

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 石井 一 功 (大阪府) |
| 学位の種類 | 博士(獣医学) |
| 学位記番号 | 甲第 179 号 |
| 学位授与年月日 | 令和 5 年 3 月 15 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 3 条第 2 項該当 |
| 学位論文題名 | 乳牛の分娩後早期生殖器回復検査による繁殖成績向上の試みに関する研究 |
| 論文審査委員 | (主査) 恩 田 賢 (副査) 金 子 一 幸 河 合 一 洋 長 井 誠 |

論 文 内 容 の 要 旨

[緒言]

乳牛の分娩後早期生殖器回復検査、いわゆるフレッシュチェックは、子宮修復と卵巣周期性再開の遅れを分娩後早期に検査し、必要な場合には処置を行って繁殖成績を向上させようとするものだが、その効果は低いとする意見もある。本研究はフレッシュチェックの診断と治療を見直し、その効果を高めることを目的とした。第 1 章では、生殖器回復の新たな評価基準を作り、それを用いて生殖器状態を分類し、空胎日数を比較した。その結果、フレッシュチェック時に子宮蓄膿症のもの、次いで卵胞嚢腫のもので、空胎日数が大きく延長していたため、第 2 章と第 3 章でそれらの新たな治療法を検討した。

第 1 章 分娩後早期の生殖器状態とその後の繁殖成績

フレッシュチェックの効果や評価が安定しない原因の 1 つは、触診や画像診断による診断や治療法選択の適切さが、実施する獣医師の知識や技術、経験に依存することである。そこで第 1 章では、獣医師の能力の差を埋められるような客観的で効果的な診断基準を作成し、それを用いて生殖器状態を分類し、空胎日数を比較した。

[材料と方法] 分娩後 28～45 日でフレッシュチェックを実施したホルスタイン種乳用牛のベ 9459 頭を供試した。超音波検査と触診による直腸検査で、子宮は直径と膿貯留の有無で 3 群に (Small 群、Medium 群、Large 群)、卵巣は構造と機能診断から 4 群に分類し (発情期 (HT) 群、黄体期 (CL)

群、卵巣静止 (OQ) 群、卵胞嚢腫 (FC) 群)、空胎日数を Kaplan-Meier 生存分析で比較した。

【結果】子宮の 3 群は Small 群、Medium 群、Large 群の順に、卵巣の 4 群は HT 群、CL 群、OQ 群、FC 群の順に空胎日数が長くなり、全ての群間に有意差がみられた。子宮と卵巣の所見を組み合わせ 12 群に分けた比較では、Large-CL 群すなわち子宮蓄膿症が 6.3%で発生し、空胎日数は 182 日と大きく延長した。また Medium-FC 群と Small-FC 群、すなわち卵胞嚢腫は 15.9%を占め、空胎日数は 144 日となり、子宮蓄膿症に次いで大きく延長した。

【考察】本研究で定義した基準で空胎日数が予測可能なことが示唆された。子宮に膿貯留のない、発情や黄体を持つ牛の空胎日数は短いため早期介入の必要はなく、子宮蓄膿症と卵胞嚢腫では空胎日数が大きく延長したことから、より積極的な治療が必要であることが示唆された。

第 2 章 子宮蓄膿症に対する新たな早期治療法とその繁殖成績改善効果

子宮蓄膿症は、子宮内膜での黄体退行因子プロスタグランジン (PG) $F2\alpha$ の産生が阻害され黄体が持続し、子宮頸管が機能的に閉鎖し、子宮内に膿が貯留して発生する。そのため治療には従来 $PGF_{2\alpha}$ やエストロゲン製剤の筋肉内投与が行われてきたが、それでは子宮内の膿が一定期間内に消失する率は低く、空胎日数の短縮も十分ではなかった。そこで本章では、分娩後 28~45 日の子宮蓄膿症の診断時に、 $PGF_{2\alpha}$ と安息香酸エストラジオール (EB) の筋肉内投与に加え、アンピシリン (ABPC) の子宮内投与を併用する治療法を試験した。食品を生産している動物に対する抗生物質の適正使用は産業動物獣医師の使命の 1 つであり、また泌乳最盛期の乳牛に対する抗生物質の投与は、生産者に乳の廃棄という経済的負担をかけるため、強いエビデンスが必要である。

【材料と方法】分娩後 28~45 日に子宮蓄膿症と診断した乳牛 445 頭を用い、 $PGF_{2\alpha}$ 類縁体クロプロステノールを 0.5 mg、および EB を 2 mg の筋肉内投与を行った 221 頭 (ABPC 非投与群) と、 $PGF_{2\alpha}$ および EB に加え、ABPC を 500 mg 子宮内投与した 224 頭 (ABPC 投与群) の 2 群に分け、空胎日数を Kaplan-Meier 生存分析で比較した。さらに治療後 12~17 日の再診時に子宮内の膿が消失した率をカイ 2 乗検定で比較した。

