乳牛の周産期疾病リスクおよび繁殖性の評価に関する研究

２０２１年１月

石川　翔

乳牛の周産期疾病リスクおよび繁殖性の評価に関する研究

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

先端農業技術科学専攻

博士（農学）学位論文

石川　翔

略語一覧

負のエネルギーバランス（negative energy balance; NEB）

ボディコンディションスコア（body condition score; BCS）

混合飼料（total mixed rations; TMR）

乾物摂取量（dry matter intake; DMI）

乾物（dry matter; DM）

可消化養分総量（total digestible nutriens; TDN）

粗蛋白質（crude protein; CP）

中性デタージェント繊維（neutral detergent fiber; NDF）

グルコース（glucose; Glu）

総蛋白（total protein; TP）

アルブミン（albumin; Alb）

血中尿素窒素（blood urea nitrogen; BUN）

リン脂質（phospholipids; PL）

総コレステロール（total cholesterol; T-Cho）

カルシウム（calcium; Ca）

無機リン（inorganic phosphorus; IP）

遊離脂肪酸（non-esterified fatty acid; NEFA）

3-ヒドロキシ酪酸（3-hydroxybutyric acid; 3-HB）

中性脂肪（triglyceride; TG）

総ビリルビン（total bilirubin; T-Bil）

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（aspartate aminotransferase; AST）

アラニンアミノトランスフェラーゼ（alanine aminotransferase; ALT）

インスリン様成長因子 I (Insulin-like growth factor I; IGF-I)

アンモニア態窒素（ammonia nitrogen; NH3-N）

揮発性脂肪酸（volatile fatty acid; VFA）

エンドトキシン（リポ多糖）（lipopolysaccharide; LPS）

脂肪補正乳量（fat corrected milk; FCM）

無脂固形分（solid non fat; SNF）

乳中尿素窒素（milk urea nitrogen; MUN）

目　次

第1章　緒論　1

第2章　クラスター解析を用いた周産期乳牛の疾病リスク評価

2.1　緒言　6

2.2　材料と方法　8

2.3　結果　11

2.4　考察　14

2.5　図表　18

第3章　判別分析を活用した脂肪肝診断およびリスク評価

3.1　緒言　29

3.2　材料と方法　31

3.3　結果　36

3.4　考察　40

3.5　図表　45

第4章　周産期乳牛における繁殖性評価指標の検討

4.1　緒言　62

4.2　材料と方法　63

4.3　結果　67

4.4　考察　70

4.5　図表　73

第5章　総括　86

引用文献　93

謝辞　109

第 1 章　緒論

ホルスタイン種乳牛は近年、遺伝的改良により泌乳能力が大幅に向上し、国内のホルスタイン種雌牛の 305 日乳量検定成績は平成元年（1989 年）の 7,705kg から、平成 30 年（2018 年）には 9,711kg と飛躍的な向上を遂げている（一般社団法人家畜改良事業団. 1990 & 2019）。一方で、乳生産に要するエネルギーの増加に栄養摂取がおいつかず、分娩後の NEB の期間と程度は増大している（Macmillan *et al.* 1996）。NEB の程度は周産期疾病の発生率と密接に関わっており、扇ら（2001）は 217 牛群での調査において、高泌乳牛群ほど第四胃変位やケトーシスといった周産期関連疾病の発生が多かったことを報告している。NEB に陥った牛では、脂肪組織から NEFA を放出し、肝臓に動員する（Bell. 1979）。動員された NEFA はエネルギー源として利用されるが、処理能力を上回る大量の NEFA が動員されると、NEFA は脂肪に蓄積し脂肪肝となる（及川. 2015）。また、肝臓において糖質が枯渇している状態では、NEFA から生成されたアセチル CoA がクエン酸回路に参入できず、代替エネルギーとして大量のケトン体が生成され、ケトーシスを引き起こす（及川. 2015）。多くの場合、脂肪肝はケトーシスに先行することが知られており（Oikawa *et al*. 1997; Shaw. 1956）、両者の関連は深い。また、分娩後 7 日目と 35 日目の肝細胞中の脂質量が多い牛は、分娩日の血中イオン化カルシウム濃度が低い事が報告されている（Chamberlin *et al*. 2013）。他にも、脂肪肝と第四胃変位との関連（Taguchi *et al.* 1992）、低カルシウム血症とケトーシス（Martinez *et al*. 2012; Ribeiro *et al*. 2013）、胎盤停滞（Curtis *et al*. 1983）および第四胃変位（Massey. 1993）との関連、第四胃変位とケトーシス（McArt *et al*. 2012A）との関連が報告されるなど周産疾病は相互に影響をおよぼしている。

潜在性ケトーシスや第四胃変位に罹患した牛における乳量の低下が報告されるなど、周産期疾病の発生はその後の生産性を低下させる（McArt *et al*. 2012A; Detilleux *et al*. 1997; Ospina *et al*. 2010）。また、McArt ら（2012B）は、潜在性ケトーシス牛は正常牛よりも分娩後 30 日以内に淘汰されるリスクが 3 倍高くなることを報告しており、周産

期疾病は淘汰や死亡にもつながる。牛群検定の除籍理由において、乳器障害を除く疾病とへい死を合わせた割合が、平成元年に比べて平成 30 年には約 20%増加しており、周産期疾病の増加の影響が伺える（一般社団法人家畜改良事業団. 1990 & 2019）。

加えて、遺伝改良による泌乳能力の向上は、乳牛の繁殖性にも影響をもたらしている。周産期の栄養状態は卵巣機能の回復（Beam & Butler. 1999; Lucy. 2001）や子宮修復（Wathes *et al.* 2009）などと関連していることから、分娩後の NEB の増大は繁殖成績を大きく悪化させている。また、周産期疾病と繁殖成績との関連性も示されている。具体的には、脂肪肝牛では初回発情日数、初回授精日数および受胎までに要する日数が延長し、受胎率の低下が見られる（Bobe *et al.* 2007）。また、胎盤停滞牛や潜在性ケトーシス牛（Ron *et al.* 1984; Walsh *et al.* 2007）、分娩後に潜在性低カルシウム血症を示した牛における受胎率や妊娠率の低下が報告されている（Caixeta *et al.* 2017; Martinez *et al.* 2012）。

国内における分娩後の平均初回授精日数は、平成元年の 87 日から平成 30 年は 93 日にまで遅延している。空胎日数は同期間で 125 日から 161 日と大幅に延長しており、それに伴い分娩間隔も 405 日から 433 日に広がっている。空胎日数延長の大きな要因として受胎率の低下があげられ、一般社団法人家畜改良事業団のホームページによると、初回人工授精受胎率は平成元年の 62.4%から平成 29 年には 41.6%まで低下している。繁殖成績の悪化による空胎日数の延長は分娩後 115 日目以降、1 日当たり 1,200 円の損失をもたらすと試算されている（福島ら. 2018）。加えて、分娩後長期にわたり受胎しない牛は、乳量の低下により繁殖計画から除外され廃用となる。乳牛の個体乳量は産次を重ねる毎に増加し（Kume *et al.* 2003）、5 産でピークを迎えるとされており（柏村ら. 2006）、搾乳牛の供用年数と平均産次を延長させることは収益の向上につながる。しかし、牛群検定農家における平成 30 年の検定牛の平均産次は 2.6 産と低く（一般社団法人家畜改良事業団. 2019）、周産期疾病や繁殖障害による分娩

間隔の延長や廃用牛増加の影響が考えられる。平均産次の低下は、得られる産子数の減少につながり、後継牛の確保を困難にする。平成 30 年の牛群検定牛における自家生産牛の比率は 84.0%となっており、搾乳牛の 15%以上を外部からの導入により確保している（一般社団法人家畜改良事業団. 2019）。しかし、初妊牛価格は酪農情勢により大きく変動し、近年の初妊牛価格の高騰は導入牛の割合が高い農場の経営を圧迫している。

以上のように、NEB を起因とする周産期疾病の発生や繁殖成績の低下は農場の収支を悪化させ、酪農経営に大きな影響を与えている。このことから、周産期の栄養管理に着目し、NEB を軽減するための研究が広く行われている。特に乾乳期の栄養管理について、分娩前の 4 週間に高エネルギー飼料を給与することで、分娩後の DMI が向上することが報告されている（Rabelo *et al.* 2003; McNamara *et al.* 2003）。一方、乾乳前期においては、給与飼料の栄養水準を要求量の 80%に抑えることで、分娩後の DMI が向上するという報告もある（Dann *et al.* 2006）。1 戸あたりの飼養頭数が増加し管理の集約化が進んでいることから、多くの経営体では、個々の牛毎に栄養要求量を把握することは難しく、これらの知見を元にした牛群単位での栄養・飼養管理が行われている。そのような中でも、牛群内で特に周産期疾病のリスクが高い牛の予測ができれば、それらの牛に対して重点的な予防措置を行うことで、疾病発生のリスクをさらに低減できると考えられる。過去にも周産期疾病の発生リスクに関連する指標を分析した研究はなされている（Cameron *et al.* 1998; Chapinal *et al.* 2011; Martinez *et al.* 2012）が、これらの知見は、第四胃変位や子宮内膜炎など、個別の疾病毎に単一の血液指標を用いてリスク評価を行っている。しかし、個々の疾病毎にリスクを確認して対応することは現実的ではない。周産期疾病は互いに関連し合っていることから、周産期疾病の総合的なリスクを評価できる指標があれば、飼養管理に有効に活用が可能だと考えられる。

また、疾病発生牛に対しては疾病の種類を的確に診断し、最適な対処を行う事が重

要となる。潜在性低カルシウム血症（Kamgarpour *et al.* 1999; Reinhardt *et al.* 2011; Martinez *et al.* 2012）や潜在性ケトーシス（Geishauser *et al*. 1997; LeBlanc *et al*. 2005）など、ある程度統一された診断基準をもつ疾病がある一方で、脂肪肝の確定診断は肝生検のみによる（Bobe *et al.* 2004）ことから、飼養現場での日常的な実施は困難である。Haudum ら（2011）は超音波画像よる脂肪肝診断を試みているが、軽度の脂肪肝では精度が低かったとしている。扇ら（1991）はケトン体濃度と肝臓への脂肪沈着の程度との相関を報告しているが、脂肪肝診断の精度については言及していない。脂肪肝は他の周産期疾病とも関わりが深いことから（Katoh. 2002）、分娩後早期に肝生検に準じた精度で脂肪肝の間接診断ができれば、早期の治療により、重症化や他の周産期疾病の続発を未然に防ぐことが可能だと考えられる。

繁殖管理においても、分娩後早期に個々の牛の受胎性の評価が可能になれば、個体毎に繁殖管理の戦略を立て、受胎性が低いと評価された牛に対してはその改善に向けたアプローチを行うことで、農場全体の繁殖成績の向上に結びつく可能性がある。江口ら（2005）は、初回授精遅延牛において分娩後の NEFA の増加と Ca の低値を、空胎日数延長牛においては分娩前の Glu の低下、分娩後の NEFA の増加および T-Cho の低下を認め、周産期の栄養状態と繁殖成績との関連を示している。また、Patton ら（2007）は、初回授精時の BCS が 2.25 以下の牛では 3.25 以上の牛に比べて受胎率が低くなることを、Butler ら（1996）は人工授精当日の BUN および MUN の濃度が 19 mg/dL を上回る牛では妊娠の割合が低いことを報告している。しかし、これらの報告は、各種指標の成績が異なる牛群間の繁殖性の違いを評価するにとどまり、これらの指標を用いた受胎性の予測は行っていない。

人医学の分野では、食道癌の診断や気管支喘息の亜型の分類に多変量を用いたクラスター解析を用いた事例が報告されている（Li *et al*. 2015; Youroukova *et al*. 2017）。また、廣田（1999）は、人において、多くの疾病の診断に判別分析が利用され、優れた診断精度をあげている事を報告している。このことから、ホルスタイン種における周産期

疾病の総合的なリスク評価を行うにあたっても、それぞれの疾病の発生に影響を与える多くの要因同士の関係性を考慮した、多変量解析の手法が有効であると考えられる。また、脂肪肝の診断や繁殖性の予測についても、多変量解析の手法を用いることで、高い精度での評価ができる可能性がある。

以上のことから本論文では、第 2 章においては、特定の疾病を対象とせずに、周産期疾病全般の総合的なリスクを評価する手法として、血液生化学値を用いたクラスター解析および判別分析による疾病リスクの分類を試みた。第 3 章では判別分析を用いて、脂肪肝の分娩後早期における診断と分娩前における発生予測を試みた。脂肪肝診断においては、血液成分値だけでなく、乳中脂肪酸組成を含む泌乳成績を判別式の変数に用いた際の精度についても検証を行った。第 4 章では、同様に判別分析を用いて、初回授精における受胎性の予測を分娩後早期の血液成分値により試みた。また、各章に共通して、血液性状だけでなく、ルーメン液性状や泌乳成績についても調査を実施し、疾病の発生や繁殖性に影響をおよぼす要因を総合的に分析した。

第 2 章　クラスター解析を用いた周産期乳牛の疾病リスク評価

2.1　緒言

周産期疾病は生乳生産と繁殖成績を低下させることから（Venjakob *et al*. 2018; Deluyker *et al*. 1991）、経済的な損失は非常に大きい（Gohary *et al*. 2016）。加えて、周産期疾病は治療に要するコストや労力の増大にも直結する。よって、酪農経営における周産期疾病の低減は非常に重要であり、予防や予知技術による貢献度は計り知れない。その発生を最小限に抑えることが重要である。このことから、周産期疾病の予防および予測技術は、酪農産業にとって大きな価値がある。周産期疾病の予防技術については、過去にも幾つか報告されている（Moore *et al*. 2000; McArt *et al*. 2012B）が、個体毎に疾病の発生リスクを評価する事が出来れば、リスクの高い牛に対してより綿密な管理が可能となり、疾病の低減につながると考えられる。リスク評価の一つとして BCS（Ferguson *et al*. 1994）の測定があげられ、分娩前の過肥は分娩後の NEB を悪化させる事が示されている（Allbrahim *et al*. 2010）。また、血液生化学値と周産期疾病の発生リスクとの関連性についても多く報告されている（Cameron *et al*. 1998; Chapinal *et al*. 2011; Martinez *et al*. 2012）が、これらの知見は NEFA や Ca などの単一の血液成分指標を用いて、第 4 胃変位や子宮内膜炎などの特定の周産期疾病の発生リスクを評価している。しかし、周産期疾病の発症には様々な要因が影響し、それぞれの疾病が互いに関連性を持つことが報告されている（Katoh. 2002）。そのため、複数の血液成分を総合的に解析することで、周産期疾病の発症リスクを網羅的に評価できると考えられる。

本研究では、周産期における疾病リスク評価の新たなアプローチとして、分娩後早期の乳牛に対して複数の血液成分値に基づくクラスター解析を実施し、本解析が周産期疾病の総合的なリスクの判定に利用出来るかどうかを検討した。クラスター解析は、個々の牛の状態が大きく異なる分娩後 1 週目において、代謝プロファイルテストで一般的に利用されている（Payne *et al*. 1970）、13 の血液成分値を用いて実施した。クラスタ

ー解析の結果をもとに牛を 2 つのグループに分類し、2 グループの血液成分値、ルーメン液性状および泌乳成績を比較した。次に、クラスター解析の結果を用いて、より少ない検査項目で疾病リスクを評価するのに適した判別式を同定した。さらに、分娩前の血液パラメータを判別式に適用し、分娩前の時点における分娩後の疾病リスク評価の可能性を検討した。

2.2　材料と方法

全ての動物実験は兵庫県立農林水産技術総合センター動物実験指針に基づいて実施した。

1.　供試牛

兵庫県立農林水産技術総合センター淡路農業技術センターで飼養するホルスタイン種初妊牛 6 頭と経産牛 14 頭（うち初産 9 頭、2 産 2 頭、3 産以上 3 頭）を供試し、分娩予定の 3 週前から分娩後 12 週までを試験期間とした。供試牛の概要を表 2.1 に記す。これらの分娩後産次は 2.3 ± 1.4 産（範囲：1～6 産）で、経産牛の乾乳日数は 75.7 ± 52.6 日（範囲：31～224 日）、分娩後 12 週目の平均乳量は 34.7 ± 5.9kg/日（範囲：25.2～42.6kg）であった。

2.　飼養管理

供試牛は、快適性を考慮したタイストール牛舎で飼養し、分娩予定日1週間前から分娩までは単房にて飼養した。飼料は、日本飼養標準（農業・食品産業技術総合研究機構. 2007）に基づいて必要なエネルギー量を満たすように設計し、個別に給与した。分娩前は分離給与とし、分娩後は分離給与から徐々に TMR に切り替え、8 日目からは TMR のみを給与した。分娩前と分娩後 8 日目までは制限給餌とし、分娩後 9 日目以降は TMR を飽食させた。分娩予定日 4 週前から分娩までの飼料構成と養分含量を表 2.2 に、分娩後の TMR の飼料構成と養分含量を表 2.3 に示した。給餌は 8:30 と 15:30 の 1 日 2 回行い、水は自由摂取とした。搾乳は、8:00 と 16:30 の 1 日 2 回実施した。

3.　血液の採取および処理

血液サンプルは、分娩の 3、2 および 1 週前、分娩後 1、3、5、8 および 12 週後の

朝の飼料給与から4時間後にヘパリンナトリウム加真空採血管を用いて頸静脈より採血した。採取後、サンプルは直ちに遠心（1,660×g 、10分、4℃）して血漿を分離し、Glu含量は乾式血液自動分析装置（DRI-CHEM3030、富士フイルム株式会社、東京、日本）を用いて遠心分離直後に測定した。残りの血漿は、他の項目の分析まで-30℃で保存した。血漿中のAST、ALT、 NEFA、PL、T-Cho、T-BIL、尿酸（UA）、Ca、IP、3-HB、TGおよびBUN濃度については、自動分析装置（7060、株式会社日立ハイテク、東京、日本）を用いて測定した。IGF-I濃度は、ELISA法（IGF-I Human ELISA Kit Quantikine、R&D Systems, Inc、ミネソタ、アメリカ）で測定した。

4. ルーメン液の採取および処理

ルーメン液サンプルは採血と同時に食道チューブ（ルミナー胃汁採取器、富士平工業株式会社、東京、日本）を用いて経口採取後、直ちに 2 重にしたガーゼを用いてろ過し、NH3-N 濃度の測定用に-30℃で凍結保存した。また、VFA 量測定のためにろ過液 5ml を 1.0ml の 24％メタリン酸含有 3 規定硫酸と混和後 18 時間室温で静置した後、遠心分離（1,660×g 、30 分、4℃）によって得られた上清を-30℃で凍結保存した。NH3-N 濃度は自動窒素分析装置（Kjeltec Auto 1035、Tecator、スウェーデン）を用いて水蒸気蒸留法にて測定した。総VFA量およびVFA組成割合（酢酸、プロピオン酸、酪酸およびその他 VFA）はガスクロマトグラフ（GC-2014、㈱島津製作所、京都、日本）を用いて測定した。

