

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580385

研究課題名（和文） ウシ潜在性子宮内膜炎の新規診断基準の確立と分娩後早期繁殖機能促進プログラムの構築

研究課題名（英文） Development of a novel diagnostic criteria of subclinical endometritis and a program that enhances reproductive functions in postpartum cows

研究代表者

大澤 健司（OSAWA TAKESHI）

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：90302059

研究成果の概要（和文）：

黒毛和種およびホルスタイン種経産牛における潜在性子宮内膜炎の客観的評価手法を確立し、子宮環境と受胎成績との関係を明らかにすることを目的として一連の試験を実施した。その結果、分娩後早期の子宮内膜 PMN%はその後の受胎性を予測する上での指標となり得ること、および超音波検査による子宮角直径サイズの変化から子宮内膜炎を診断することには制限があることが明らかとなった。また、乾乳後期の乳牛への不飽和脂肪酸給与は分娩後の子宮修復を促進させる効果があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to establish systematic and objective diagnostic methods of subclinical endometritis in early postpartum Japanese black and Holstein cows. The results of the study suggest that endometrial PMN% could be a suitable parameter for predicting fertility, change in size of the uterine horns by ultrasonography has limitations as a diagnosis for subclinical endometritis, and unsaturated fatty acid supplementation to dairy cows during late dry period may hasten uterine involutions postpartum period.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：臨床繁殖・産科

1. 研究開始当初の背景

受胎率を低下させる主要因の一つとして子宮環境の悪化があげられるが、特に潜在性子宮内膜炎については信頼性の高い診断基準が国内外を問わず確立されていないのが現状で

あり、その結果、潜在性子宮内膜炎による長期不受胎牛の存在が牛群の繁殖管理を悪化させる一因となっている。我々はこれまで、潜在性子宮内膜炎の診断方法として、子宮内膜細胞診と子宮頸管粘液スコアリングに超音波

検査を組み合わせて子宮環境を客観的に評価するシステムを確立すべく試験を実施してきた。その結果、分娩後早期における子宮頸管粘液スコアならびに子宮内膜のPMN(多形核白血球)出現率がその後の卵巣機能の回復および受胎率と関係していることを明らかにした(Waleed et al., 2008a, 2008b)。しかし黒毛和種牛での評価基準は不明である。また、子宮環境の悪化は卵胞発育ならびに卵胞由来のエストロゲン分泌に抑制的に作用することが報告されている(Sheldon et al., 2002)ことから、OPU成績を分析する上で子宮環境を客観的に評価することは重要である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、黒毛和種経産牛およびホルスタイン種経産牛における子宮内膜細胞診、子宮頸管粘液スコアリングおよび超音波検査を組み合わせた診断により、分娩後早期における子宮環境、特に潜在性子宮内膜炎を客観的に評価する手法を確立すること、これらの指標のなかで有効な項目を組み合わせ、正確な診断基準を確立し、子宮環境と受胎成績との関係を明らかにすることを目的とした。

(2) 試験Ⅰ：黒毛和種経産牛の子宮内膜スミア中の多形核白血球の割合(PMN%)を測定することで分娩後早期の子宮内膜の炎症像をモニターすること、腔内留置型プロジェステロン製剤(PRID)を用いた排卵同期化処置が子宮内環境に与える影響、およびその後の繁殖成績との関連を明らかにすることを目的とした。

(3) 試験Ⅱ：ホルスタイン種経産牛の分娩後5週における腔内・子宮内環境をモニターし、両者の関係ならびに形態的な子宮修復と子宮内多形核白血球の割合(PMN%)との相関を明らかにすることを目的とした。

(4) 試験Ⅲ：ホルスタイン種経産牛の乾乳後期における飼養管理が分娩前後の代謝機能、免疫および子宮内環境へ及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試験Ⅰ：検査開始日において分娩後平均22.4日の黒毛和種授乳牛14頭を供試、検査開始日をDay -7とし、Day 0にPRIDを挿入した。Day 7にPRIDを抜去、PGF2 α 製剤を筋肉内投与、Day 9にGnRH製剤を筋肉内投与

した。14頭中8頭についてはDay 10に定時人工授精を行い(TAI群)、6頭はDay 17に定時胚移植(TET群)を行い、Day 42に妊娠診断した。すべての供試牛についてDay -7, 0, 7および14の計4回、メトリチェックにより採取した腔粘液スコアと、サイトブラシにより採取した子宮内膜スミア中のPMN%を測定した。