【結果】ABPC 投与群の空胎日数は中央値で 129 日であり、ABPC 非投与群の 193 日に比べ短縮した ($p < 0.001$)。また再診時の膿消失率は ABPC 投与群で 91.1%であり、ABPC 非投与群の 66.1%に比べ高くなった ($p < 0.001$)。

【考察】子宮蓄膿症に対する $PGF_{2\alpha}$ 、EB、ABPC を併用した分娩後 28~45 日の早期治療は、 $PGF_{2\alpha}$ と EB のみの場合と比較して、排膿を促し、空胎日数を短縮した。これは、抗生物質による子宮内の細菌の増殖抑制と、ホルモン療法による子宮頸管拡張や子宮収縮などが相乗的に作用して、早期に排膿と子宮内の清浄化が達成されたためと考えられる。治療による繁殖成績改善によって生産性向上が見込めることから、1 回の乳の廃棄は十分に許容できることが理解され、生産者は本章で試験した抗生物質の併用療法を選択するようになっている。

第3章 卵胞嚢腫に対する新たな早期治療法とその繁殖成績改善効果

分娩後早期の卵胞嚢腫に対する性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) による治療は無効とされているが、卵胞嚢腫の要因のひとつに子宮内膜炎があることから、その治療を併用すれば効果があるかもしれない。子宮内膜炎の治療法としてヨード液の子宮内投与がある。ヨード液は安価で、休薬不要で耐性菌が生じにくく、食品を生産している動物に使用する上で利便性が高いが、その刺激性が子宮内膜を傷害し受胎性に悪影響を及ぼすとされた。近年、子宮内膜の再生力は加齢によって低下することが明らかとなったことから、ヨードの子宮内膜に対する悪影響は牛の年齢で異なる可能性がある。そこで第3章では、分娩後28～45日の卵胞嚢腫牛にGnRHの筋肉内投与とヨード液子宮内投与を併用し、産次別に治療効果を比較した。

【材料と方法】分娩後28～45日に卵胞嚢腫と診断した牛1538頭を、無処置群218頭、2%ポビドンヨード液50mlを子宮内投与したヨード群202頭、GnRH類縁体酢酸フェルチレリン100 μ gの筋肉内投与を行ったGnRH群847頭、ヨードとGnRHを併用した併用群271頭の4群に分け、それぞれ産次別に、空胎日数をKaplan-Meier生存分析で比較した。また卵胞嚢腫群の3産以下130頭、4産以上83頭、および対照として卵胞嚢腫を持たない3産以下79頭、4産以上37頭の、合計329頭の子宮内膜スミアを採取し、子宮内膜炎罹患率および子宮内細菌検出率をカイ2乗検定で比較した。さらに無処置群33頭、ヨード群19頭、GnRH群28頭、併用群56頭、合計136頭の、処置前と処置12～17日後の子宮内膜スミアを採取し、処置前後の子宮内膜炎罹患率と子宮内細菌検出率をカイ2乗検定で比較した。

【結果】ヨード群では初産牛のみで、併用群では3産以下で、無処置群に比較して空胎日数は有意に短縮した ($p < 0.05$)。卵胞嚢腫群の子宮内膜炎罹患率と子宮内細菌検出率は、産次を問わず、対照群と比較して高く ($p < 0.01$)、処置前後の比較では、併用群において処置前に較べ処置後に低下したが ($p < 0.05$)、他の群では有意な低下は認められなかった。

【考察】分娩後早期の卵胞嚢腫発生には、子宮修復期の子宮内膜炎が関与していることが示唆された。また卵巢からの性ホルモンの周期的変動が子宮修復を促進することから、分娩後早期の卵胞嚢腫では子宮と卵巢が互いの回復を抑制する一種の悪循環が起きていると考えられる。3産以下の併用群で空胎日数が短縮したのは、子宮と卵巢の双方に同時に処置を行うことにより、子宮と卵巢の好循環が起こり、子宮内膜再生が促進された可能性がある。4産以上で空胎日数が短縮しなかった理由は、子宮内膜再生能の低下がある高齢牛では、既報の通りヨードの刺激が子宮内膜を傷害し受胎性に悪影響を及ぼしたと考えられる。

【総括】分娩後28～45日のフレッシュチェックにおいて、子宮は直径と膿の貯留で3つに、卵巢は構造と機能診断で4つに分け、組み合わせて12の群に分類する方法で、空胎日数を予測できた。また子宮蓄膿症と卵胞嚢腫が牛群の繁殖成績を大きく低下させていることが明らかとなった。子宮蓄膿症に対しては従来法であるPGF_{2 α} の投与に加えEBとABPCを併用する治療法で、卵胞嚢腫に対しては