5. 日乳量および乳成分の測定

乳量は乳量計 （F series、TRU-Test Group、オークランド、 ニュージーランド）を用いて毎日測定し、血液採材日を含む過去7日間の平均乳量を算出した。乳汁サンプルは採血日の朝晩の搾乳時にミルクメーターから採取した。乳脂率、乳蛋白質率、SNF率、乳糖率、MUNおよび体細胞数リニアスコアは赤外分光法 （Combi-Foss

FC、Foss、デンマーク）を用いて得られた成分値を用いて、採材日の朝晩の乳量をもとにした加重平均により算出した。

6.　統計解析

すべての分析は JMP13.0 ソフトウェア（SAS Institute Inc., Cary, NC, USA）を用いて行った。供試牛は、分娩 1 週後の血液生化学値（AST, ALT, NEFA, PL, T-Cho, T-BIL, UA, Ca, IP, 3-HB, TG, Glu, BUN）をもとに、Ward 法を用いたクラスター分析により 2 グループ（A グループ、B グループ）に分類した。次に、産次とグループを主試験区、週次を副試験区とした分割区法によって試験期間中の血液生化学性状、ルーメン液性状、泌乳成績について統計処理を行った。グループ間に有差異（$p<0.05$）または差の傾向（$p<0.10$）が認められた項目およびグループと週次に有意な交互作用が認められた項目については、週次ごとの分析値の違いを対比により確認し、各グループの特性について検討した。

次に、クラスター解析においてクラスターによって説明される割合が高い変数を用いて、クラスター解析と同様のグループ分けとなるような判別式を作成した。また、得られた判別式を用いて、分娩前の全ての週次の測定値について判別分析を実施した。

2.3 結果

クラスター解析により得られた樹形図を図 2.1 に示す。変動がクラスターによって説明される割合（R^2）の高い変数は、PL（0.66）、Ca（0.65）、T-Cho（0.52）および IP（0.49）であった。クラスター解析の結果をもとに、供試牛を A グループ（経産牛 9 頭、初産牛 4 頭）と B グループ（経産牛 5 頭、初産牛 2 頭）の 2 グループに分類し、両グループの比較を行った。

1. 血液生化学値

両グループの血液生化学値の測定結果を表 2.4 に示す。AST、NEFA、PL、T-BIL、Ca、IP および 3-HB 濃度についてグループ間に有意な差が、T-Cho 濃度については差の傾向（$p<0.10$）が認められた。また、Glu、AST、NEFA、TG、T-BIL、Ca、IP および 3-HB 濃度に、グループと週次の有意な交互作用が認められた。これらの項目について、測定値の経時的変化を図 2.2 に示す。B グループでは、分娩前 3 週において、A グループに比べて Glu および TG の濃度が高かった（$p<0.05$）。また B グループでは、分娩後 1 週目において NEFA、3-HB、AST および T-BIL の濃度が A グループに比べて有意に高値を示し、AST 濃度は分娩後 3 週においても B グループが高かった（$p<0.05$）。一方、A グループでは、分娩後 3 および 5 週の T-Cho 濃度、分娩後 1、3 および 5 週の Glu 濃度、分娩後すべての週次における PL 濃度が B グループに比べて有意に高値を示した。また Ca 濃度は分娩後 8 週を除いた全ての週次で A グループが B グループを上回り（$p<0.05$）、IP 濃度は分娩前 2 週と分娩後 1 週に A グループが有意に高値を示した。

2. ルーメン液性状

両グループのルーメン液性状を表 2.5 に示す。NH3-N 濃度にはグループと週次の交互作用が認められた（$p<0.05$）。総 VFA 量は B グループが有意に低い値となった。

酢酸、プロピオン酸、酪酸の組成割合は両群間に差は認められなかった。ルーメン液性状の経時的変化を図 2.3 に示す。NH3-N 濃度は、分娩後 1 週において B グループが高い値を示した（$p<0.05$）。総 VFA 量は分娩後 1 週および 3 週において A グループが有意に高い値を示した。

3. 泌乳成績

両グループの泌乳成績を表 2.6 に示す。平均乳量はグループ間に有意差は認められなかった。SNF と乳蛋白質率はともに B グループが有意に低い値となり、乳糖率は B グループが低い傾向であった（$p<0.10$）。また、乳脂率ではグループと週次の間に交互作用の傾向（$p<0.10$）が認められた。泌乳成績の経時的変化を図 2.4 に示す。SNF 率は測定を実施した全ての週次で、A グループの値が有意に高くなった。乳蛋白質率は分娩後 8 週を除く全ての週次で A グループが高い値であった（$p<0.05$）。乳糖率および乳脂率には、両グループ間に有意差は認められなかった。

4. 判別分析

分娩後 1 週目における、IP、PL、Ca または IP、Ca、T-Cho の値を説明変数に用いた判別式により、クラスター解析と一致した群分けが可能であった。得られた 2 つの判別式を以下に示す。

説明変数: IP, Ca, and PL;

$z = IP*0.6750 + Ca*1.089 + PL*0.04237 - 17.55$

（$z > 0$ グループ A、 $z < 0$ グループ B）

説明変数: IP, Ca, and T-Cho;

$z = IP*0.7505 + Ca*1.363 + T\text{-}Cho*0.04078 - 19.48$

（z > 0 グループ A, z < 0 グループ B）

これら 2 つの判別式を用いて、供試牛の分娩前の血液サンプルについて判別分析を行ったところ、クラスター解析と異なる群分けとなる誤判別率は、前者が 22.0%（A グループ 18.8%、B グループ 27.8%）、後者が 16.0%（A グループ 6.3%、B グループ 33.3%）であった（表 2.7）。

2.4 考察

統計解析においては産次を主試験区として分析したが、産次の違いが解析結果に及ぼす影響は小さかったことから、結果の検討にあたっては産次をブロックとして扱った。両グループの NEFA および 3-HB 濃度を比較したところ、両項目とも分娩後 1 週目において B グループが有意に高値となった。血中 NEFA 濃度は 0.4mEq/L 以上で高度の体脂肪動員と関連があるとされている（Oetzel. 2004）。また、正常牛と潜在性ケトーシス牛を区別する 3-HB 濃度のカットポイントは、1200-1400μmol/L である（Geishauser *et al*. 1997; LeBlanc *et al*. 2005）。本試験では、A グループにおいても分娩後 1 週における NEFA 濃度は 0.49mEq/L と体脂肪動員が疑われるレベルであったが、B グループの NEFA 濃度は 0.87mEq/L であり、体脂肪動員の判定閾値を大きく上回った。分娩後1週における 3-HB 濃度は A グループで 632μmol/L であり、分娩前からの上昇はわずかであった。一方、B グループでは 2,114μmol/L と潜在性ケトーシスの判定基準値を大きく上回った。これらのことから、両グループともに NEB に起因する体脂肪動員が引き起こされていたと考えられるが、B グループの牛は A グループに比べてその程度が大きく、肝臓の処理能力を超える過剰な体脂肪が動員されたことでケトン体が多量に生成されたものと考えられる。また、B グループでは A グループに比べて分娩後 1 および 3 週の AST の濃度が有意に高く、分娩前から分娩後 1 週にかけて大きく増加した。AST は肝臓への脂肪浸潤により増加することから（Bobe *et al*. 2004）、B グループでの AST の高値は高度の体脂肪動員に起因するものと考えられる。同様に分娩後 1 週の T-BIL 濃度も B グループが A グループよりも有意に高い値を示しており、脂肪浸潤による肝障害を反映したものと考えられる（Kalaitzakis *et al*. 2007）。

本試験の供試牛では、分娩後の起立不能など低 Ca 血症の臨床症状を示す牛はいなかった。健常牛の血中 Ca 濃度は 8.8～10.4 mg/dL （Cozzi *et al*. 2011）と報告されている。A グループの牛は試験期間を通して Ca 濃度に大きな変動はなく、正常値の範囲で推移した。一方、B グループの Ca 濃度は分娩前から正常値の下限付近を推移し、

分娩後1週目には 8.4mg/dL と正常値を下回り、潜在性低カルシウム血症の診断カットポイントとされる 8.0-8.59mg/dL 付近の値を示した（Kamgarpour *et al*. 1999; Reinhardt *et al*. 2011; Martinez *et al*. 2012）。乳牛の血中 Ca 濃度は分娩後約 12-24 時間後に最低値に達するとされており（Goff. 2008）、Caixeta ら（2015）も、分娩後 1 日目に最低値となり、その後回復すると報告している。そのため、B グループの牛では、分娩直後において、より重度の潜在性低カルシウム血症を呈していた可能性が考えられる。本報告では飼料摂取量の測定を実施していないが、潜在性低カルシウム血症を示す牛では、消化管における筋収縮が減退するため乾物摂取量が低下するとされている（Goff. 2008）。このことから、B グループでは分娩直後からの潜在性低カルシウム血症に起因する乾物摂取量の低下により、A グループよりも重度の NEB に陥っていた可能性が考えられる。B グループにおいて分娩後の T-Cho、PL および Glu 濃度、ルーメン液中の総 VFA 量、乳中 SNF および乳蛋白質率が A グループを常に下回って推移したことも、乾物摂取量の低下によるエネルギー不足を反映したものと考えられる。

上記のように、B グループでは、泌乳初期において潜在性ケトーシスと潜在性低カルシウム血症の傾向が同時に認められた。潜在性ケトーシス（Dohoo & Martin. 1984; Andersson. 1988）や潜在性低カルシウム血症（Kamgarpour *et al*. 1999; Reinhardt. 2011; Neves *et al*. 2017）は、はっきりとした臨床症状がないにもかかわらず、生産性に悪影響を及ぼすことが報告されている。さらに両疾病は、子宮炎や第四胃変位などの他の周産期疾病に対して共通するリスク要因となる（Duffield *et al*. 2009; Chapinal *et al*. 2011; Martinez *et al*. 2012）。両疾病の関連性はこれまでにも報告されているが（Martinez *et al*. 2012; Ribeiro *et al*. 2013）、本試験のように両者を組み合わせて複合的なリスク評価を行った報告は見当たらない。人医学の分野では、疾患の分類や診断にクラスター解析を用いた研究が報告されている（Li *et al*. 2015; Youroukova *et al*. 2017）。畜産の分野においては、牛群内の遺伝子型の分類（Fraga *et al*. 2016）や豚の精子の運動性の分類（Ibănescu *et al*. 2018）にクラスター解析を用いた研究が報告され

ている。しかし、家畜の疾病の診断やリスク評価にクラスター解析を用いた報告は見当たらない。本研究により、特定の基準値を用いることなく乳牛の分娩後の周産期疾病リスクを総合的に評価する新たな手法として、分娩後早期の血液成分を用いたクラスター解析が利用できる可能性が示された。

本試験では、3 つの説明変数（IP、Ca、PL または IP、Ca、T-Cho）のみを用いた判別式によりクラスター解析と同様のグループ分けが可能であった。これらの判別関数には、カルシウム代謝（Ca および IP）と飼料摂取量（T-Cho、PL および IP）に関連する指標の両方が含まれており（Payne *et al*. 1970; Payne & Payne. 1987; Reist *et al*. 2002）、このことは、周産期疾病の総合的なリスクを、少数の血液成分のみによって評価できる可能性を示している。さらに、作成した 2 つの判別式を分娩前の血液生化学値に適用したところ、分娩後 1 週目におけるクラスター解析によるグループ分けに対して、16-22%の誤判別率が得られた。Neves ら（2017）は、分娩 1 週前に Ca 濃度が 9.6mg/dL 以下の経産牛は 9.6mg/dL を超える牛に対して、分娩後に潜在性低カルシウム血症と診断されるリスクが 1.4 倍に増加すると報告している。本試験でも両グループの分娩前 Ca 濃度に有意差が認められたが、分娩後に Ca 濃度の低下が認められなかった A グループにおいても、分娩前 2 週および 1 週の Ca 濃度は 9.6mg/dL を下回った。また Akamatsu ら（2007）は、分娩後にケトーシスに罹患した牛では分娩 2 週前の T-Cho 濃度が健康牛に比べて低い（74 vs 94 mg/dL）ことを報告しているが、本試験においては両グループの分娩前 T-Cho 濃度に有意な差は認められず、いずれも Akamatsu ら（2007）の報告における健康牛に近い数値であった。さらに、判別式の変数として選択された PL は、分娩前においては両群間に有意差は認められなかった。同様に、IP は分娩 2 週前においてはグループ A が有意に高値であったものの、分娩 1 週前および 3 週前においては両グループに差は認められなかった。このことから、本研究では、分娩前において、これらのうち単一の指標のみを用いて周産期疾病のリスクを評価することは困難であった。このことから、分娩前においても、カルシウム代謝に関連する指標（Ca、IP）と飼料摂取

量を反映する指標（T-Cho、PL）を組み合わせた判別式を用いることで、単一指標の基準値を用いた分類では正確な疾病リスク評価ができなかった牛についても、良好な精度で分娩後の周産期疾病リスクを総合的に評価できる可能性が示された。

2.5 図表

表2.1 供試牛の概要

	全頭平均 (n=20)	初妊牛 (n=6)	経産牛 (n=14)
分娩後産次	2.3 ± 1.4	1.0 ± 0.0	2.8 ± 1.3
乾乳日数 (日)			75.7 ± 52.6
分娩後12週目の平均乳量 (kg)	34.7 ± 5.9	28.6 ± 3.6	37.7 ± 3.6

(平均値 ± 標準偏差)

表2.2　分娩前の飼料構成と飼料成分

	初産牛		経産牛	
	分娩前4週～	分娩前2週～	分娩前4週～	分娩前2週～
給与量 (kg)				
クレイン乾草	4.0	3.0	5.0	3.0
オーツ乾草	3.0	3.0	4.0	4.0
ビートパルプ	3.0	3.0	3.0	3.0
乾乳期用配合飼料	3.0	4.0	3.0	4.0
飼料成分				
DM給与量 (kg/日)	11.5	11.4	13.2	12.3
DM割合 (%)	88.0	88.0	88.0	88.0
TDN(DM中%)	68.0	69.6	67.1	69.3
CP (DM中%)	12.1	13.1	11.6	12.5
NDF (DM中%)	47.7	43.7	49.7	44.7

表2.3 分娩後の飼料構成 (TMR)

構成飼料	(DM中%)
ソルガムサイレージ	13.7
クレイン乾草	5.3
スーダン乾草	6.5
アルファルファ乾草	12.8
ビートパルプ	10.2
トウモロコシ (圧片・粉砕混合)	26.7
圧片大麦	6.9
大豆粕	10.4
綿実	3.5
コーングルテンミール	0.4
加熱大豆	0.3
エネルギーサプリメント	1.8
ミネラル・ビタミンプレミックス[1)]	1.6
飼料成分	
DM割合 (%)	55.1
TDN (DM中%)	72.8
CP (DM中%)	15.4
NDF (DM中%)	34.3

1) 炭酸カルシウム : 第2リン酸カルシウム : 塩 : 重曹 : ビタミン剤
＝1:3:1:3:1 (原物混合比)

表2.4 血液生化学値

	群		産次		p値					
	グループA (n = 13)	グループB (n = 7)	初産牛 (n = 6)	経産牛 (n = 14)	群	産次	群*産次	週次	群*週次	産次*週次
Glu (mg/dL)	62.3 ± 1.0	59.4 ± 1.4	63.0 ± 1.5	58.7 ± 1.0	0.120	0.029	0.080	<.001	0.013	0.024
AST (IU/L)	68.8 ± 5.5	92.8 ± 7.7	78.9 ± 8.0	82.7 ± 5.2	0.023	0.696	0.897	<.001	<.001	0.491
ALT (IU/L)	21.3 ± 0.9	22.7 ± 1.2	23.2 ± 1.2	20.9 ± 0.8	0.354	0.135	0.343	<.001	0.104	0.191
NEFA (mEq/L)	0.20 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.020	0.624	0.154	<.001	0.001	0.610
PL (mg/dL)	182.8 ± 7.0	150.7 ± 9.7	164.2 ± 10.0	169.3 ± 6.5	0.016	0.679	0.063	<.001	0.175	<.001
T-Cho (mg/dL)	160.8 ± 6.1	141.6 ± 8.5	148.1 ± 8.8	154.2 ± 5.7	0.085	0.566	0.030	<.001	0.411	<.001
TG (mg/dL)	13.9 ± 0.5	13.9 ± 0.8	13.3 ± 0.8	14.5 ± 0.5	0.979	0.233	0.100	<.001	0.033	0.403
T-BIL (mg/dL)	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.048	0.779	0.453	<.001	<.001	0.895
UA (mg/dL)	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.1	0.498	0.106	0.798	0.005	0.869	0.269
Ca (mg/dL)	9.6 ± 0.1	8.9 ± 0.2	9.3 ± 0.2	9.2 ± 0.1	0.002	0.713	0.821	0.001	0.039	0.883
IP (mg/dL)	5.4 ± 0.1	4.8 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.1 ± 0.1	0.012	0.512	0.450	0.294	0.003	0.912
3-HB (μmol/L)	590.3 ± 50.1	827.4 ± 70.4	600.9 ± 72.3	816.8 ± 47.7	0.014	0.023	0.832	<.001	<.001	0.870
BUN (mg/dL)	10.4 ± 0.6	11.0 ± 0.9	9.8 ± 0.9	11.6 ± 0.6	0.610	0.120	0.592	<.001	0.938	0.066
IGF-1 (ng/mL)	43.2 ± 4.1	41.5 ± 5.8	44.6 ± 5.9	40.2 ± 4.0	0.814	0.546	0.901	<.001	0.626	0.636

(最小二乗平均 ± 標準誤差)

表2.5　ルーメン液性状

	群		産次		p値					
	グループA (n = 13)	グループB (n = 7)	初産牛 (n = 6)	経産牛 (n = 14)	群	産次	群*産次	週次	群*週次	産次*週次
NH3-N (mg/dL)	5.4 ± 0.5	6.3 ± 0.7	5.2 ± 0.8	6.5 ± 0.5	0.330	0.169	0.119	0.001	0.044	0.335
総VFA量 (mmol/L)	120.2 ± 2.8	98.5 ± 3.9	110.3 ± 4.0	108.3 ± 2.6	<.001	0.685	0.001	0.572	0.778	0.032
VFA組成割合 (%)										
酢酸	64.7 ± 0.4	65.6 ± 0.5	65.2 ± 0.5	65.1 ± 0.3	0.152	0.870	0.005	<.001	0.503	0.653
プロピオン酸	20.6 ± 0.5	20.7 ± 0.7	21.0 ± 0.7	20.3 ± 0.5	0.967	0.370	0.240	<.001	0.325	0.902
酪酸	11.8 ± 0.3	11.4 ± 0.5	11.5 ± 0.5	11.7 ± 0.3	0.438	0.732	0.267	<.001	0.702	0.038
その他のVFA	2.8 ± 0.1	2.4 ± 0.2	2.3 ± 0.2	2.9 ± 0.1	0.032	0.004	0.087	<.001	0.980	0.075
酢酸／プロピオン酸比	3.2 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.3 ± 0.1	0.610	0.381	0.075	<.001	0.162	0.963