(2) 試験Ⅱ：ホルスタイン種経産牛54頭を供試、分娩後5週目に子宮と卵巣の超音波検査と共に腔粘液および子宮内膜スミアを採取した。超音波検査において左右子宮角の外径と内膜径を計測し、前回の妊娠における妊角および非妊角の直径の差が5mm以下の個体を修復群、6mm以上の個体を未修復群とした。また子宮内液体貯留(FIU)の有無によりFIU+あるいはFIU-として計4群に分類した。腔粘液は透明な粘液をスコア0とし、以下粘液中に占める膿の割合によってスコア1,2,3および4の5段階に分類した。子宮内膜スミア中のPMN%を算出した。各群における腔粘液スコアとPMN%を比較し、検査時の黄体の有無による影響についても解析した。

(3) 試験Ⅲ：分娩予定の3週間前(W-3)から分娩後7日までに与える添加飼料の種類に応じて供試牛(ホルスタイン種経産牛81頭)を、n-6不飽和脂肪酸給与群(n-6群:n=19)、n-3不飽和脂肪酸給与群(n-3群:n=22)、飽和脂肪酸給与群(SFA群:n=21)、および対照群(CON群:n=19)の計4群に任意に分けた。W-3と分娩前1週(W-1)、分娩後3週(W3)、5週(W5)および7週(W7)に血液生化学検査を行い、血糖(GLU)、尿素窒素(BUN)、総コレステロール(T-CHO)、遊離脂肪酸(NEFA)および β -ヒドロキシ酪酸(β -HB)濃度を測定し、W5とW7に子宮頸管径の測定、メトリチェックによる腔粘液の採取とサイトブラシによる子宮内膜スミアの採取を行った。メトリスコアは5段階で評価、子宮内膜スミアはPMN6%を超えるものを子宮内膜炎とした。

4. 研究成果

(1) 試験Ⅰ：排卵同期化率は100%(14/14)であった。受胎率はTAI群が37.5%(3/8)、TET群が0%(0/6)であった。腔粘液スコアはPRID挿入により有意に増加し、PRID抜去後1週間で有意に減少した(図1)。供試牛の平均PMN%は分娩後日数の経過に伴い減少した。また、受胎3頭(受胎群)におけるDay 0での平均PMN%(3.2%)は不受胎11頭(不受胎群)(17.1%)と比較して有意に低かった(図2)。受胎群では全頭で同期化処置前後

の PMN%が 10%未満で推移した。以上の結果より、PRID は分娩牛の子宮内環境に影響を与えないこと、分娩後 30 日以降における子宮内膜の PMN%が 10%未満である個体への交配が受胎率向上につながる事が推察された。

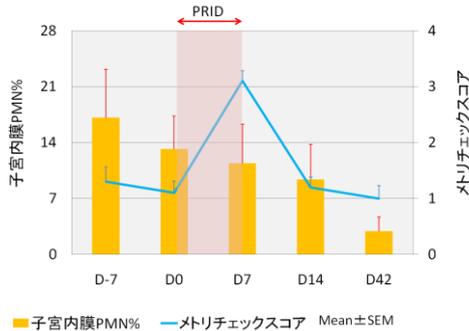


図 1. 子宮内膜 PMN%とメトリチェックスコアの推移

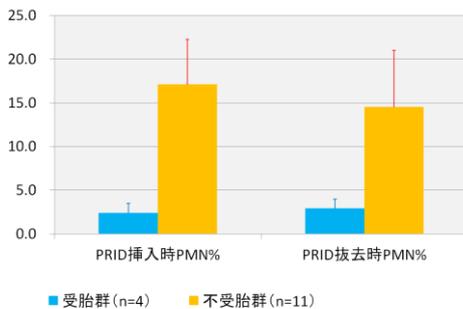


図 2. PRID 挿入前後における受胎群と不受胎群の PMN% (Mean ± sem; a,b : P<0.05)

(2) 試験Ⅱ：修復群(FIU+)および未修復群(FIU-)の子宮外径は修復群(FIU-)および未修復群(FIU-)と比較してそれぞれ有意に大きく、修復群(FIU+)では修復群(FIU-)よりも有意に大きい内膜径を示した(図3)。PMN%は修復群(FIU-)と修復群(FIU+)で高値を示す個体が認められ、10%を超える個体の割合はそれぞれ 23.8% (5/21)、40.9% (9/22)であった。一方、未修復群(FIU-)と未修復群(FIU+)の PMN%はいずれも低値を示し、10%を超える個体は認められなかった。全頭における腔粘液スコア別の PMN%について、スコア 4 はスコア 0,1,2 および 3 に比べて有意 (P<0.01) に高値を示した(図4)。腔粘液スコアや PMN%に対する、検査時の黄体の有無による影響は認められなかった。修復群と未修復群における腔粘液スコアならびに PMN%に有意差は認められなかった。