従来法である GnRH に加えヨード液の子宮内投与を併用する治療法で、空胎日数を短縮できた。以上より、本研究の方法によるフレッシュチェックは、繁殖成績の改善に有用であることが示唆された。

第 1 章の一部は下記に公表した。

Ishii, K., Maeda, K., Kazama, K., Arai, S., Onda, K.: The influence of early postpartum uterine and ovarian recovery status on subsequent reproductive performance in Holstein dairy cows. *Large Animal Review*, 28, 285-290 (2022)

第 2 章の一部は下記に公表した。

石井一功, 前田啓治, 風間啓, 新井佐知子, 恩田賢: 乳牛の子宮蓄膿症に対する抗生物質を用いた早期治療が空胎日数に及ぼす影響. *産業動物臨床医学雑誌*, 13 巻, 5 号, 195-199 (2022)

論文審査の結果の要旨

1. 論文の背景

乳牛の分娩後早期生殖器回復検査、いわゆるフレッシュチェックは、子宮修復と卵巢周期性再開の遅れを分娩後早期に検査し、必要な場合には処置を行って繁殖成績を向上させようとするものである。しかし、飼養頭数が 1 万頭を超えるアメリカやカナダの牛群では、ホルモン処置と定時受精が一般的となり、依然として数百頭以下の牛群が中心の我が国においても、フレッシュチェックの費用対効果は低いという意見がある。

そこで本研究では、フレッシュチェックによる診断と治療の方法を見直し、繁殖成績の向上に利用可能であるかを検討した。

2. 論文の内容

本研究では、第 1 章で生殖器回復の新たな評価基準を作り、それを用いて子宮と卵巢の状態を分類し、空胎日数の比較を行った。その結果、フレッシュチェック時に空胎日数が最も延長していたのは子宮蓄膿症、次いで長かったのは卵胞嚢腫であったため、第 2 章と第 3 章でそれらの疾患の新たな治療法を検討した。

第 1 章 分娩後早期の生殖器状態とその後の繁殖成績

フレッシュチェックの費用対効果を向上させるために、新たに客観的診断基準を作成し、それを用いて子宮と卵巢の状態を分類し、空胎日数を比較した。実験には分娩後 28～45 日でフレッシュチェックを実施したホルスタイン種乳牛、延べ 9459 頭を供試した。超音波検査と直腸検査による触診で、子

宮は直径と膿貯留の有無で3群に（Small群、Medium群、Large群）、卵巢はその構造と機能診断から4群に分類し（発情期（HT）群、黄体期（CL）群、卵巢静止（OQ）群、卵胞嚢腫（FC）群）、空胎日数をKaplan-Meier生存分析で比較した。その結果、子宮と卵巢の所見を組み合わせ12群に分けた比較では、Large-CL群、すなわち子宮蓄膿症が6.9%で発生し、空胎日数は185日と最も大きく延長した。またMedium-FC群とSmall-FC群、すなわち卵胞嚢腫は17.0%を占め、空胎日数は144日となり、子宮蓄膿症に次いで大きく延長した。すなわち、本研究の新たな分類方法は、乳牛の空胎日数を予測可能なことが明らかとなった。子宮に膿貯留のない、発情期や黄体期の牛の空胎日数は短いため早期介入の必要はなく、子宮蓄膿症と卵胞嚢腫では空胎日数が大きく延長したことから、より積極的な処置介入が必要であることが示唆された。

第2章 子宮蓄膿症に対する新たな早期治療法とその繁殖成績改善効果

子宮蓄膿症の治療にはPGF_{2α}やエストロゲン製剤の筋肉内投与が行われてきたが、ホルモン剤のみによる治療法では、子宮内の膿が一定期間内に消失する率は低く、空胎日数の短縮も十分とはいえなかった。そこで本章では、分娩後28～45日の子宮蓄膿症の診断時に、PGF_{2α}と安息香酸エストラジオール（EB）の筋肉内投与に加え、アンピシリン（ABPC）の子宮内投与を併用する方法を試みた。その結果、子宮蓄膿症に対してPGF_{2α}とEBに加え、ABPCを併用した早期治療は、PGF_{2α}とEBのみの場合と比較して、排膿を促し空胎日数を短縮した。これは、抗生物質による子宮内の細菌の増殖抑制と、ホルモン療法による子宮頸管拡張や子宮収縮などが相乗的に作用して、早期に排膿と子宮内の清浄化が達成されたためと考えられた。