(最小二乗平均 ± 標準誤差)

表2.6　泌乳成績

	群		産次		p値					
	グループA (n = 13)	グループB (n = 7)	初産牛 (n = 6)	経産牛 (n = 14)	群	産次	群*産次	週次	群*週次	産次*週次
平均乳量 (kg) [1)]	30.1 ± 0.7	31.1 ± 1.1	25.1 ± 1.1	36.1 ± 0.7	0.440	<.001	0.061	<.001	0.313	0.038
乳脂肪率 (%)	4.2 ± 0.1	4.1 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.2 ± 0.1	0.680	0.354	0.838	<.001	0.059	0.697
SNF率 (%)	8.8 ± 0.1	8.3 ± 0.1	8.6 ± 0.1	8.5 ± 0.1	0.001	0.612	0.519	<.001	0.213	0.367
乳蛋白質率 (%)	3.3 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.1 ± 0.1	3.1 ± 0.1	0.002	0.717	0.230	<.001	0.687	0.461
乳糖率 (%)	4.5 ± 0.0	4.4 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.4 ± 0.0	0.077	0.750	0.619	<.001	0.715	0.653
MUN (mg/dL)	10.6 ± 0.6	10.6 ± 0.9	9.7 ± 0.9	11.5 ± 0.6	0.940	0.136	0.779	<.001	0.619	0.610
体細胞数リニアスコア	2.9 ± 0.4	3.4 ± 0.5	3.9 ± 0.5	2.4 ± 0.4	0.485	0.033	0.688	0.015	0.635	0.031

(最小二乗平均 ± 標準誤差)

表 2.7　分娩前における判別式の誤判別率

判別式の変数	誤判別率[1)]		
	グループ A (n = 32)	グループ B (n = 18)	全体 (n = 50)
IP, Ca, PL	18.8%	27.8%	22.0%
IP, Ca, T-cho	6.3%	33.3%	16.0%

[1)] クラスター解析によるグループ分けに対する誤判別率

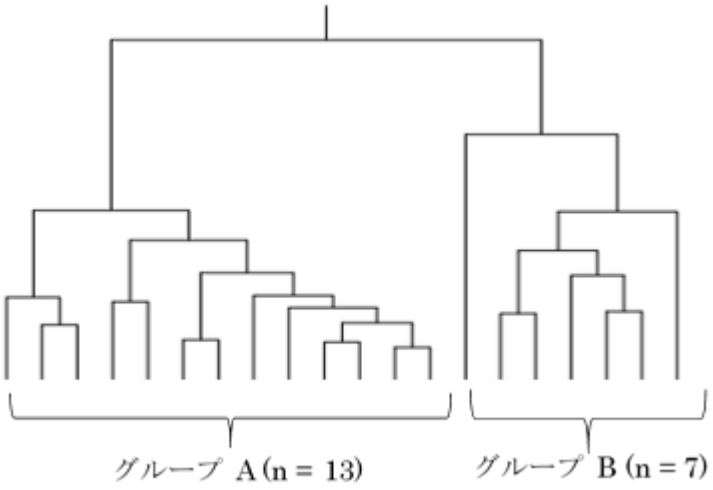


図 2.1　クラスター解析の樹形図

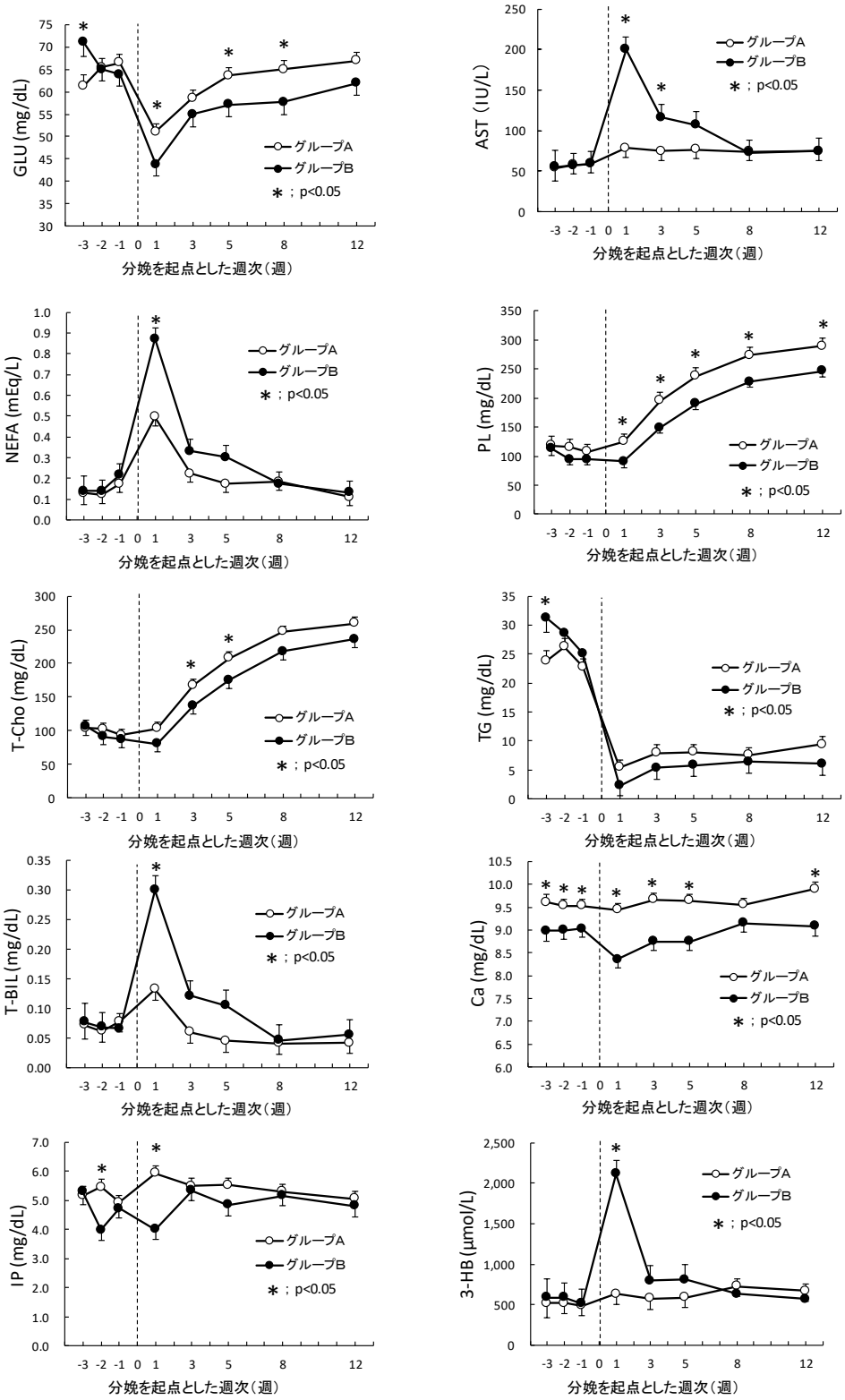


図 2.2 血液生化学値の経時的変化

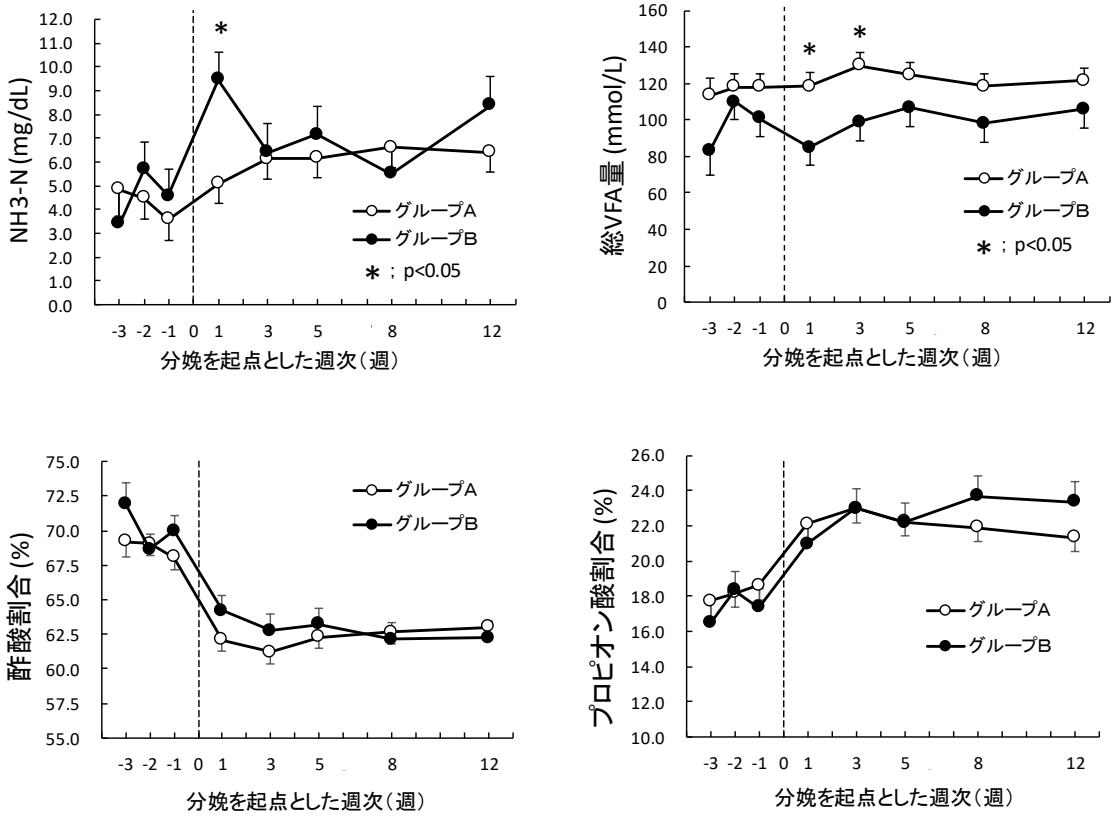


図 2.3 ルーメン液性状の経時的変化

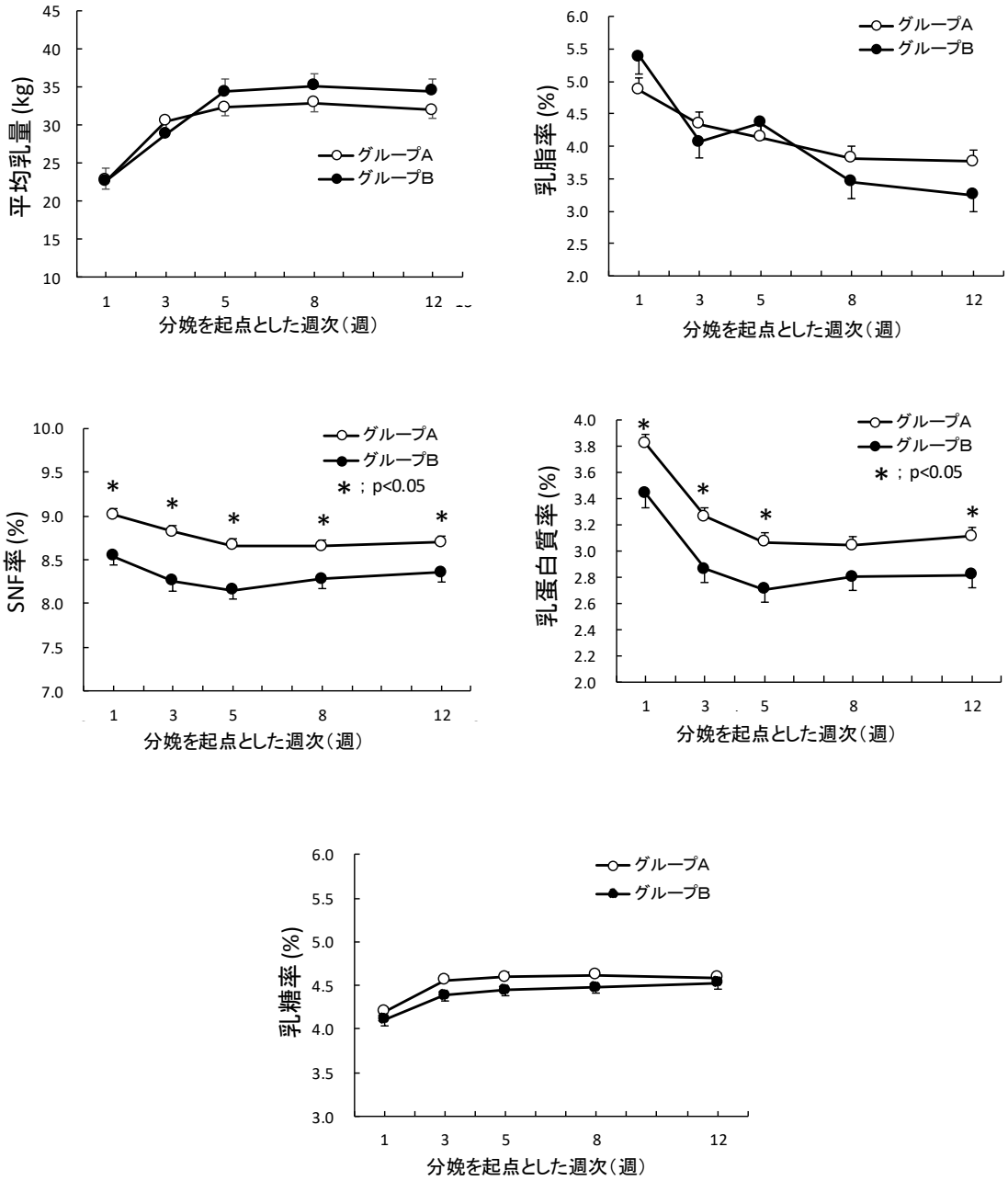


図 2.4　泌乳成績の経時的変化

第 3 章　判別分析を活用した脂肪肝診断およびリスク評価

3.1　緒言

第 2 章においては、ホルスタイン種乳牛の周産期疾病について、13 の血液成分値によるクラスター解析ならびにカルシム代謝と栄養代謝に関連する 3 つの血液指標（IP、Ca、PL または IP、Ca、T-Cho）を変数に用いた判別式により、総合的なリスク評価が可能であることを示した。総合的な疾病リスクを早期に判定することで、高リスク牛に対応した飼養管理への変更などにより、疾病発症牛の低減につながると考えられる。一方で、実際に周産期疾病を発症した牛に対しては、疾病の種類・原因や症状の程度を的確に診断し、その結果に基づき、最適な対処を行うことが求められる。周産期疾病は相互に関連性があることが報告されており、その一つである脂肪肝はケトーシスに先行して発生し（Brumby *et al*. 1975）、ほぼ全てのケトーシス牛において観察される（Oikawa *et al*. 1997; Shaw. 1956）。また、脂肪肝は、第四胃左方変位（Holtenius & Niskanen. 1985）、ダウナー症候群（Allen & Davies. 1981）、胎盤停滞（Morrow *et al*. 1979）など多くの周産期疾病との関連性が報告されている。さらに、脂肪肝牛ではコレステロール合成の低下に起因するプロジェステロン合成の低下（Watson & Williams. 1987）や負のエネルギーバランスに関連する IGF-Iの低下（Beam & Butler. 1999）などを原因として繁殖成績が低下することも報告されている。以上の事から、脂肪肝を早期に診断または予測し、適切な治療や予防処置を講ずる事が出来れば、関連する他の周産期疾病の発症リスクの低下や繁殖成績の向上にもつながり、農場の生産性向上に大きく寄与できると考えられる。

脂肪肝は、分娩前後の NEB を補うために、肝臓での処理能力を超えた体脂肪が動員されることで肝臓内に脂肪が蓄積する疾病であることから（Katoh. 2002）、確実な診断を行うためには、肝生検により肝組織への脂肪浸潤の程度を評価する事が必要である（Bobe *et al*. 2004）。しかし、酪農現場において肝生検を日常的に実施することは困難であることから、肝生検に準じた精度で脂肪肝を間接的に診断する手法の確立が求

められる。本研究では肝生検により脂肪肝と診断したホルスタイン種経産牛 13 頭と正常牛 24 頭について、飼養成績、血液成分および第一胃液性状などの栄養代謝指標を比較し、脂肪肝の発症に関連する因子を検討した。また、2 章で得られた変数に、脂肪肝の指標となる変数を新たに加えた判別式による、脂肪肝の間接診断精度および分娩前における脂肪肝予測の可能性についても検証した。加えて、分娩後の乳中脂肪酸組成を測定し、泌乳成績と乳中脂肪酸組成を活用した脂肪肝診断の可能性についても検証した。

3.2 材料と方法

全ての動物実験は兵庫県立農林水産技術総合センター動物実験指針に基づいて実施した。

1. 供試牛

兵庫県立農林水産技術総合センター淡路農業技術センターで飼養するホルスタイン種経産牛のうち、2014 年 8 月から 2016 年 8 月にかけて分娩した延べ 37 頭(うち、重複 8 頭)を供試し、分娩予定の 3 週前から分娩後 12 週までを試験期間とした。供試牛の概要を表 3.1 に示す。これらの産次は 2.8±0.9 産(範囲:2～5 産)で、乾乳日数は 93±49 日(範囲:37～234 日)、調査開始時の体重は 734±79kg(範囲:611～942kg)であり、分娩後 12 週目の平均乳量は 38.0±6.6kg/日(範囲:27.8～52.7kg/日)であった。

2. 飼養管理

供試牛は、快適性を考慮したタイストール牛舎で飼養し、分娩予定日1週間前から分娩までは単房にて飼養した。飼料は日本飼養標準(農業・食品産業技術総合研究機構. 2007)の要求量を満たすよう設計し、個体別に給与した。分娩予定日 4 週前から分娩までの飼料構成と養分含量を表 3.2 に、分娩後の TMR の飼料構成と養分含量を表 3.3 に示した。分娩前は分離給与とし、分娩後は分離給与から徐々に TMR に切り替え、8 日目からは TMR のみを給与した。分娩前と分娩後 8 日目までは制限給餌とし、分娩後 9 日目以降は自由摂取とし、残飼が出るように給与量を増やした。給餌は 8:30 と 15:30 から行い、水は自由摂取とした。搾乳は、8:00 と 16:30 の 1 日 2 回実施した。