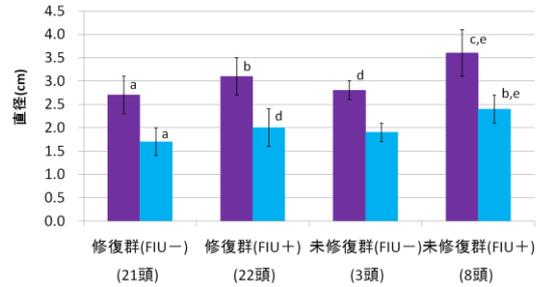


図 3. 修復群 (FIU+, FIU-) および未修復群 (FIU+, FIU-) における子宮の既妊角外径と内膜径の平均 (±S.D.). ■既妊角外径、■既妊角内膜径 (a,b,c: P<0.01 d,e: P<0.01)

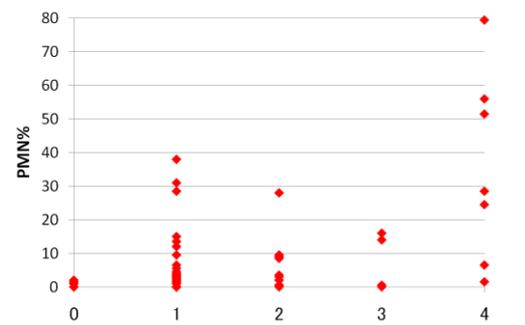


図 4. 全頭の腔粘液スコアと PMN%の分布

(3) 試験Ⅲ：PMN%は W5、W7 とともに 4 群間で有意差を認めなかったものの n-6 群では CON 群よりもやや低く、子宮頸管径は n-6 群および n-3 群において W7 では W5 と比較して有意 (P<0.05) に低値であった。メトリスコアは W5 と W7 との間、および 4 群間で有意差を認めなかった。GLU は W3 において n-6 群が他の 3 群と比較して有意 (P<0.05) に高値であった(図5)。BUN は W5 で SFA 群が他群と比較して有意 (P<0.05) に高値であった。NEFA は W-3 を除く全ての試験期間において n-6 群が有意 (P<0.05) に低値であった(図6)。さらに、BHB は W3 において n-6 群は SFA 群、CON 群と比較し有意に低く、W5、W7 において低値を示した(図7)。以上の結果より、乾乳後期における脂肪酸の給与は分娩後の子宮修復を促進させる効果を有することが示唆された。また、n-6 不飽和脂肪酸の給与は、泌乳初期における体脂肪の動員を抑制する効果を有すること、そしてこの効果は n-3 不飽和脂肪酸よりも高いことが示唆された。

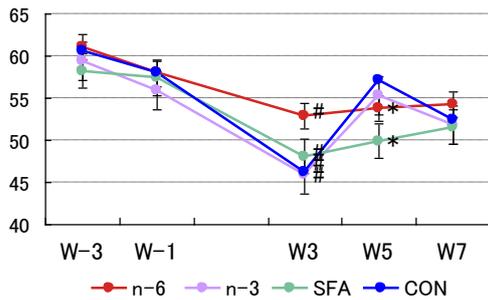


図5. 分娩前後の脂肪酸給与がグルコース濃度 (mg/dl; 平均±sem) に及ぼす影響 (#; P<0.01 *; P<0.05)

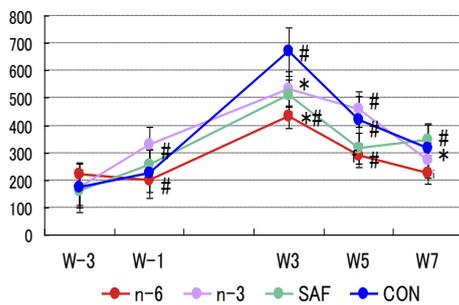


図6. 分娩前後の脂肪酸給与が NEFA 濃度 (μEq/l; 平均±sem) に及ぼす影響 (#; P<0.01 *; P<0.05)