第3章 卵胞嚢腫に対する新たな早期治療法とその繁殖成績改善効果

分娩後早期の卵胞嚢腫に対する性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）による治療は無効とされているが、卵胞嚢腫の要因のひとつに子宮内膜炎があることから、その治療を併用すれば改善効果があるかもしれない。子宮内膜炎の治療法として、以前からヨード液の子宮内注入がある。ヨード液は安価で休薬不要、耐性菌が生じにくく、産業動物では利便性は高いが、その刺激性が子宮内膜を傷害し受胎性に悪影響を及ぼすとされている。そこで、フレッシュチェック時に卵胞嚢腫の牛に対してGnRHの筋肉内投与と、ヨード液の子宮注入を併用し、産次別に治療効果を比較した。その結果、ヨード群では初産牛のみで、併用群では1～3産で、無処置群に比較して空胎日数が有意に短縮した。他の処置群では空胎日数の短縮はみられなかった。卵胞嚢腫群の子宮内膜炎罹患率と子宮内細菌検出率は、産次を問わず対照と比較して有意に高かったが、処置前後の比較では、併用群においてのみ処置前に比べ処置後に有意に低下した。

3. 論文審査

1) テーマの立て方

フレッシュチェックの有用性を、子宮と卵巣の状態の組み合わせによる分類と、空胎日数で評価するというアイデアは独創的。また、その結果から空胎日数延長の最も大きな問題となっている二つの疾患を明らかにし、それらに対して新たな治療法を試みたことは、結果的に非常に有益であった。

2) 研究の背景

フレッシュチェックの有用性には疑問の声もあることから、分娩 28～45 日の繁殖検診でどのような情報が得られるのか、得られた情報に対してどのような対応をすれば空胎期間が短縮できるのかを検討することには大きな意義がある。新しい治療法については長年の臨床獣医師として得られた経験と情報が活かされており、研究の価値を高めている

3) 研究の方法

現場の獣医師でなければ得られなかったであろう、9年間で9000頭以上の乳牛から収集したデータの価値は圧倒的なものがある。これだけの臨床例の直腸検査、超音波検査、子宮内膜炎検査、細菌検査などで得られた成績の統計解析も、おおよそ適切であった。本研究で最も重要な空胎日数の解析に、治療効果を判定する Kaplan-Meier 生存分析を用いたことも効果的。

4) 研究の結果

実験計画がシンプルで無理がないために、各章で得られた結果は明瞭で考察する価値が高い。図表や写真を有効に利用し、分かりやすく説明している。論文発表会で指摘された、子宮内膜炎などの改善効果に関するカイ 2 乗検定の結果は、図で表すのではなく新たに表を作成して説明しており、改善したと評価する。

5) 考察と結論

各章で得られた結果を関連分野の多くの知見と深く関連させ、独自の解釈を加えている。1章では卵巣と子宮の検査所見のみから空胎日数を推測できることを明らかにしたが、先行研究との類似点と相違点について興味深い考察を展開している。2章では子宮蓄膿症に対して PGF_{2a} だけではなく子宮内に抗生物質を投与することが、3章では卵胞嚢腫に対して GnRH 製剤だけでなく子宮内にヨード液を投与することが、大きな改善効果を示すことの原因について深く考察している。

6) 参考文献

本研究に関わる先行研究を十分に含んでおり、それぞれを適切に引用して、研究計画や実験方法の妥当性、考察の論理性を担保している。

4. 審査結果

本研究により、分娩後早期生殖器回復検査、すなわち分娩後 28～45 日に行われているフレッシュチェックの際の、子宮と卵巣の比較的簡易な評価から、空胎日数が予測できることを明らかにした。また、最も空胎日数を延長させる要因であった、子宮蓄膿症と卵胞嚢腫に対して新規の治療法を試み、その有用性を確認した。これらの知見は酪農現場で応用することによって、乳牛の繁殖成績を大きく向上させることが期待でき、産学協同の成果として大きな価値がある。以上のことより、本申請論文は博士（獣医学）の学位の授与にふさわしい研究業績であると判定した。

なお、本学位申請論文を構成する内容は、以下のとおり論文として公表した。

1. Ishii, K., Maeda, K., Kazama, K., Arai, S., Onda, K.: The influence of early postpartum uterine and ovarian recovery status on subsequent reproductive performance in Holstein dairy cows. *Large Animal Review*, 28, 285-290 (2022)
2. 石井一功, 前田啓治, 風間啓, 新井佐知子, 恩田賢: 乳牛の子宮蓄膿症に対する抗生物質を用いた早期治療が空胎日数に及ぼす影響. *産業動物臨床医学雑誌*, 13 巻, 5 号, 195-199 (2022)