3. 調査項目と方法

(1)採材・調査間隔と回数

分娩日の 3 週前から分娩後 12 週までの間に以下の調査を行った。肝生検は分娩後 2 週に実施した。飼料摂取量は調査期間中、乳量は分娩後毎日計量した。血液と第一胃液の採材は分娩予定日の 3,2 および 1 週前、分娩後 1,2,3,5,8 および 12 週に実施し、体重と BCS の計測はこれらの週次に加えて分娩日にも実施した。乳汁の採材は分娩後 1,2,3,5,8 および 12 週に実施した。

(2)脂肪肝診断

1)肝生検

肝生検は三浦ら(1987)の手法を参考に実施した。肝生検実施の様子を図 3.1 に示す。鎮静処置として 2%キシラジン(セラクタール、バイエル薬品株式会社、大阪)0.7ml を尾静脈から投与後、右側第 11,12 肋間で背線より 30～40cm 程度下部の部位を約 5cm 四方に剃毛し、消毒後、アルコール綿で清拭した。メスにて穿刺部を小さく切皮し、14G×150mm の自動生検針(エースカット、株式会社タスク、栃木)を切皮箇所から肝臓へ刺入して肝組織を採取した。採取した肝組織は直ちに20%中性緩衝ホルマリン液(マイルドホルム、和光純薬株式会社、大阪)に浸漬固定し、組織切片作成まで保存した。

2)肝組織の脂肪染色

ホルマリン固定した肝生検組織を 10%、20%および 30%サッカロース水溶液で段階的に脱水処理した後、ドライアイス・ヘキサンで凍結して-20℃、5μmの条件で薄切した。脂肪染色としてオイルレッド O 染色を実施し、画像診断に供した。

3)脂肪滴沈着スコアの評価と供試牛の区分

脂肪肝の進行に伴う肝組織の病理学的変化を考慮し(本好茂一. 1990)、組織内への脂肪滴沈着の程度を「スコア 0:脂肪滴の沈着を認めない」、「スコア 1:極少量の脂肪滴の沈着を認める」、「スコア 2:脂肪滴が中心静脈周囲に局在する」、「スコア 3:小さな脂肪滴をび漫性に認める」および「スコア 4:大きな脂肪滴をび漫性に認める」の 5 段階にスコア化した(図 3.2)。図 3.2 の判定基準に従って、獣医師 3 名で画像診断を行

い、3 名の脂肪滴沈着スコアの平均値が 2 より小さい個体 24 頭を正常群、2 以上の個体 13 頭を脂肪肝群とした。

(3)DMI、体重、BCS

毎日の飼料摂取量と飼料成分から、1 週間毎に DMI の平均値を算出した。体重は計量器(ツルーテスト、富士平工業株式会社、東京)により測定し BCS は Ferguson ら(1994)の方法に基づき評価した。

(4)血液の採取および処理

朝の飼料給与から 4 時間後に、ヘパリンナトリウム加真空採血管(テルモ株式会社、東京)を用いて頸静脈より採血した。採血後直ちに冷却遠心(1,660×g 、10 分、4℃)して血漿を分離し、乾式血液自動分析装置(DRI-CHEM3030、富士フイルムメディカル株式会社、東京)にて Glu、アルブミン(Alb)、BUN、T-Cho、Ca、IP、TG、T-BIL、AST および ALT を測定した。また、総蛋白濃度(TP)を屈折法にて測定した。血漿の一部は－30℃で凍結保存し、後日 NEFA、3-HB および PL を湿式自動分析装置(HITACHI-7060 型、株式会社日立製作所、東京)にて測定した。IGF-I は冷凍保存血漿を検体とし、ELISA キット(Human IGF-I Quantikine ELISA kit; R&D Systems, Minneapolis, USA)を用いて測定した。

(5)第一胃液性状

ルーメン液サンプルは採血時に食道チューブ(ルミナー胃汁採取器、富士平工業株式会社、東京)を用いて経口採取し、採取直後にガラス電極法(YUSB-02;山形東亜 DKK 株式会社、山形)により pH を測定後、2 重にしたガーゼを用いてろ過した。NH3-N 濃度、VFA 量およびその組成割合(酢酸、プロピオン酸、酪酸)は 2 章と同様の手法で測定した。また、LPS 活性値の測定は、ろ過胃液をパイロジェンフリーマイクロチューブ(Safe-Lock Tubes, eppendorf, Hamburg, Germany)を用いて遠心分離(9,100×g、30 分、4℃)して得られた上清を用い、Hirabayashi ら(2017)の方法に基づきカイネティック比色法(パイロクロム、生化学工業株式会社、東京)で測定した。

(6)乳量・乳成分

乳量は 2015 年 9 月 2 日の朝の搾乳までは、daily using milk meter（F series, TRU-Test Distributors, Auckland, New Zealand）を用いて測定し、2015 年 9 月 2 日の夕方搾乳以降は搾乳システム（乳量計付自動離脱装置 MMD500、オリオン機械株式会社、長野）に付属するデジタル流量計にて測定した。乳汁サンプルは分娩後における血液採材日の朝晩の搾乳時に、搾乳システム専用のサンプラーから採取した。乳脂肪率、乳蛋白質率、SNF、乳糖率および MUN の測定と算出は 2 章と同様の方法で行った。

(7)乳中脂肪酸組成

分娩後 1、2、3、5、8 および 12 週に採取した乳汁について、レーゼゴッドリーブ法（AOAC. 2000）により粗脂肪の抽出を行った。抽出した脂肪は Kamegai ら（2001）の方法に準じてメチルエステル化し、キャピラリーカラム（FAMEWAX, Restek, Bellefonte, USA）を装着したガスクロマトグラフ（GC-2014 Plus、株式会社島津製作所、京都）での測定に供した。脂肪酸は、個別脂肪酸として C4:0、C6:0、C8:0、C10:0、C12:0、C14:0、C14:1、C16:0、C16:1、C18:0、C18:1、18:1 trans -11（TVA）、C18:2、C18:3n6、C18:3n3、共役リノール酸（CLA）、C20:0 および C20:4n6 の 18 種類を測定し、脂肪酸全体に占めるそれぞれの組成割合を算出した。また、Moate ら（2007）の分類に基づき、主にルーメン発酵に由来する C4:0～C14:1 を Denovo 脂肪酸、主に体脂肪および飼料中の脂肪に由来する C18:0 以降の脂肪酸を Preformed 脂肪酸、それらの中間の性質をもつ C16:0 および C16:1 を Mixed 脂肪酸として分類し、同様に組成割合を算出した。なお、分娩後 2 週のみ、のべ 13 頭（脂肪肝群 8 頭、正常群 5 頭）について乳中脂肪酸測定用の乳汁採材を実施しておらず、欠測値とした。

4. データ解析

すべての統計解析は JMP13.2.1（SAS Institute Inc., Cary, NC, USA）を用いて行った。

（1）正常群と脂肪肝群の比較

肝生検組織の画像診断により分類した 2 グループ（正常群、脂肪肝群）について、グループを主試験区、週次を副試験区とした分割区法によって試験期間中の DMI、体重、BCS、血液生化学性状、ルーメン液性状、泌乳成績および乳中脂肪酸組成について統計処理を行い、両グループの違いを比較した。グループ間に有差異（$p<0.05$）または差の傾向（$p<0.10$）が認められた項目および、ｸﾞﾙｰﾌﾟと週次に有意な交互作用（$p<0.05$）または交互作用の傾向（$p<0.10$）が認められた項目については、週次ごとの分析値の違いを対比により確認し、各グループの特性について検討した。

（2）判別分析による脂肪肝の間接的診断

脂肪肝の間接的診断の手法として、分娩後 1 週目の血液生化学値または泌乳成績と乳中脂肪酸組成を変数に用いた判別式のそれぞれについて検討した。血液生化学値は、2 章において周産期疾病リスク評価が可能な判別式の変数として得られた“IP、Ca、T-Cho”または“IP、Ca、PL”の 3 変数に、本試験にて分娩後 1 週目に脂肪肝群と正常群で有意な差が認められた血液指標を加えた 4 変数による判別式の精度を検証した。泌乳成績による判別式は、乳量、4％脂肪補正乳量（4％FCM）、乳脂肪率、乳蛋白質率、SNF、乳糖率および MUN を変数候補として、ステップワイズ増減法にて最も精度の高い判別式を検証した。また、得られた判別式に個別乳中脂肪酸を 1 種ずつ加え、判別式の精度を向上させる脂肪酸を検証した。

さらに、分娩前全ての週次の血液生化学値のデータを用いて判別式を作成し、分娩前における分娩後の脂肪肝発症の予測精度を検証した。変数には、2 章で得られた上記の 3 変数に、本試験において分娩前のいずれの週次においても両群に有意な差が認められた Alb と IGF-Iを加えた 5 変数を用いて検証を行った。

3.3 結果

肝生検による組織診断の結果に基づき、供試牛を正常群 24 頭と脂肪肝群 13 頭の 2 グループに分類し、両グループの比較を行った。

1. DMI、体重、BCS

両グループの DMI、体重、BCS を表 3.4 に、測定値の経時的変化を図 3.3 に示す。DMI は両群に差は認められなかったが、体重と BCS には群と週次の有意な交互作用が認められた。体重は分娩前 3 週および分娩日において脂肪肝群が高い傾向（$p<0.10$）であったが、その後は差が無く推移した。BCS は分娩前 3 週から分娩後 3 週にかけて脂肪肝群が高く推移し、特に分娩前 3 週において有意な差が認められたが、分娩後 5 週目以降は、有意差はないが脂肪肝群が低く推移した。

2. 血液生化学値

2 グループの血液生化学値を表 3.5 に示す。Alb、3-HB、AST、および IGF-I濃度について、グループ間に有意差が認められた。また、NEFA、3-HB、AST、ALT および IGF-I濃度についてはグループと週次の間に有意な交互作用が認められた。グループ間に有意差が認められた項目ならびにグループと週次に有意な交互作用が認められた項目について、測定値の経時的変化を図 3.4 に示す。分娩前においては、Alb と IGF-Iの濃度が分娩前 3 週から 1 週にかけて脂肪肝群が正常群に比べて高い値を示した（$p<0.05$）。分娩後においては、NEFA と AST が分娩後 1 および 2 週目に脂肪肝群が正常群に比べて有意な高値を示し、3-HB および Alb は分娩後 1-3 週にかけて脂肪肝群が高い値を示した（$p<0.05$）。また、ALT は脂肪肝群が分娩後 1 週目に有意に高値となった。

3. ルーメン液性状

両群のルーメン液性状を表 3.6 に示す。測定したいずれの項目も群間に有意な差はなく、群と週次の交互作用も認められなかった。

4. 泌乳成績

両群の泌乳成績に関する各項目の測定値を表 3.7 に示す。実乳量、4%FCM、SNF および MUN について、グループ間に有意差が認められた。グループ間に有意差が認められた項目の経時的変化を図 3.5 に示す。4%FCM は分娩後 2、3、5 週に、実乳量は全ての週次で脂肪肝群が正常群に比べて有意に高値であった。SNF は脂肪肝群が正常群に比べて常に低く推移し、分娩後 5 週目で有意な差が認められた。MUN は正常群が常に高く推移し、分娩後 2 週に脂肪肝群に比べて有意に高値となった。

5. 乳中脂肪酸組成

両群の乳中脂肪酸組成の測定値を表 3.8 に、Denovo、 Mixed および Preformed の各脂肪酸割合の経時的変化を図 3.6 に示す。Denovo 脂肪酸は C8:0-C14:1 の各個別脂肪酸で脂肪肝群が有意に低値であり（$p<0.05$）、測定した全脂肪酸に占める Denovo 脂肪酸の割合も、脂肪肝群が有意に低値であった。Preformed 脂肪酸は C18:1 と C18:2 において脂肪肝群が有意に高値となり、全体に占める Preformed 脂肪酸の割合も脂肪肝群が高値であった（$p<0.05$）。週次別の推移では、Denovo 脂肪酸は分娩後 1 週から 5 週にかけて脂肪肝群が有意に低く推移し、Preformed 脂肪酸は分娩後 1 週から 8 週まで脂肪肝群が有意に高く推移した。

6. 判別分析

(1) 血液生化学値を用いた判別式

検討した判別式の変数の組み合わせと誤判別率、脂肪肝診断感度および特異度

を表 3.9 に示す。血液生化学値においては、2 章で得られた周産期疾病リスクの判別式に用いた 3 の変数（IP、Ca、PL および IP、Ca、T-Cho）に 3-HB を加えた判別式により、群分けへの誤判別率が 10.8％および 13.5％となった。脂肪肝診断の感度は 100.0％および 92.3％、特異度はいずれも 83.3％であった。IP、Ca、PL、3-HB を変数に用いた判別式を下記に記す。

z= 0.2418* IP − 0.4511 *Ca − 0.0396* PL + 0.001*"3-HB" − 4.4868

(z < 0 正常群、z > 0 脂肪肝群)

3 変数に AST、Alb、NEFA および ALT を加えた判別式は、いずれも 3-HB を加えたものに比べ精度が落ちる結果であった。

(2) 泌乳成績と乳中脂肪酸組成を用いた判別式

泌乳成績を変数に用いた判別式では、乳量、4％FCM、乳脂肪率、乳蛋白質率、SNF の 5 変数を用いた判別式の誤判別率が 16.2％と最も低くなり、脂肪肝診断感度は 84.6％、特異度は 83.3％であった（表 3.10）。これに各個別脂肪酸を加えた 6 変数の判別式の中では、C18:1 を加えた時に誤判別率が 8.1％と最も小さくなった。また、脂肪肝診断感度は 92.3％、特異度は 91.7％であった（表 3.10）。泌乳成績 5 変数に C18:1 を加えた 6 変数による判別式を下記に記す。

z= 0.4128*乳量 − 0.2275*4%FCM + 0.7344*乳脂肪率 − 2.8924*SNF

+ 5.0335*乳蛋白質率 + 0.1551* "C18:1" − 4.5935

(z < 0 正常群、z > 0 脂肪肝群)

C18:1 の代わりに C6:0、C8:0、C10:0、C18:0、TVA、C18:2 および C20:4n6 のいずれかを変数に加えることによっても泌乳成績のみの判別式に比べて誤判別率が低くなった

が、上記判別式に比べると精度が落ちる結果であった。

(3)分娩前における脂肪肝予測判別式

2 章で得られた 3 変数に Alb と IGF-I を加えた判別式による誤判別率、脂肪肝予測感度、特異度を表 3.11 に示す。IP、Ca、PL、Alb および IGF-I の 5 変数を用いた判別式による誤判別率は 16.0%、IP、Ca、T-Cho、Alb および IGF-I の 5 変数を用いた誤判別率は 15.0%であった。また、脂肪肝予測感度はそれぞれ 77.8%と 75.0%、特異度は 87.5%と 90.6%であった。

前者の判別式を下記に記す。

z＝ 0.2648*IP - 0.3626*Ca - 0.0547*PL＋2.9025*Alb＋0.0195*"IGF-I"

- 5.9310

(z < 0 正常群、z > 0 脂肪肝群)

3.4 考察

脂肪肝の発症リスクを高める要因の一つとして、分娩前の過肥が知られている（Goselink *et al*. 2020）。また、分娩前後の飼料摂取量の低下によるエネルギー不足も脂肪肝発症の要因となる（扇ら. 1991）。本試験では、供試牛の体重とBCSに群と週次の交互作用が認められ、分娩前においてはいずれも脂肪肝群が正常群に比べて高く推移した。分娩後は両グループともに体重とBCSの低下が認められたが、脂肪肝牛でその程度が大きく、分娩後5週目には体重・BCSともに両グループがほぼ同じ値となったことから、脂肪肝群でより多くの体脂肪が動員されたと考えられる。分娩3週前のBCSは正常群が3.07、脂肪肝群が3.34で有意差が認められたが、一般的にはBCSが3.75～4.00を超えるような牛が、“過肥牛”として各種周産期疾病のリスクが高いとされており（山岸ら. 2004; 植松ら.2003）、本試験の脂肪肝群のBCSはこれに比べて低かった。しかし、今回の結果から、乾乳期のBCSが3.5未満であっても、スコアが高い牛ほど脂肪肝の発生リスクが高くなることが示唆された。

泌乳成績においては、4%FCM、実乳量ともに脂肪肝群が高く推移し、実乳量はすべての週次で脂肪肝群が有意に高値となった。一方で、DMIは両群に差は認められなかった。脂肪肝群では、DMIは正常群と同等であったものの、正常群に比べて乳生産に多くのエネルギーを要したことから負のエネルギーバランスがより重度となり、多くの体脂肪が動員されたと考えられる。脂肪肝群においてSNFが低く推移したことも、低エネルギー状態を反映したものと考えられる。

血液性状では、脂肪肝群における分娩後のNEFA（分娩後1、2週）の有意な高値が認められた。これは正常群と比較して体脂肪が多く動員されたことを反映している（Schäff *et al*. 2013）。また、分娩後1週における正常群の3-HB値は1,063μmol/Lであったのに対し、脂肪肝群の3-HB値は2,174μmol/Lと約2倍の有意な高値を示し、潜在性ケトーシスの診断基準とされる1,200～1,400μmol/Lを大きく上回った（Geishauser *et al*.1997; LeBlanc *et al*. 2005）。正常群に比べてより多くの体脂肪が動

員されたことに加え、高泌乳による NEB の亢進が多量のケトン体生成につながったと考えられる（Herdt. 2000）。AST（分娩後 1.2 週）および ALT（分娩後 1 週）に脂肪肝群で有意な高値が認められたことも、過剰に動員された体脂肪による肝細胞の障害を示していると考えられる（Farid *et al*. 2013; Kalaitzakis *et al*. 2007）。測定した血液成分のうち、Alb、IGF-I は分娩前の全ての週次において脂肪肝群が正常群に比べて有意に高値を示した。Alb は中長期的な栄養状態を反映する指標として知られており（Blowey *et al*. 1973）、IGF-I も栄養状態を反映して増減することが知られている（Nishimura *et al*. 1999; 川島. 2017）。このことから、脂肪肝群は泌乳後期から乾乳期にかけて要求量を上回る量のエネルギーを摂取していた可能性が考えられる。それによって正常群に比べて体脂肪の蓄積が多くなり、分娩前の BCS の差につながったものと推察される。