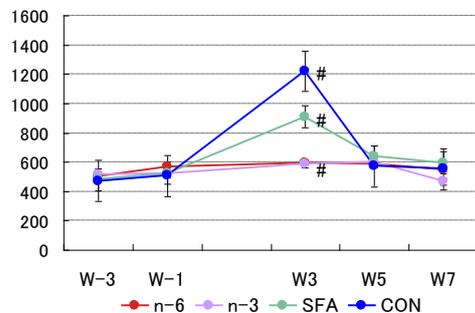


図7. 分娩前後の脂肪酸給与が BHB 濃度 (μmol/l; 平均±sem) に及ぼす影響 (#; P<0.01)

(4) まとめ

以上の結果をまとめると、黒毛和種経産牛の分娩後早期における子宮内膜の PMN%はその後の受胎性を予測する上での指標となり得ること、乳牛において超音波検査による子宮角直径サイズの変化から子宮内膜炎を診断することには制限があること、そして乾乳後期の乳牛への n-6 不飽和脂肪酸給与は分娩後早期の NEFA および BHB の上昇による免疫細胞の機能低下を防ぎ、分娩後の子宮修

復を促進させる効果があることが示唆された。これらの新知見は、国内外の肉用牛および乳用牛における子宮内膜炎の診断および予防法の確立にも応用でき、家畜の損害防止の観点からも有用性の高い成果である。今後は精度の高い診断体系を構築すると共に、治療プロトコールおよび予防プログラムの確立に向けた研究を推進していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Senosy, W.S., Uchiza, M., Tameoka, N., Izaïke, Y., Osawa, T., Evaluation of reproductive tract infection during early postpartum period and its relationship with subsequent reproductive performance in high-producing dairy cows, *Reprod. Dom. Anim.*, 査読有, Vol. 47, 2012, 203-207
- ② Oku, Y., Osawa, T., Hirata, T-I, Kubo, M., Kon, N., Akasaka, S., Senosy, W.S., Takahashi, T., Izaïke, Y., Validation of a direct time-resolved fluoroimmunoassay for progesterone in milk from dairy and beef cows, *Vet. J.* 査読有, Vol. 190, 2011, 244-248
- ③ LeBlanc, S., Osawa, T., Dubuc, J., Reproductive tract defence and disease in postpartum dairy cows, *Theriogenology*, 査読有, Vol. 76, 2011, 1610-1618
- ④ Hirata, T-I, Kon, N., Sugiyama, A., Sato, M., Osawa, T., Effect of follicular aspiration at the onset of progesterone-based timed artificial insemination protocol on the follicular dynamics and fertility in early postpartum Japanese black cows. *J. Reprod. Dev.*, 査読有, Vol. 57, 2011, 613-619

[学会発表] (計 2 1 件)

- ① Senosy, W., Osawa, T., Nanae, T., Uchiza, M., Izaïke, Y. Calving season influences on energy metabolites trait, body condition scoring and ovarian resumption in high producing dairy cows. The 15th annual European Society for Domestic Animal Reproduction Conference, 2011. 9. 15-17, Antalya (Turkey)
- ② Osawa, T., Neves, R. C., LeBlanc, S. J. Inflammation and infection of the

reproductive tract in dairy cows, Joint Annual Meeting between the American Dairy Science Association and the American Society of Animal Science, 2011. 7. 10-14, New Orleans (USA)

- ③ Osawa T., Yoshimoto, M., Kon, N., Hirata, T-I., Izaike, Y., Endometrial cytology and vaginal discharge score profiles during PRID-based synchronization program in suckled Japanese black cows, 26th World Buiatrics Congress, 2010. 11. 14-18, Santiago (Chile)

〔図書〕（計3件）

- ① 居在家義昭、大澤健司、他、文永堂出版、獣医繁殖学 第4版、2011、568
② 石井一功、磯日出夫、大澤健司、他、文永堂出版、牛の繁殖管理における超音波画像診断、2010、134
③ 泉 賢一、板橋久雄、上田宏一郎、遠藤洋、扇 勉、大坂郁夫、大澤健司、他、チクサン出版社、子牛の科学、2009、290

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：吐出装置

発明者：片野圭二，田村孝，大澤健司，小田島尚行，首藤文榮

権利者：岩手大学

種類：特許

番号：特開 2010-279497

出願年月日：2010年12月

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 健司 (OSAWA TAKESHI)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：90302059

(2) 研究分担者

平田 統一 (HIRATA TOH-ICHI)

岩手大学・農学部・助教

研究者番号：20241490