diseases and their impacts on conception and days open in dairy herds in Italy. *Theriogenology.* **84**: 1206–1214.
49. Vieira-Neto, A., Gilbert, R. O., Butler, W. R., Santos, J. E. P., Ribeiro, E. S., Vercouteren, M. M., Bruno, R. G., Bittar, J. H. J. and Galvão, K. N. 2014. Individual and combined effects of anovulation and cytological endometritis on the reproductive performance of dairy cows. *J Dairy Sci.* **97**: 5415–5425.
50. Walsh, R. B., Kelton, D. F., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S. and LeBlanc,

- S. J. 2007. Prevalence and risk factors for postpartum anovulatory condition in dairy cows. *J Dairy Sci.* **90**: 315–324.
51. Washburn, S. P., White, S. L., Green, J. T. and Benson, G. A. 2002. Reproduction, mastitis, and body condition of seasonally calved holstein and jersey cows in confinement or pasture systems. *J Dairy Sci.* **85**: 105–111.
52. Wenz, J. R., Barrington, G. M., Garry, F. B., McSweeney, K. D., Dinsmore, R. P., Goodell, G. and Callan, R. J. 2001. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* **219**: 976–981.
53. Windig, J. J., Calus, M. P. L. and Veerkamp, R. F. 2005. Influence of herd environment on health and fertility and their relationship with milk production. *J Dairy Sci.* **88**: 335–347.

略語一覽

AI	:	人工授精
AUC	:	曲線下面積
CMT	:	California Mastitis Test
ETX	:	エンドトキシン
FAID	:	分娩後最初の人工授精実施までの日数
FDA	:	U.S. Food and Drug Administration
GPL	:	General Public License
IGF-1	:	インスリン様成長因子 1
KCA	:	Kinetic Chromogenic Assay
KTA	:	Kinetic Turbidimetric Assay
LAL	:	Limulus amebocyte lysate
PMN	:	多形核白血球
PMN%	:	多形核白血球の割合 (%)
ROC	:	Receiver Operating Characteristic
SAA	:	血清アミロイド A
SD	:	標準偏差
TNF- α	:	Tumor Necrosis Factor- α
VWP	:	自発的待機期間

成績の公表

本主論文の成績は下記の通り誌上公表した。

第 1 章

Kitade Y, Tsukano K, Miyamoto Y, Suzuki K. Mastitis causes negative reproduction performance similar to genital diseases. *Res Vet Sci.* 2022 Oct 19;153:35-44. doi: 10.1016/j.rvsc.2022.10.002. Epub ahead of print. PMID: 36308789.

Reserch on the effect of inflammatory diseases on reproductive performance

Rakuno Gakuen University Graduate School

Veterinary Medicine, Large Animal Surgery

Yasuyuki Kitade

The objective of this study was to clarify the effect of inflammatory diseases on reproductive performance and their causes, and to examine the solution.

Declining reproductive performance of dairy cows has been progressing for the past 30 years, and declining reproductive performance reduces dairy farm economic efficiency. In recent years, the involvement of postpartum diseases has been pointed out as a factor of declining reproductive performance. However, few studies have investigated the frequency of postpartum diseases and the extent to which the most common diseases contribute to reproductive performance. When limited to each disease, there have been many reports in the past, and it is well known that endometritis has a large effect on the decline in reproductive performance. Endometritis is an infectious disease in the uterus after the 21 days postpartum. The postpartum uterus is susceptible to contamination and infection by coliform bacteria, which induce severe inflammation due to endotoxin. Serum amyloid A is known to be an acute-phase protein that is sensitive to inflammation and is expected to respond well to endotoxin-induced inflammation in uterus. Although it has been difficult to predict the development of endometritis in the early postpartum period, there are no reports on whether endometritis can be predicted using intrauterine endotoxin activity or serum amyloid A. Because early

postpartum endometritis is difficult to predict, treatments exist but do little to improve fertility and require prevention. Ceftiofur crystalline free acid sterile suspension [CCFA-SS] is a sustained-release antibiotic that lasting approximately 1 week after a single systemic administration and has been shown to be effective in the treatment of metritis. However, there are no reports on prevention of endometritis.

Based on the above, in Chapter 1 of this study, we recorded all post-partum diseases that occur on nine tie-stall style dairy farms in the south region of Hokkaido, Japan, and identified diseases with high frequency of occurrence. The relationship between frequently occurring post-partum diseases and reproductive performance was analyzed by logistic regression analysis. In Chapter 2 of this study, we examined whether the occurrence of endometritis at 45 days postpartum can be predicted using three indices: intrauterine endotoxin activity at 15 days postpartum, plasma serum amyloid A concentration at 15 days postpartum, and percentage of polymorphonuclear leukocytes in the uterus at 15 days postpartum. In Chapter 3 of this study, we examined whether systemic administration of CCFA-SS within 24 hours postpartum can prevent endometritis on the 45th day postpartum. We also investigated the effects of systemic administration of CCFA-SS within 24 hours postpartum on reproductive performance.

As a result, the following facts were clarified. Chapter 1 of this study revealed 15 frequently occurring postpartum diseases and their impact on reproductive performance on tie-stall dairy farms. Among the most frequently occurring postpartum diseases, genital diseases and mastitis had a significant impact on reproductive performance. Especially for mastitis, mild inflammation was found to have a significant negative impact on reproductive performance. In

Chapter 2 of this study, we established a method for measuring intrauterine endotoxin activity for the purpose of assessing infection and inflammation in the uterus. Using this measurement technique, it was found that it was possible to predict the occurrence of endometritis on the 45th day postpartum from the intrauterine endotoxin activity on the 15th day postpartum. Compared to the conventionally used percentage of polymorphonuclear leukocytes, the results significantly improved the accuracy of predicting the development of endometritis in the early postpartum period. In Chapter 3 of this study, systemic administration of CCFA-SS was investigated as a method of preventing endometritis. The results showed that systemic administration of CCFA-SS did not prevent the occurrence of endometritis but improved the luteal formation rate and shortened the days to first insemination. The results suggest that systemic administration of CCFA-SS within 24 hours after parturition may be useful as a program to improve reproductive performance.

The purpose of this study was to determine the relationship between inflammatory diseases and reproductive performance. The results showed that genital diseases and mastitis are the most important postpartum diseases in dairy cows. Especially for mastitis, the degree of inflammation is more important than the causative bacteria. Chronic mastitis, which causes mild inflammation, is the cause of poor reproductive performance. Among genital diseases, endometritis had a significant impact on poor reproductive performance. We established a method for measuring intrauterine endotoxin activity for studying detail of endometritis and this method was able to improve the prediction accuracy of endometritis, which had been considered difficult. Methods of preventing endometritis were also examined, and the results revealed that a systemic

administration program of CCFA-SS was effective in improving reproductive performance.

We have shown that there is a significant relationship between reproductive performance and inflammatory diseases, and that it is possible to predict and prevent poor reproductive performance through research and technological development. The findings of this study will contribute to further research on improving reproductive performance.