乳中脂肪酸組成は、ルーメン発酵に由来する Denovo 脂肪酸（C4:0-C14:1）、体脂肪に由来する Preformed 脂肪酸（C18:0-C20:4n6）および両者に由来する Mixed 脂肪酸（C16:0,C16:1）の組成割合が乳牛のエネルギー状態を反映しており（Moate *et al*. 2008; Woolpert *et al*. 2017）、周産期疾病の発症とも関連性があることが報告されていることから（Bach *et al*. 2019; Mann *et al*. 2015）、近年、飼養管理の指標として注目されている。しかし、肝生検により診断した脂肪肝牛について乳中脂肪酸組成を調査した報告は見当たらない。本試験では、Preformed 脂肪酸の合計割合で脂肪肝群（46.07%）が正常群（41.57%）に比べて 4.5%高値であり、体脂肪動員を反映した結果であると考えられた。また、血中の NEFA、3-HB、AST といった脂肪肝の指標項目が分娩後 5 週目以降は両群に有意差が認められなかったのに対し、Preformed 脂肪酸割合は分娩後 8 週目まで脂肪肝群が有意に高値で推移した。このことから、乳中脂肪酸割合を測定することにより、血中成分に反映されない軽度の体脂肪動員を検知できるとともに、過去の脂肪肝罹患状況を推定できる可能性が示唆された。Denovo 脂肪酸の合計割合は、脂肪肝群が 18.21%と、正常群の 20.70%に比べて約 2.5%低い結果

となった。両群の DMI が同程度であったことから、体脂肪動員に伴う Preformed 脂肪酸の増加による、相対的な減少であると考えられた。

脂肪肝の間接的診断法については、過去にも複数報告されている。Haudum ら（2011）は超音波画像診断装置を用いた脂肪肝の間接診断を試みており、肝組織中の TG 含量が 150mg/g 以上と重度の脂肪肝である牛と 100mg/g 未満の牛との判別では判別感度、特異度ともに約 85%と良好であったことを示している。一方、50mg/g 未満牛と 50mg/g 以上牛との判別では、感度・特異度ともに 61%に低下し、軽度の脂肪肝牛の判別精度は低かったとしている。扇ら（1991）は、血中総ケトン体濃度と肝臓の脂肪沈着割合との間に有意な相関があることを示しているが、脂肪肝の診断精度には言及されていない。Farid ら（2013）は血液成分値を用いたロジスティック回帰分析により、86.7～99.7%と高い感度で脂肪肝を判定可能であったと述べているが、脂肪肝の診断は廃用牛におけると畜場での検査に基づいており、臨床的に重度の脂肪肝牛が選別されている可能性が考えられる。また、分娩前の血液生化学値を用いた脂肪肝の発生予測について、芝野ら（2005）は、血漿中レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼや T-Cho の閾値によりそれぞれ 12.5、31.3%の誤判別率で脂肪肝を予察できると示しているが、脂肪肝の診断は臨床症状に基づいており、肝生検は実施していない。本報告では、肝生検の画像診断により確定診断した脂肪肝牛に対し、判別式による脂肪肝の間接診断と発症予察を試みた。分娩後においては、血液生化学値を変数とした判別式と、泌乳成績と乳中脂肪酸組成を変数とした判別式をそれぞれ作成し、脂肪肝の間接診断の精度を検証した。脂肪肝の判定は分娩後 2 週目に実施した肝生検検体に基づいて実施したが、判別式の作成にあたっては、より早期での診断を行うことを目的として、分娩後 1 週目における判別精度を検証した。また、分娩前においては、実際の分娩が予定日からずれることを想定し、特定の週次に限定せず、分娩前 1-3 週の血液データにて予測精度を検証した。

分娩後においては、2 章で得られた周産期疾病リスクを評価するための判別式の変

数（IP、Ca、PL および IP、Ca、T-Cho）に 3-HB を加えた 4 変数を用いた判別式により良好な誤判別率が得られた。本試験では、IP、Ca、PL および T-Cho は、いずれも脂肪肝群と正常群の間に有意な差は認められなかった。また、表には示していないが、IP、Ca、PL または IP、Ca、T-Cho の 3 変数のみによる脂肪肝の誤判別率はいずれも 35.1％と高く、3-HB のみを変数とした判別式の誤判別率も 24.3％にとどまった。しかし、動員された体脂肪に対する肝臓の処理能力の指標となる 3-HB と、分娩後の飼料摂取量に影響するカルシウム代謝指標（Ca、IP）および栄養状態を反映する指標（PL、T-Cho）が組み合わさることで、より的確に脂肪肝牛を診断することが可能になったと考えられる。

このように、血液生化学値を用いた判別式により脂肪肝発症牛を良好な精度で診断可能であったが、血液成分のデータを得るためには、採血と分析の労力が必要になる。このことから本試験では、泌乳成績と乳中脂肪酸組成を変数に用いた判別式についても検討を行った。泌乳成績のみを用いた判別式での誤判別率は 16.2％と血液生化学値を用いた判別式に比べて高くなったが、C18:1 を変数に加えることで、8.1％まで低下した。本試験の結果で示されたように、C18:1 は体脂肪動員を直接反映する Preformed 脂肪酸のうちの半分以上の割合を占めている。また、Yoshimura ら（1982）は、乳牛の皮下脂肪中の TG の脂肪酸組成は C18:1 が 46.9％を占め最も多かったと報告していることから、C18:1 は体脂肪動員に最も鋭敏に反応する脂肪酸だと考えられる。このことが、C18:1 を判別式の変数に加えることによる脂肪肝診断精度の向上につながったものと考えられる。本試験では、ガスクロマトグラフィーを用いて脂肪酸組成を分析したが、近年、赤外分光法により生乳を測定し、検量線を用いて乳中脂肪酸組成を推定する手法が開発されている（Soyeurt *et al.* 2006）。このことから、本試験で得られた判別式を用いることで、各種乳成分検査と同時に脂肪肝牛の摘発を行うことも可能になると考えられる。

さらに分娩前においては、IP、Ca、PL、Alb、IGF-I の 5 変数を用いた判別式によって、誤判別率が 16.0％、脂肪肝の予測感度が 77.8％と良好な精度で脂肪肝発症の予測

が可能であった。PL、Alb および IGF-I はいずれも栄養状態を反映する指標であるが、得られた判別式において、PL は負の係数である一方、Alb および IGF-I の係数は正であった。PL は乾乳期における短期的な飼料摂取不足を反映するリスク指標として、Alb および IGF-I は泌乳中後期の栄養過剰を反映する脂肪蓄積の指標として選択されたものと考えられる。脂肪肝の予防手段として、プロピレングリコールやグリセリンの給与、グルカゴンの皮下注射などの手法が報告されている（Bjerre-Harpøth *et al.* 2015; Osman *et al.* 2008; Nafikov *et al.* 2006）。本判別式により分娩前に脂肪肝発症のリスクがあると判定された牛に対しては、分娩前後に適切な予防処置を講じることで、脂肪肝の発症率の低減につながるものと考えられる。

3.5 図表

表3.1 供試牛の概要

	平均			最小	最大
産次	2.8	±	0.9	2	5
乾乳日数 (日)	93.2	±	49.5	37	234
開始時体重 (kg)	734	±	79	611	942
分娩後12週目の平均乳量	38	±	6.6	27.8	52.7

(平均値 ± 標準偏差)

表3.2　乾乳期の飼料構成と飼料成分

	分娩前4週～	分娩前2週～
給与量 (kg)		
クレイン乾草	5.0	3.0
オーツ乾草	4.0	4.0
ビートパルプ	3.0	3.0
乾乳期用配合飼料	3.0	4.0
飼料成分		
DM給与量 (kg/日)	13.2	12.3
DM割合 (%)	88.0	87.8
TDN (DM中%)	67.1	69.3
CP (DM中%)	11.6	12.5
NDF (DM中%)	49.7	44.7

表3.3 分娩後の飼料構成 (TMR)

構成飼料	(DM中%)
サイレージ (トウモロコシ＋ソルガム混播)	16.8
アルファルファ乾草	12.8
フェスク乾草	3.9
スーダン乾草	6.8
ビートパルプ	7.0
トウモロコシ (圧片・粉砕混合)	26.5
圧片大麦	10.0
大豆粕	10.6
綿実	1.7
コーングルテンミール	0.3
加熱大豆	0.3
エネルギーサプリメント	1.7
ミネラル・ビタミンプレミックス[1)]	1.6
飼料成分	
DM割合 (%)	55.0
TDN (乾物中%)	76.8
CP (乾物中%)	15.3
NDF (乾物中%)	35.2

1) 炭酸カルシウム : 第2リン酸カルシウム : 塩 : 重曹 : ビタミン剤
＝2 : 2 : 1 : 1 : 1 (原物混合比)

表3.4　DMI、体重およびBCS

	群		p値		
	正常群 (n = 24)	脂肪肝群 (n = 13)	群	週次	群*週次
DMI (kg/日)	18.0 ± 0.4	17.8 ± 0.5	0.7487	<0.0001	0.3882
体重 (kg)	675.3 ± 12.9	697.1 ± 17.6	0.3249	<0.0001	0.0002
BCS	2.74 ± 0.06	2.83 ± 0.08	0.3611	<0.0001	0.0008

(最小二乗平均値 ± 標準誤差)

表3.5 血液生化学値

	群						p値		
	正常群 (n = 24)			脂肪肝群 (n = 13)			群	週次	群*週次
Glu (mg/dL)	60.9	±	0.8	59.3	±	1.1	0.2284	<0.0001	0.1977
TP (g/dL)	7.0	±	0.1	7.1	±	0.1	0.2492	<0.0001	0.8649
Alb (g/dL)	3.5	±	0.0	3.7	±	0.0	0.0008	<0.0001	0.5721
BUN (mg/dL)	11.8	±	0.4	10.8	±	0.5	0.0898	<0.0001	0.4325
PL (mg/dL)	124.7	±	3.5	117.8	±	4.7	0.2414	<0.0001	0.9010
T-Cho (mg/dL)	109.3	±	3.2	103.9	±	4.3	0.3174	<0.0001	0.7404
Ca (mg/dL)	10.0	±	0.1	9.8	±	0.1	0.2634	0.0002	0.4267
IP (mg/dL)	5.3	±	0.1	5.4	±	0.1	0.7425	0.9875	0.7154
NEFA (mEq/L)	0.17	±	0.02	0.20	±	0.02	0.2876	<0.0001	0.0049
3-HB (μmol/L)	787.7	±	59.1	1082.4	±	80.0	0.0054	<0.0001	<0.0001
TG (mg/dL)	9.8	±	0.3	10.3	±	0.5	0.4076	<0.0001	0.0791
T-BIL (mg/dL)	0.1	±	0.0	0.1	±	0.0	0.5680	<0.0001	0.8402
AST (IU/L)	71.7	±	3.2	84.3	±	4.4	0.0262	<0.0001	0.0004
ALT (IU/L)	20.5	±	0.6	20.9	±	0.9	0.7288	<0.0001	0.0016
IGF-1 (ng/mL)	55.6	±	3.0	65.9	±	4.0	0.0487	<0.0001	<0.0001

(最小二乗平均値 ± 標準誤差)

表3.6 ルーメン液性状

	群						p値		
	正常群 (n = 24)			脂肪肝群 (n = 13)			群	週次	群*週次
pH	6.59	±	0.03	6.64	±	0.05	0.4017	<0.0001	0.1775
NH3-N (mg/dL)	5.4	±	0.3	4.7	±	0.4	0.1093	<0.0001	0.1143
総VFA量 (mmol/L)	113.2	±	2.2	114.2	±	3.1	0.8011	<0.0001	0.6643
VFAモル比 (%)									
酢酸	64.4	±	0.4	64.5	±	0.5	0.8648	<0.0001	0.5039
プロピオン酸	21.1	±	0.4	20.8	±	0.5	0.6291	<0.0001	0.5046
酪酸	12.2	±	0.2	12.5	±	0.3	0.3900	0.0409	0.2693
酢酸／プロピオン酸比	3.19	±	0.06	3.26	±	0.08	0.4345	<0.0001	0.6329
LPS (EU/ml)	5640	±	704	4842	±	1295	0.5920	<0.0001	0.6607

(最小二乗平均値 ± 標準誤差)

表3.7 泌乳成績

	群					p値		
	正常群 (n = 24)			脂肪肝群 (n = 13)		群	週次	群*週次
4%FCM (kg)	35.4	±	1.2	41.3	± 1.7	0.0085	0.0006	0.6040
実乳量 (kg)	34.1	±	1.2	39.7	± 1.6	0.0087	<0.0001	0.8410
乳脂率 (%)	4.03	±	0.08	4.08	± 0.11	0.7119	<0.0001	0.3216
SNF率 (%)	8.54	±	0.05	8.37	± 0.06	0.0335	<0.0001	0.1026
乳蛋白質率 (%)	3.12	±	0.03	3.05	± 0.04	0.1832	<0.0001	0.8499
乳糖率 (%)	4.42	±	0.03	4.34	± 0.04	0.1079	<0.0001	0.2072
MUN (mg/dL)	11.3	±	0.3	10.0	± 0.4	0.0187	0.0028	0.1621

（最小二乗平均値 ± 標準誤差）

表3.8 乳中脂肪酸組成

	群		p値		
	正常群 (n = 24)	脂肪肝群 (n = 13)	群	週次	群*週次
Denovo脂肪酸 (%)					
C4:0	1.60 ± 0.04	1.72 ± 0.06	0.0962	0.0099	<0.0001
C6:0	1.53 ± 0.04	1.41 ± 0.05	0.0560	<0.0001	<0.0001
C8:0	1.02 ± 0.03	0.91 ± 0.04	0.0277	<0.0001	<0.0001
C10:0	2.43 ± 0.09	2.07 ± 0.12	0.0186	<0.0001	0.0007
C12:0	2.88 ± 0.10	2.38 ± 0.14	0.0067	<0.0001	0.0061
C14:0	10.48 ± 0.24	9.07 ± 0.33	0.0014	<0.0001	0.0006
C14:1	0.75 ± 0.03	0.65 ± 0.04	0.0331	<0.0001	0.0180
Mixed脂肪酸 (%)					
C16:0	35.89 ± 0.40	33.74 ± 0.56	0.0035	<0.0001	0.7548
C16:1	1.84 ± 0.06	1.98 ± 0.09	0.1747	<0.0001	<0.0001
Preformed脂肪酸 (%)					
C18:0	11.56 ± 0.26	12.01 ± 0.37	0.3328	<0.0001	0.7851
C18:1	24.90 ± 0.60	28.63 ± 0.84	0.0009	<0.0001	0.0086
TVA	1.65 ± 0.03	1.74 ± 0.04	0.0815	<0.0001	0.6218
C18:2	2.47 ± 0.05	2.69 ± 0.06	0.0074	<0.0001	0.2092
C18:3n6	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.8320	0.0002	0.7770
C18:3n3	0.29 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.1233	<0.0001	0.2392
CLA	0.32 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.3543	<0.0001	0.0986
C20:0	0.15 ± 0.00	0.15 ± 0.01	0.7647	0.0227	0.1167
C20:4n6	0.19 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.0156	0.2196	0.0209
総 De novo脂肪酸 (%)	20.70 ± 0.50	18.21 ± 0.69	0.0060	<0.0001	0.0007
総 Mixed脂肪酸 (%)	37.73 ± 0.41	35.72 ± 0.57	0.0073	<0.0001	0.6731
総 Preformed脂肪酸 (%)	41.57 ± 0.73	46.07 ± 1.02	0.0010	<0.0001	0.0464

(最小二乗平均値 ± 標準誤差)

表3.9 血液生化学値を用いた判別式の誤判別率、感度および特異度

判別式の変数	誤判別率[1)] (%)	感度[2)] (%)	特異度[3)] (%)
IP, Ca, PL, 3HB	10.8	100.0	83.3
IP, Ca, PL, AST	29.7	69.2	70.8
IP, Ca, PL, Alb	18.9	92.3	75.0
IP, Ca, PL, NEFA	24.3	84.6	70.8
IP, Ca, PL, ALT	16.2	69.2	91.7
IP, Ca, T-cho, 3HB	13.5	92.3	83.3
IP, Ca, T-cho, AST	27.0	69.2	75.0
IP, Ca, T-cho, Alb	16.2	92.3	79.2
IP, Ca, T-cho, NEFA	27.0	84.6	66.7
IP, Ca, T-cho, ALT	21.6	69.2	83.3

1) 判別式の予測と異なる結果を示した牛の割合

2) 全脂肪肝群のうち、判別式により正しく脂肪肝と判別された牛の割合

3) 全正常群のうち、判別式により正しく正常群と判別された牛の割合

表3.10 泌乳成績と脂肪酸組成を用いた判別式の誤判別率、感度および特異度

判別式の変数	誤判別率[1)] (%)	感度[2)] (%)	特異度[3)] (%)
乳量, 4%FCM, 乳脂肪率, 乳蛋白質率, SNF率; (A)	16.2	84.6	83.3
(A), C6:0	13.5	92.3	83.3
(A), C8:0	13.5	92.3	83.3
(A), C10:0	13.5	92.3	83.3
(A), C18:0	13.5	84.6	87.5
(A), C18:1	8.1	92.3	91.7
(A), TVA	13.5	84.6	87.5
(A), C18:2	13.5	84.6	87.5
(A), C20:4n6	13.5	84.6	87.5

1) 判別式の予測と異なる結果を示した牛の割合

2) 全脂肪肝群のうち、判別式により正しく脂肪肝と判別された牛の割合

3) 全正常群のうち、判別式により正しく正常群と判別された牛の割合

表3.11 分娩前の血液生化学値を用いた判別式の誤判別率、感度および特異度

判別式の変数	誤判別率[1)] (%)	感度[2)] (%)	特異度[3)] (%)
IP, Ca, PL, Alb, IGF-1	16.0	77.8	87.5
IP, Ca, T-Cho, Alb, IGF-1	15.0	75.0	90.6

1) 判別式の予測と異なる結果を示した牛の割合

2) 全脂肪肝群のうち、判別式により脂肪肝発症を予察された牛の割合

3) 全正常群のうち、判別式により脂肪肝発症を予察されなかった牛の割合

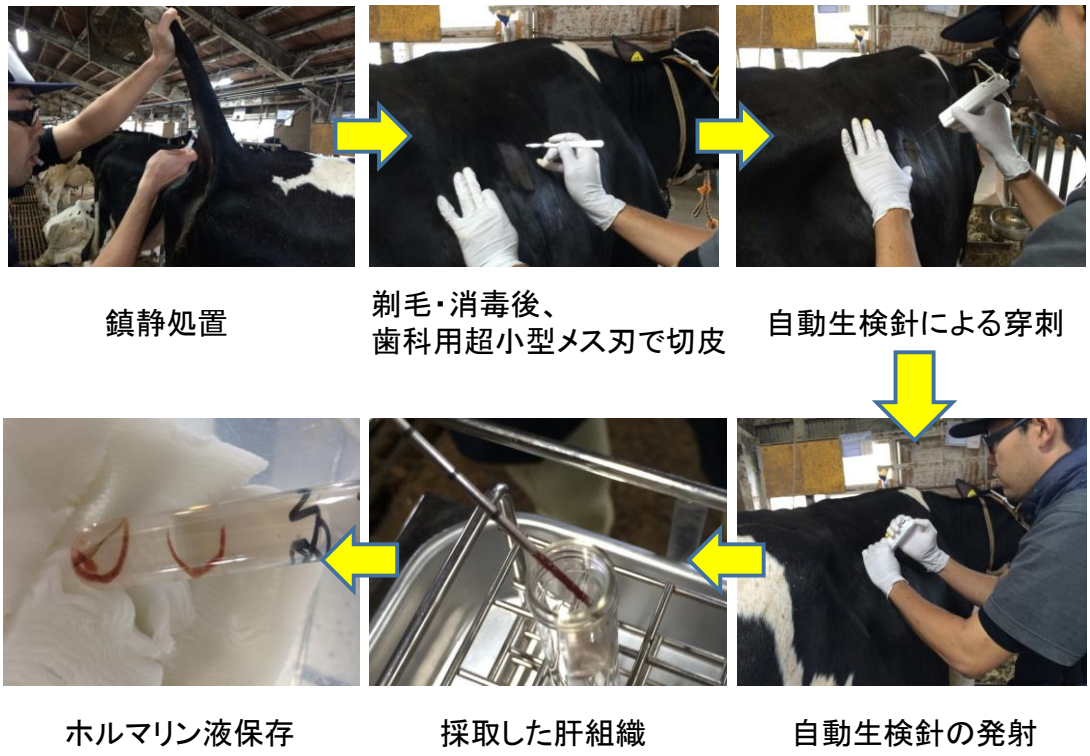
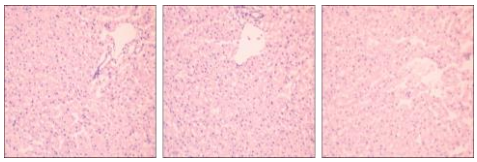
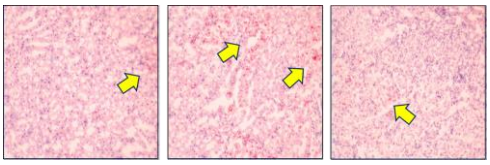


図 3.1　肝生検実施の様子

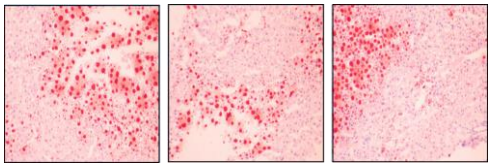
スコア 0：脂肪滴の沈着を認めない



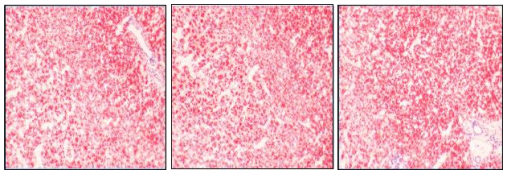
スコア 1：極少量の脂肪滴の沈着を認める



スコア 2：脂肪滴が中心静脈周囲に局在する



スコア 3：小さな脂肪滴をび漫性に認める



スコア 4：大きな脂肪滴をび漫性に認める

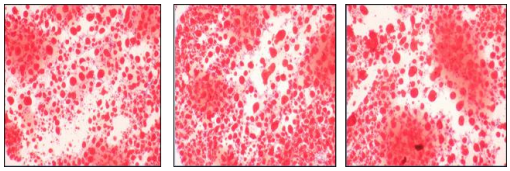


図 3.2　脂肪肝の判定スコア

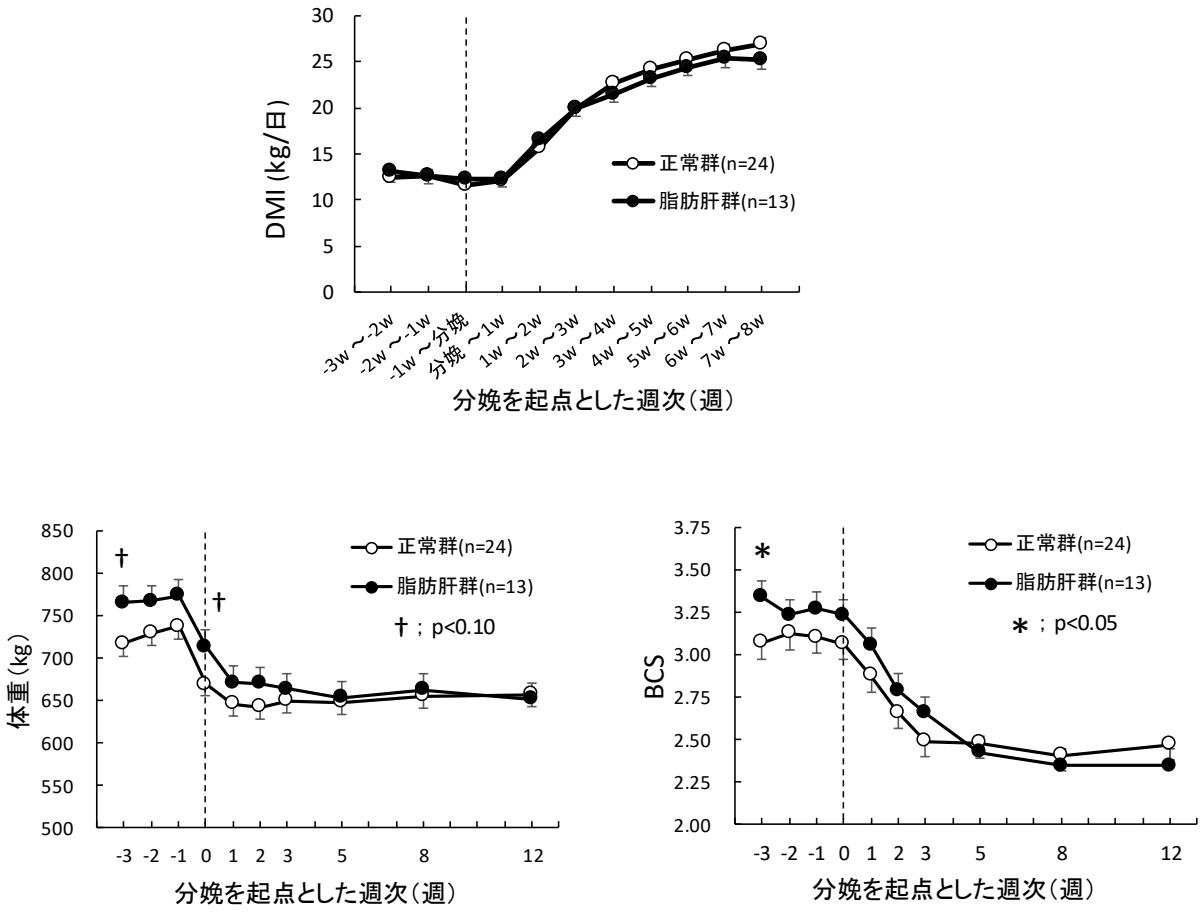


図 3.3　乾物摂取量、体重、BCS の推移

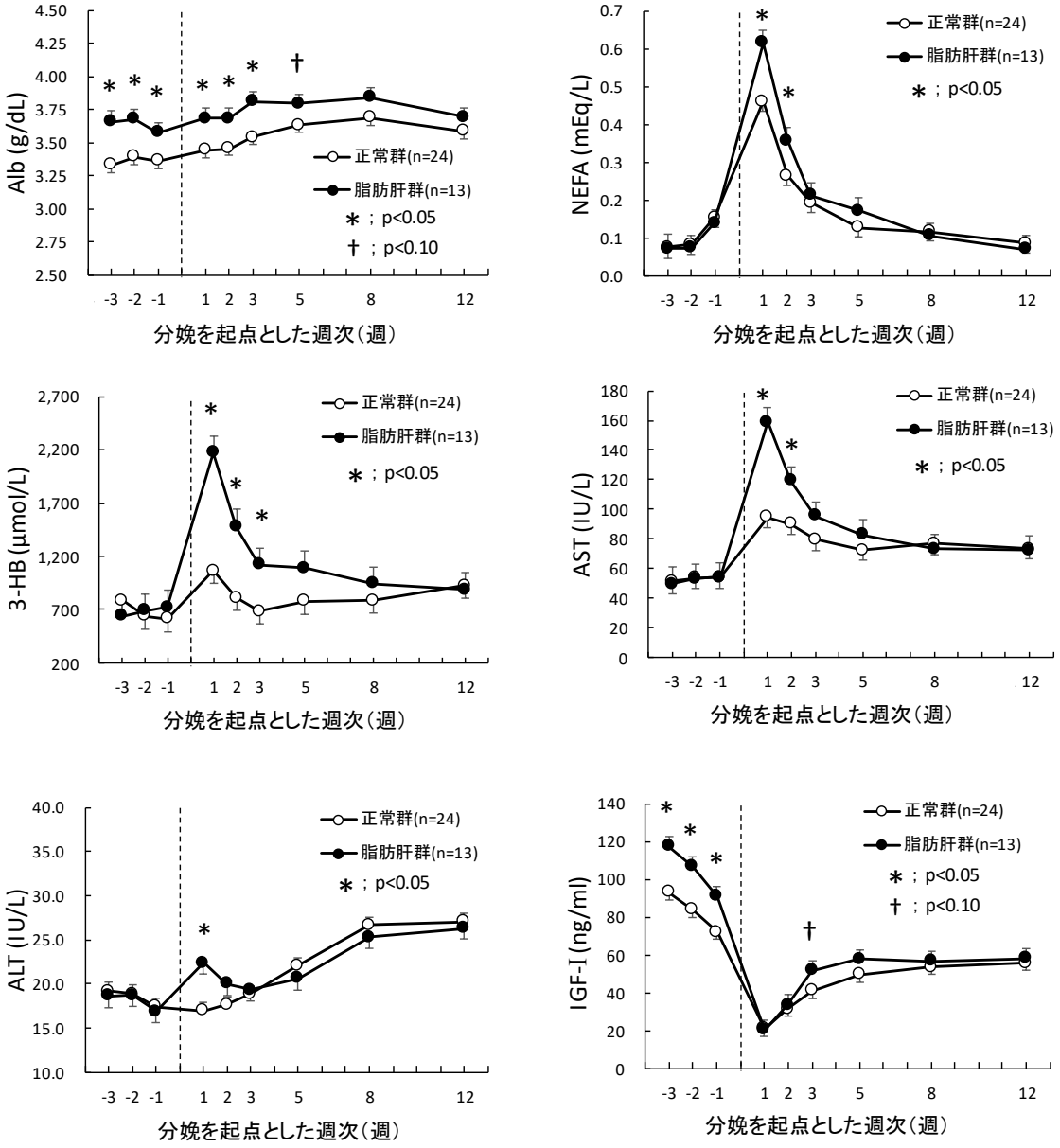


図 3.4　血液生化学成分の推移

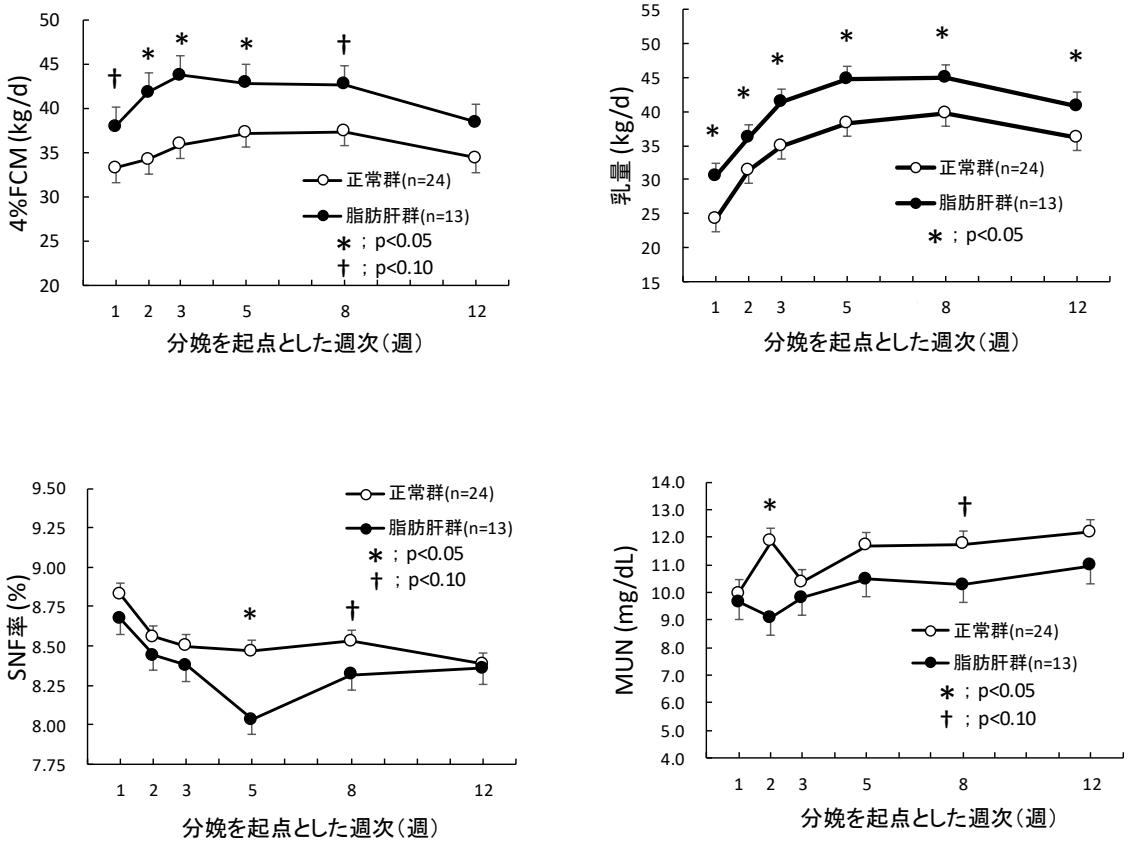

4%FCM (kg/d)
乳量 (kg/d)
SNF率 (%)
MUN (mg/dL)
正常群(n=24)
脂肪肝群(n=13)
＊；p<0.05
†；p<0.10
分娩を起点とした週次（週）

図 3.5　泌乳成績の推移

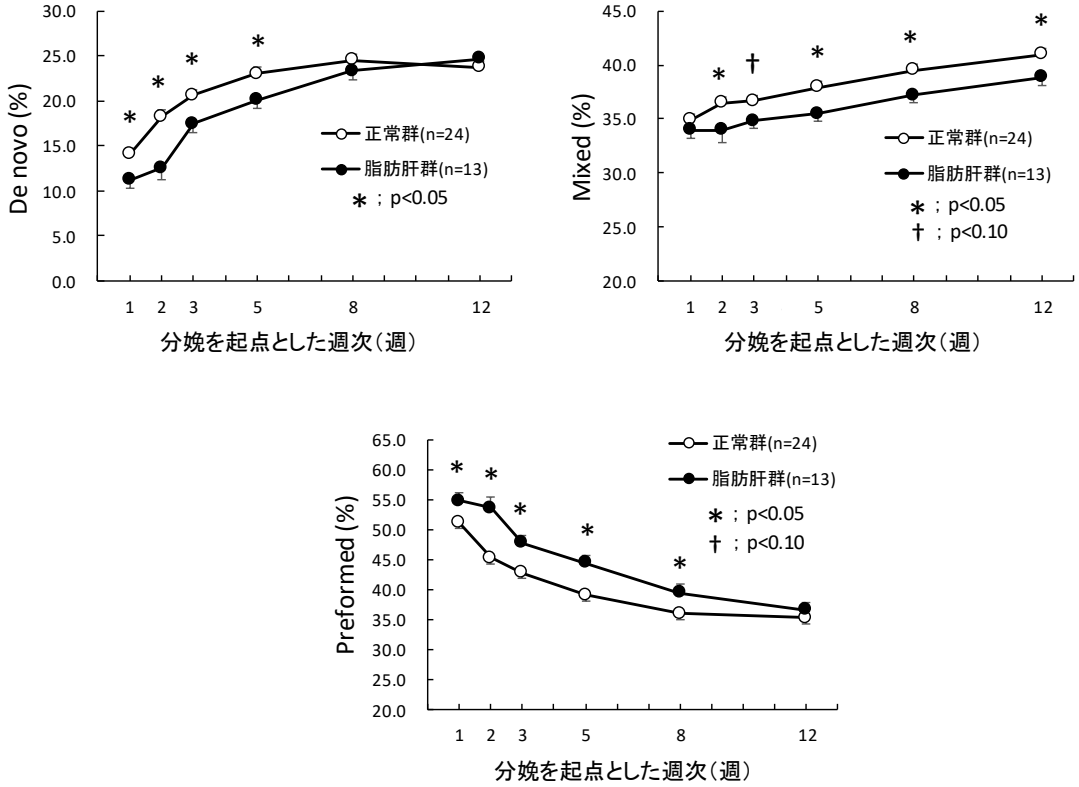


図 3.6　乳中 Denovo、Mixed、Preformed 脂肪酸の推移

第 4 章　周産期乳牛における繁殖性評価指標の検討

4.1　緒言

安定した酪農経営のためには、良好な繁殖成績を維持することは非常に重要であるが、ホルスタイン種乳牛の平均分娩間隔は延長傾向にある（一般社団法人家畜改良事業団. 1990 & 2019）。その要因の一つとして、遺伝改良による産乳能力の大幅な向上による分娩後の負のエネルギーバランスの亢進により、分娩後の繁殖機能の回復が遅延する牛が増えたことがあげられる（Beam & Butler. 1999）。負のエネルギーバランスは、脂肪肝をはじめとする周産期疾病の発症とも関連が深く（Duffield. 2000; Katoh. 2002）、周産期疾病発症牛は繁殖成績も悪化することが報告されている（Katoh. 2002; Ron *et al*. 1984; Walsh *et al*. 2007）。本研究の 2 章および 3 章で検討した判別式の活用等により、周産期疾病の発症予測や早期診断を実施して適切な対処を行うことは、繁殖成績の向上にも寄与するものと考えられる。

一方で、周産期に明確な臨床症状を示さずとも初回授精日数や受胎日数が遅延する牛も多くいることから、臨床的に健康な牛も含めて、分娩後の繁殖性を早期に評価する指標が求められる。周産期における個々の牛の栄養・代謝状態からその後の繁殖性を予測する指標を提示できれば、その情報をもとに個体毎に異なる繁殖管理戦略を立てる事が可能となり、牛群全体の繁殖成績の向上につながると考えられる。

本章では、ホルスタイン種乳牛 41 頭を供試し、分娩後の初回人工授精で受胎した 19 頭と不受胎であった 21 頭について、周産期から泌乳初期にわたる飼養成績、血液性状、ルーメン液性状および泌乳成績を比較し、初回人工授精の受胎性に影響を及ぼす要因を総合的に分析した。また、分娩後の血液成分値を用いた判別式による、初回授精時の受胎性の予測を試みた。

4.2 材料と方法

全ての動物実験は兵庫県立農林水産技術総合センター動物実験指針に基づいて実施した。

1. 供試牛

兵庫県立農林水産技術総合センター淡路農業技術センターで飼養するホルスタイン種乳牛のうち、2016年6月から2019年1月にかけて分娩した延べ41頭（初妊牛17頭、経産牛24頭）を供試した。供試牛の概要を表4.1に示す。これらの産次は2.0±1.2産（経産牛の平均産次は2.8±1.1産）で、経産牛の平均乾乳日数は61.8±11.3日、調査開始時の体重は696±68kg（初産牛653±46kg、経産牛725±66kg）であった。

これらの牛に対し、分娩後64-70日目にOvsynch＋CIDR法（Kawate *et al*. 2006）による排卵同期化処置を開始し、分娩後74-80日目に初回授精として定時人工授精（TAI）を実施した。排卵同期化およびTAIのプロトコールを図4.1に示す。授精後32日目以降に音波画像診断装置（HS-1600V、富士平工業株式会社、東京）を用いて妊娠鑑定を実施し、受胎結果から供試牛を受胎群19頭（初妊牛8頭、経産牛11頭）と不受胎群22頭（初妊牛9頭、経産牛13頭）の2群に分類し、後の分析に供した。

2. 飼養管理

供試牛は、快適性を考慮したタイストール牛舎で飼養し、分娩予定日1週間前から分娩までは単房にて飼養した。飼料は日本飼養標準（農業・食品産業技術総合研究機構. 2007）の要求量を満たすよう設計し、個体別に給与した。分娩予定日4週前から分娩までの飼料構成と養分含量を表4.2に、分娩後のTMRの飼料構成と養分含量を表4.3に示した。分娩前は分離給与とし、分娩後は分離給与から徐々にTMRに切り替え、8日目からはTMRのみを給与した。分娩前と分娩後8日目までは制限給餌とし、分娩後9日目以降は自由摂取とし、残飼が出るように給与量を増やした。給餌は8:30と

15:30に行い、水は自由摂取とした。搾乳は8:00と16:30の1日2回実施した。

3．調査項目と方法

（1）採材・調査間隔と回数

分娩日の 3 週前から分娩後 8 週までの間に以下の調査を行った。飼料摂取量は調査期間中、乳量は分娩後毎日計量した。血液と第一胃液の採材は分娩予定日の 3,2 および 1 週前、分娩後 1,2,3,5 および 8 週に実施し、体重と BCS の計測はこれらの週次に加えて分娩日にも実施した。乳汁の採材は分娩後 1,2,3,5 および 8 週に実施した。

（2）DMI、体重、BCS

DMI、体重、BCS の測定は 2 章と同様の方法で実施した。

（3）血液の採取および処理

朝の飼料給与から 4 時間後にフッ化ナトリウム加真空採血管、血清分離剤加真空採血管、ヘパリンナトリウム加真空採血管（いずれもテルモ株式会社、東京）を用いて頸静脈より採血した。フッ化ナトリウム加血液は採血後、毛細管遠心法（12,000rpm、5 分）にてヘマトクリット値（Ht）を測定した後に冷却遠心（1,660×g 、10 分、4℃）して血漿を分離し、乾式血液自動分析装置（DRI-CHEM NX500V、富士フイルムメディカル株式会社、東京）にて Glu 濃度を測定した。血清分離剤加血液は 37℃で 10 分間静置後、同様に遠心して血清を分離し、屈折計法にて TP 濃度を測定した後、乾式血液自動分析装置にて Alb、BUN、T-Cho、IP、Ca、γ-グルタミルトランスフェラーゼ（GGT）および AST 濃度を測定した。また、余剰血清を T-BIL、TG、NEFA、3-HB、PL および ALT 濃度の測定まで-30℃で凍結保存した。これらの項目は、自動分析装置（JCA-BM8060、日本電子株式会社、東京）を用いて測定した。ヘパリンナトリウム加血液は同様に遠心後血漿を分離し、IGF-I の測定まで-30℃で凍結保存した。IGF-1 は Inabu ら（2019）の方法で測定した。

(4)第一胃液性状

ルーメン液サンプルは採血時に食道チューブ(ルミナー胃汁採取器、富士平工業株式会社、東京)を用いて経口採取し、採取した胃汁は直ちに2重ガーゼを用いてろ過した。NH3-N濃度、VFA量、およびその組成割合(酢酸、プロピオン酸、酪酸)を2章と同様の手法で測定した。LPS活性値は3章と同様の方法で測定した。

(5)乳量・乳成分

乳量は搾乳システム(乳量計付自動離脱装置MMD500, オリオン機械株式会社, 長野県)に付属するデジタル流量計にて測定した。乳汁サンプルの採取および乳成分値(乳脂肪率、乳蛋白質率、SNF率、乳糖率、MUNおよび体細胞数リニアスコア)の測定は3章と同様の方法で実施した。

4. データ解析

すべての統計解析はJMP13.2.1(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いて行い、$p<0.05$を有意差あり、$p<0.10$を差の傾向ありとした。交互作用の検討においては、$p<0.05$を交互作用あり、$p<0.10$を交互作用の傾向ありとした。

(1)受胎群と不受胎群の比較

供試牛はTAIの受胎結果により受胎群と不受胎群の2群に分類した。群と産次を主試験区、週次を副試験区とした分割区法によって試験期間中のDMI、体重、BCS、血液生化学性状、ルーメン液性状および泌乳成績について統計処理を行い、両群の違いを比較した。群間に有意差または差の傾向が認められた項目および、群と週次に有意な交互作用または交互作用の傾向が認められた項目については、週次ごとの分析値の違いを対比により確認し、各群の特性について検討した。

(2)判別式による初回授精の受胎性予測

分娩後1週目の血液生化学値を用いて判別分析を行い、初回授精の受胎性を高い精度で予測可能な判別式を検討した。判別式の作成に当たっては、両群に有意差

または差の傾向が認められた項目、もしくは群と週次の間に有意な交互作用または交互作用の傾向が認められた項目（Ht、Glu、Alb、BUN、NEFA、3-HBおよびPL）を候補変数とし、受胎結果の誤判別率が最も低くなる変数の組み合わせを検討した。

4.3 結果

初回授精における受胎群は19頭（初妊牛8頭、経産牛11頭）、不受胎群は22頭（初妊牛9頭、経産牛13頭）となり、受胎率は46.3％であった。産次別の受胎率は初妊牛が47.1％、経産牛が45.8％となり、差は認められなかった。

1. DMI、体重、BCS

両群の DMI、体重、BCS を表 4.4 に、測定値の経時的変化を図 4.2 に示す。DMI と BCS は両群に差は認められなかった。分娩日を基準とした体重の変動値は両群に有意差が認められ、不受胎群では受胎群に比べて分娩前から分娩日にかけての体重減少が大きい結果となった。

2. 血液生化学値

両群の血液生化学値を表 4.5 に、測定値の経時的変化を図 4.3 に示す。Ht と Alb について群間に有意差が、Glu と NEFA について差の傾向が認められ、いずれの項目も受胎群が高値であった。また、Alb については群と週次に有意な交互作用が、BUN、3-HB および PL については交互作用の傾向が認められた。

Ht と Glu は分娩前から分娩後にかけて、常に受胎群が不受胎群よりも高い値で推移し、Ht は分娩前 2 週、分娩後 1、5 および 8 週で受胎群が有意に高値となり、分娩後 2 週で受胎群が高い傾向であった。Glu は分娩前 1 週、分娩後 5 および 8 週で受胎群が不受胎群に比べて高い傾向であった。Alb と NEFA は分娩前の値は両群でほぼ同じあったが、分娩後は受胎群が不受胎群よりも高い値で推移した。Alb では分娩後 1、2 および 3 週で受胎群が有意に高値となり、NEFA では分娩後 2 週目に受胎群が有意に高値となった。

BUN は分娩後 2 週までは受胎群が高値で推移し、分娩後 1 週で受胎群が有意に高くなったが、3 週目からは不受胎群が高値で推移し、5 週目で不受胎群が高い傾向

となった。

3-HB は、不受胎群は大きな変動なく推移したが、受胎群は分娩後に急激に濃度が上昇し、1 週目と2 週目で受胎群が有意に高値となったが、その後経時的に減少した。

PL は両群ともに分娩後に経時的に濃度が上昇したが、分娩後 8 週目において受胎群が不受胎群に比べ有意に高値となった。

3．ルーメン液性状

両群のルーメン液性状を表 4.6 に、測定値の経時的変化を図 4.4 に示す。pH と総 VFA 量について群間に有意差が認められ、pH は試験期間をとおして受胎群が高く推移し、分娩前 1 週、分娩後 1、2、3、5 および 8 週で受胎群が有意に高値となった。総 VFA 量は試験期間をとおして不受胎群が高く推移し、分娩前 1 週、分娩後 2、3、5 および 8 週で不受胎群が有意に高値となった。VFA 中の酢酸とプロピオン酸の構成割合およびその比には両群に差は認められなかった。

4．泌乳成績

両群の泌乳成績を表 4.7 に、測定値の経時的変化を図 4.5 に示す。両群の乳量に差はなかったが、4％FCM は受胎群が不受胎群に比べて高く（$p<0.05$）、受胎群が不受胎群に比べて分娩後 1 週目に高い傾向を、分娩後 2、3、5 および 8 週目に有意な高値を示した。乳脂肪率は受胎群が高い結果となり（$p<0.05$）、分娩後 1～3 週で不受胎群に比べて有意に高値を示した。乳蛋白質率／乳脂肪率比は受胎群が低い結果であり（$p<0.05$）、分娩後 1 および 2 週目において不受胎群に比べて有意に低値であった。その他の乳成分に差は認められなかった。

5．判別分析

検証した候補変数のうち、もっとも誤判別率が低くなった判別式の変数の組

み合わせと、誤判別率、受胎牛の予測感度および特異度を表 4.8 に示す。Alb、Glu および PL の 3 項目を変数として用いた判別式の誤判別率が 19.5%と最も低くなり、受胎牛の予測感度は 89.5%、特異度は 72.7%となった。得られた判別式を下記に記す。

z＝ 0.0639*Glu＋4.4075*Alb＋0.0080*PL-20.2425

(z < 0 不受胎群、z > 0 受胎群)

4.4 考察

本章の統計分析では、産次を主試験区の要因の一つとして解析を実施した。しかし、産次と群との間に有意な交互作用が認められた項目は少なかったことから、結果の考察にあたっては産次をブロックとして扱った。

ホルスタイン種乳牛は、分娩後早期に黄体活動を再開した牛ほど初回授精や受胎までの日数が短縮し（Darwash *et al*. 1997）、初回授精受胎率が良好である（Kawashima *et al*. 2006）ことが報告されている。卵巣活動の再開は乳牛の栄養状態と関連し（Lucy. 2001）、エネルギーバランスの低下は排卵の遅延を招く（Beam & Butler. 1999; Lucy. 2001）。受胎群と不受胎群の血液生化学値を比較したところ、分娩後 1-3 週目の Alb において、受胎群が不受胎群に比べて有意に高値であった。Rowlands ら（1980）は、受胎までに 4 回以上の授精を要した牛では、3 回未満の授精で受胎した牛に比べて、分娩から分娩後 2 週目までの間の Alb が低かった事を報告している。また、権ら（1985）の研究では、分娩後 1-3 週目の Alb と空胎日数との間に有意な相関が認められるなど、分娩後の Alb は繁殖成績と関連が深い。分娩前の Alb には両群に差は認められなかったが、Alb は中長期的な栄養状態を反映する指標であり（Blowey *et al*. 1973)、同様に栄養状態の指標である Ht と Glu が分娩前から受胎群が高い傾向で推移したことからも、乾乳後期からのエネルギー状態の違いが両群の受胎性の差につながった可能性が考えられる。

本試験では、BCSに差は見られなかった。受胎群の分娩時の体重は不受胎群に比べて大きい傾向であった（$p<0.10$）が、分娩時以外の体重計測日において両群に差は認められなかった。分娩日を起点とした体重の変動を比較すると、不受胎群では分娩1週前から分娩時にかけての体重減少幅が受胎群に比べて有意に大きく、体重変動の面からも分娩前からのエネルギー不足が示唆された。一方で、受胎群では分娩後の体重減少が不受胎群に比べて有意に大きかった。Cavestanyら（2009）は、放牧飼養の乾乳牛に濃厚飼料を補給すると分娩後の初回排卵が早くなったと報告しており、乾乳期

に十分なエネルギーを給与することは、その後の繁殖性の向上にとって重要である。また、Senatoreら（1996）は、分娩時の体重が大きい牛ほど初回排卵までの日数が短くなることを報告しており、その理由をNEBに対して体に蓄えたエネルギーを動員して対応ができるためではないかと推察している。本試験では分娩後の初回排卵までの期間を確認していないが、これらの知見から、乾乳後期における両群の乾乳期の栄養状態の違いと、それに伴う体重変動の傾向の違いが分娩後の卵巣機能の回復に影響をおよぼし、結果として初回授精の受胎性の差につながった可能性が考えられる。

このように、受胎群では、分娩後において体に蓄積されたエネルギーが多く動員され、NEBの改善に寄与した可能性が示された。一方で、体脂肪の動員により引き起こされる脂肪肝は、繁殖性に悪影響をおよぼすことが知られている（Katoh. 2002; Reid *et al*. 1979）。本試験では、分娩後の体重減少の程度を反映し、受胎群において、体脂肪動員の指標であるNEFAが分娩後2週目に、脂肪肝を起因とするケトーシスの指標である3-HBは分娩後1週目と2週目に不受胎群に比べて有意な高値となった。しかし、受胎牛の3-HBは分娩後1週目の1,015 μ mol/Lが最高値であり、3-HBによる潜在性ケトーシスの診断カットポイントとされる1200-1400 μ mol/L（Geishauser *et al*. 1997; LeBlanc *et al*. 2005）を下回った。また、肝障害の指標であるAST、GGTなどの肝酵素やT-BILの値にも差は認められなかった。これらのことから、受胎群では不受胎群よりも多くの体脂肪が動員されたものの、その影響は軽度で、肝機能および初回授精の受胎性に影響をおよぼすものではなかったと考えられる。

HtおよびGluといった栄養状態を示す血液指標に乾乳期から違いが認められた一方、両群のDMIには差は認められなかったことから、不受胎群では受胎群に比べて飼料エネルギーの利用効率が低下していた可能性が考えられる。不受胎群では、ルーメン液中の総VFA濃度が有意に高く、試験期間をとおして受胎群よりも高値で推移しており、pHはそれを反映して不受胎群が常に低値で推移した。ルーメンからのVFAの吸収はルーメン絨毛の発達の程度と関連が深く、濃厚飼料の給与は絨毛の伸長に影響

することが知られており（Grummer. 1995）、分娩前の飼料給与法や飼料摂取量の違いは分娩後の飼料効率に影響する。しかし、本試験では両群の飼料に違いはなく、DMIにも差は認められていない。Sofyanら（2019）は、同一の飼料を給与しても、周産期乳牛のルーメン微生物叢が泌乳能力によって異なることを認めており、飼料効率との関連を示唆している。このことから、本試験においても、受胎牛と不受胎牛のルーメン微生物叢に違いがあり、不受胎群ではVFAを効率的に利用することができなかったことで受胎群に比べて乾乳期からの栄養状態が低く推移した可能性が考えられる。泌乳成績においては、統計的な差は無いものの、受胎群の乳量は不受胎群を常に上回って推移し、4%FCMは、分娩後2週目以降、受胎群が有意な高値で推移した。分娩後の体脂肪動員の程度が受胎群で大きい傾向であったことに加え、受胎群でVFAが効率的に吸収され、結果として乳脂肪生産に利用される酢酸も多く吸収されたことが、両群の違いに反映されたものと考えられる。従って、本試験で両群の受胎性に影響を与えた要因の一つとして、VFA吸収能の個体差による栄養状態の違いが考えられた。

血液指標と各種繁殖指標との関連性を検証した報告は多くある（江口ら. 2005; 権ら. 1985; Patton *et al*. 2007; Rowlands *et al*. 1980）が、多変量解析の手法を用いて人工授精結果を予測した報告は見当たらない。本研究では、分娩後1週目の血液生化学値を用いた判別式により、初回人工授精時の受胎成績の予測を試みた。その結果、Glu、Alb、PLを説明変数とした判別式を用いた場合に、実際の受胎成績に対する誤判別率が19.5%となり、受胎牛の予測感度は89.5%と良好な精度が得られた。判別分析を行った分娩後1週目において、選択された変数のうちAlbには両群に有意差が認められたが、GluとPLに差は認められなかった。しかし、表には示していないが、変数をAlbの1つだけとした場合の判別式の誤判別率は26.8%、受胎牛の予測感度は78.9%と3変数の判別式に比べて精度が低かった。このことから、GluやPL単独では1週目の値に群間差はないものの、Albとともに判別式の変数に加わることで栄養状態の総合的な判定が可能となり、判別式の精度の向上につながったもの考えられる。

4.5 図表

表4.1 供試牛の概要

	全頭平均 (n=41)	初産牛 (n=17)	経産牛 (n=24)
産次	2.0 ± 1.2	1.0 ± 0.0	2.8 ± 1.1
乾乳日数 (日)			61.8 ± 11.3
開始時体重 (kg)	696 ± 68	653 ± 46	725 ± 66
分娩後12週目の平均乳量 (kg)	35.5 ± 5.7	30.9 ± 5.0	38.8 ± 3.6

(平均値 ± 標準偏差)

表4.2　分娩前の飼料構成と飼料成分

	初産牛		経産牛	
	分娩前4週～	分娩前2週～	分娩前4週～	分娩前2週～
給与量 (kg)				
チモシー乾草	3.0	2.0	3.0	3.0
オーツ乾草	3.0	3.0	6.0	5.0
ビートパルプ	3.0	3.0	3.0	3.0
乾乳期用配合飼料	3.0	4.0	3.0	4.0
飼料成分				
DM給与量 (kg/日)	10.6	10.6	13.2	13.2
DM割合 (%)	88.5	88.2	87.8	87.9
TDN (乾物中%)	68.5	70.4	67.8	68.7
CP (乾物中%)	12.0	13.1	10.7	11.9
NDF (乾物中%)	45.7	41.5	48.0	45.3

表4.3 分娩後の飼料構成 (TMR)

構成飼料	(DM中%)
ソルガムサイレージ	9.5
アルファルファ乾草	12.0
フェスク乾草	8.5
スーダン乾草	8.9
ビートパルプ	5.2
トウモロコシ（圧片・粉砕混合）	29.8
圧片大麦	7.5
大豆粕	13.0
綿実	1.3
加熱大豆	0.5
エネルギーサプリメント	2.6
ミネラル・ビタミンプレミックス[1)]	1.1
飼料成分	
DM割合 (%)	51.1
TDN (DM中%)	75.6
CP (DM中%)	15.7
NDF (DM中%)	33.1

1) 炭酸カルシウム：第2リン酸カルシウム：塩：重曹：ビタミン剤
＝1：3：1：3：1 (原物混合比)

表4.4　DMI、体重、BCS

	群		産次		p値					
	受胎群 (n = 19)	不受胎群 (n = 22)	初産牛 (n = 17)	経産牛 (n = 24)	群	産次	群*産次	週次	群*週次	産次*週次
DMI (kg/日)	16.9 ± 0.2	16.5 ± 0.2	15.4 ± 0.2	18.1 ± 0.2	0.1315	<0.0001	0.2612	<0.0001	0.7842	0.0007
体重 (kg)	644.6 ± 12.0	632.0 ± 11.3	603.1 ± 12.6	673.5 ± 10.6	0.4506	<0.0001	0.0785	<0.0001	0.0786	0.5123
体重変動 (kg) [1)]	-17.0 ± 5.1	4.7 ± 4.8	-4.1 ± 5.4	-8.2 ± 4.5	0.0036	0.5630	0.7086	<0.0001	0.0799	0.5147
BCS	3.00 ± 0.05	2.90 ± 0.05	3.02 ± 0.05	2.88 ± 0.04	0.1555	0.0464	0.8110	<0.0001	0.8620	0.5591
BCS変動 [2)]	-0.24 ± 0.03	-0.25 ± 0.03	-0.26 ± 0.03	-0.23 ± 0.02	0.8004	0.3780	0.7048	<0.0001	0.8634	0.5880

1) 分娩日を0とした場合の体重の変動　　(最小二乗平均値 ± 標準誤差)

2) 分娩日を0とした場合のBCSの変動

表4.5　血液生化学値

	群		産次		p値					
	受胎群 (n = 19)	不受胎群 (n = 22)	初産牛 (n = 17)	経産牛 (n = 24)	群	産次	群*産次	週次	群*週次	産次*週次
Ht (%)	28.8 ± 0.4	27.6 ± 0.4	28.7 ± 0.4	27.7 ± 0.3	0.0239	0.0636	0.3674	<0.0001	0.1167	0.1345
Glu (mg/dL)	68.8 ± 1.1	65.8 ± 1.0	69.8 ± 1.1	64.8 ± 0.9	0.0508	0.0015	0.8574	<0.0001	0.7788	<0.0001
TP (g/dL)	6.9 ± 0.1	6.8 ± 0.1	6.6 ± 0.1	7.0 ± 0.1	0.4666	0.0010	0.9615	<0.0001	0.1215	<0.0001
Alb (g/dL)	3.7 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	3.7 ± 0.0	0.0275	0.0010	0.8645	<0.0001	0.0015	0.7190
BUN (mg/dL)	10.1 ± 0.3	9.6 ± 0.3	9.7 ± 0.3	10.0 ± 0.2	0.2038	0.5345	0.6985	<0.0001	0.0758	0.1543
T-Cho (mg/dL)	123.5 ± 5.0	115.1 ± 4.7	115.5 ± 5.2	123.1 ± 4.4	0.2271	0.2717	0.5124	<0.0001	0.1338	<0.0001
IP (mg/dL)	5.4 ± 0.1	5.6 ± 0.1	5.6 ± 0.1	5.4 ± 0.1	0.2867	0.3661	0.8608	0.2686	0.6953	0.9376
Ca (mg/dL)	10.2 ± 0.1	10.2 ± 0.1	10.3 ± 0.1	10.2 ± 0.1	0.9753	0.5211	0.5596	0.0026	0.1081	0.1082
GGT (IU/L)	30.2 ± 2.5	29.0 ± 2.3	26.8 ± 2.6	32.3 ± 2.2	0.7362	0.1156	0.9167	<0.0001	0.2698	0.6360
AST (IU/L)	72.2 ± 2.6	71.9 ± 2.5	70.0 ± 2.7	74.1 ± 2.3	0.9305	0.2503	0.5831	<0.0001	0.9615	0.2006
T-BIL (mg/dL)	0.12 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.00	0.5808	0.2089	0.7811	<0.0001	0.7273	0.5058
TG (mg/dL)	10.0 ± 0.3	10.2 ± 0.3	11.0 ± 0.4	9.2 ± 0.3	0.7587	0.0005	0.4934	<0.0001	0.9663	0.0010
NEFA (mEq/L)	0.27 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.0512	0.8426	0.4243	<0.0001	0.1573	0.9640
3-HB (μmol/L)	719.9 ± 40.6	663.1 ± 39.5	648.1 ± 43.6	734.8 ± 36.1	0.3229	0.1329	0.0555	0.0052	0.0538	0.0834
PL (mg/dL)	132.4 ± 4.4	125.5 ± 4.2	125.9 ± 4.6	132.0 ± 3.9	0.2614	0.3213	0.8125	<0.0001	0.0722	0.0003
IGF-1 (ng/mL)	66.3 ± 3.2	59.4 ± 2.9	69.9 ± 3.3	55.8 ± 2.8	0.1220	0.0024	0.9926	<0.0001	0.3524	0.0754

(最小二乗平均値 ± 標準誤差)

表4.6　ルーメン液性状

	群		産次		p値					
	受胎群 (n = 19)	不受胎群 (n = 22)	初産牛 (n = 17)	経産牛 (n = 24)	群	産次	群*産次	週次	群*週次	産次*週次
pH	6.74 ± 0.04	6.56 ± 0.04	6.58 ± 0.04	6.71 ± 0.04	0.0038	0.0335	0.2372	<0.0001	0.6209	0.0162
NH3-N (mg/dL)	4.9 ± 0.3	5.4 ± 0.3	5.4 ± 0.3	4.9 ± 0.2	0.1912	0.1506	0.1562	<0.0001	0.2056	0.2135
総VFA量 (mmol/L)	111.9 ± 3.4	124.3 ± 3.2	123.6 ± 3.5	112.6 ± 3.0	0.0111	0.0224	0.9504	<0.0001	0.4223	0.9924
VFAモル比 (%)										
酢酸	64.1 ± 0.6	62.9 ± 0.6	64.1 ± 0.7	62.9 ± 0.6	0.1891	0.1497	0.2021	<0.0001	0.3702	0.6604
プロピオン酸	21.2 ± 0.6	22.2 ± 0.6	21.2 ± 0.6	22.2 ± 0.5	0.2405	0.2475	0.0970	<0.0001	0.6089	0.7096
酪酸	12.5 ± 0.2	12.7 ± 0.2	12.6 ± 0.2	12.7 ± 0.2	0.5396	0.5895	0.3108	0.0137	0.0521	0.0098
酢酸/プロピオン酸比	3.17 ± 0.09	3.01 ± 0.09	3.16 ± 0.10	3.02 ± 0.08	0.2258	0.2849	0.1038	<0.0001	0.5178	0.6304
LPS (EU/ml)	9790 ± 1761	5690 ± 1679	7149 ± 1866	8331 ± 1559	0.1006	0.6297	0.3517	<0.0001	0.7996	0.8572

(最小二乗平均値 ± 標準誤差)

表4.7　泌乳成績

	群		産次		p値					
	受胎群 (n = 19)	不受胎群 (n = 22)	初産牛 (n = 17)	経産牛 (n = 24)	群	産次	群*産次	週次	群*週次	産次*週次
乳量 (kg)	35.9 ± 1.0	33.8 ± 0.9	31.0 ± 1.0	38.8 ± 0.9	0.1240	<0.0001	0.2497	<0.0001	0.4018	0.0320
4%FCM（kg）	37.7 ± 1.0	33.7 ± 0.9	31.7 ± 1.0	39.6 ± 0.8	0.0035	0.0001	0.4122	0.0001	0.5983	0.1833
乳脂率 (%)	4.40 ± 0.09	4.01 ± 0.08	4.20 ± 0.09	4.21 ± 0.08	0.0039	0.9160	0.5950	<0.0001	0.2561	0.8670
SNF率 (%)	8.68 ± 0.06	8.61 ± 0.05	8.68 ± 0.06	8.61 ± 0.05	0.4036	0.4214	0.3479	<0.0001	0.3331	0.2760
乳蛋白質率 (%)	3.15 ± 0.05	3.13 ± 0.04	3.12 ± 0.05	3.16 ± 0.04	0.7445	0.5839	0.8189	<0.0001	0.9233	0.7371
乳蛋白質率/乳脂率比	0.73 ± 0.02	0.79 ± 0.02	0.76 ± 0.02	0.76 ± 0.02	0.0137	0.7302	0.7259	0.2983	0.5364	0.9639
乳糖率 (%)	4.53 ± 0.03	4.50 ± 0.03	4.56 ± 0.04	4.48 ± 0.03	0.5630	0.0977	0.0189	<0.0001	0.6210	0.8528
MUN (mg/dL)	11.5 ± 0.3	11.7 ± 0.3	11.6 ± 0.3	11.6 ± 0.2	0.7660	0.8680	0.5983	<0.0001	0.2517	0.0233
体細胞数 (万個/ml)	20.1 ± 8.0	22.0 ± 7.5	14.9 ± 8.4	27.3 ± 7.1	0.8612	0.2642	0.3527	0.2287	0.4762	0.1060
体細胞数リニアスコア	2.34 ± 0.39	2.42 ± 0.36	2.72 ± 0.41	2.04 ± 0.34	0.8742	0.2121	0.3122	0.0024	0.2265	0.2850

(最小二乗平均値 ± 標準誤差)

表 4.8　分娩後1週の血液生化学値を用いた判別式の誤判別率、感度および特異度

判別式の変数	誤判別率[1)] (%)	感度[2)] (%)	特異度[3)] (%)
Alb, Glu, PL	19.5	89.5	72.7

1) 判別式の予測と異なる結果を示した牛の割合

2) 受胎群のうち、判別式により受胎を予測された牛の割合

3) 不受胎群のうち、判別式により不受胎と予測された牛の割合

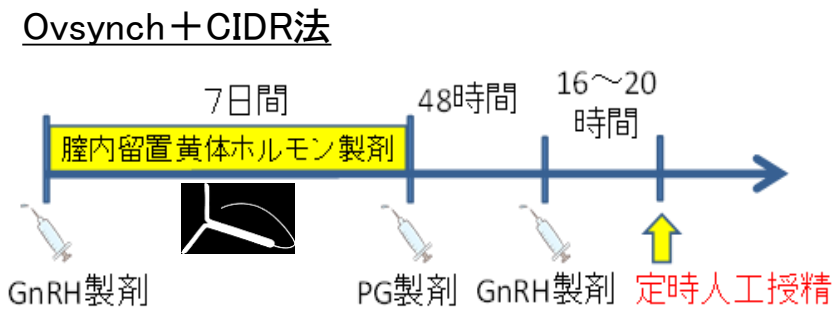


図 4.1　排卵同期化・定時人工授精法のプロトコール

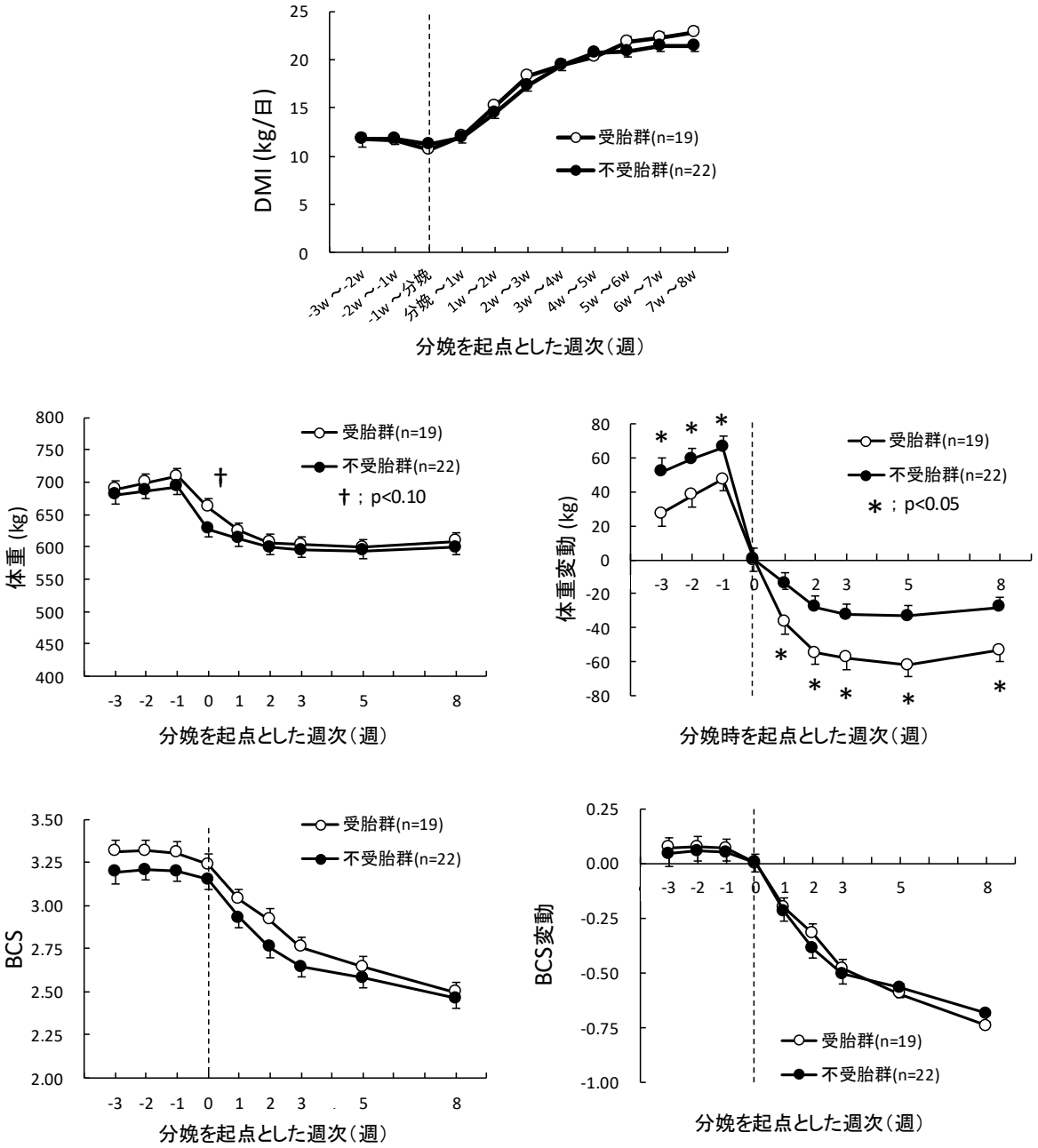


図 4.2　DMI、体重、BCS の経時的変化

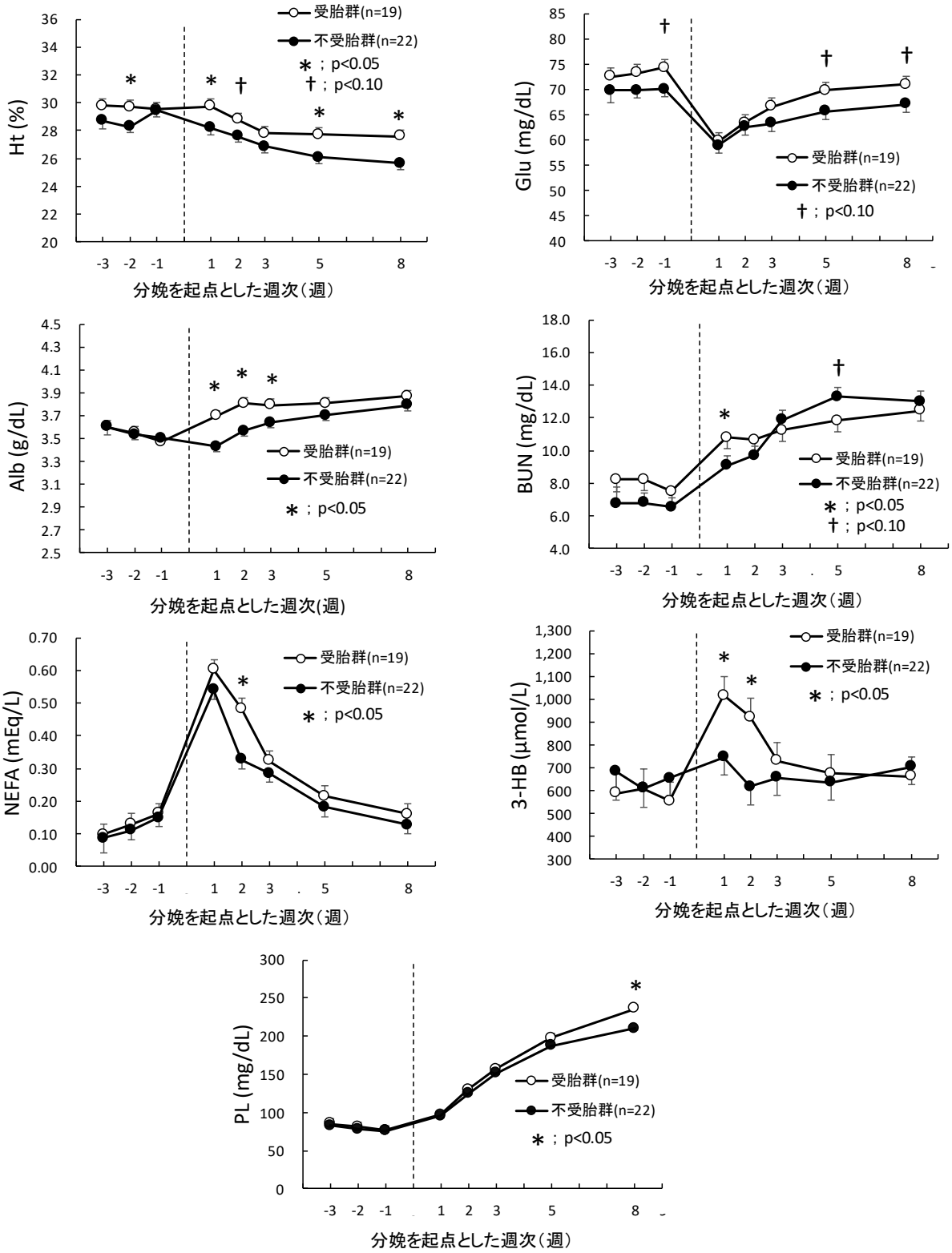


図 4.3　血液生化学成分の経時的変化

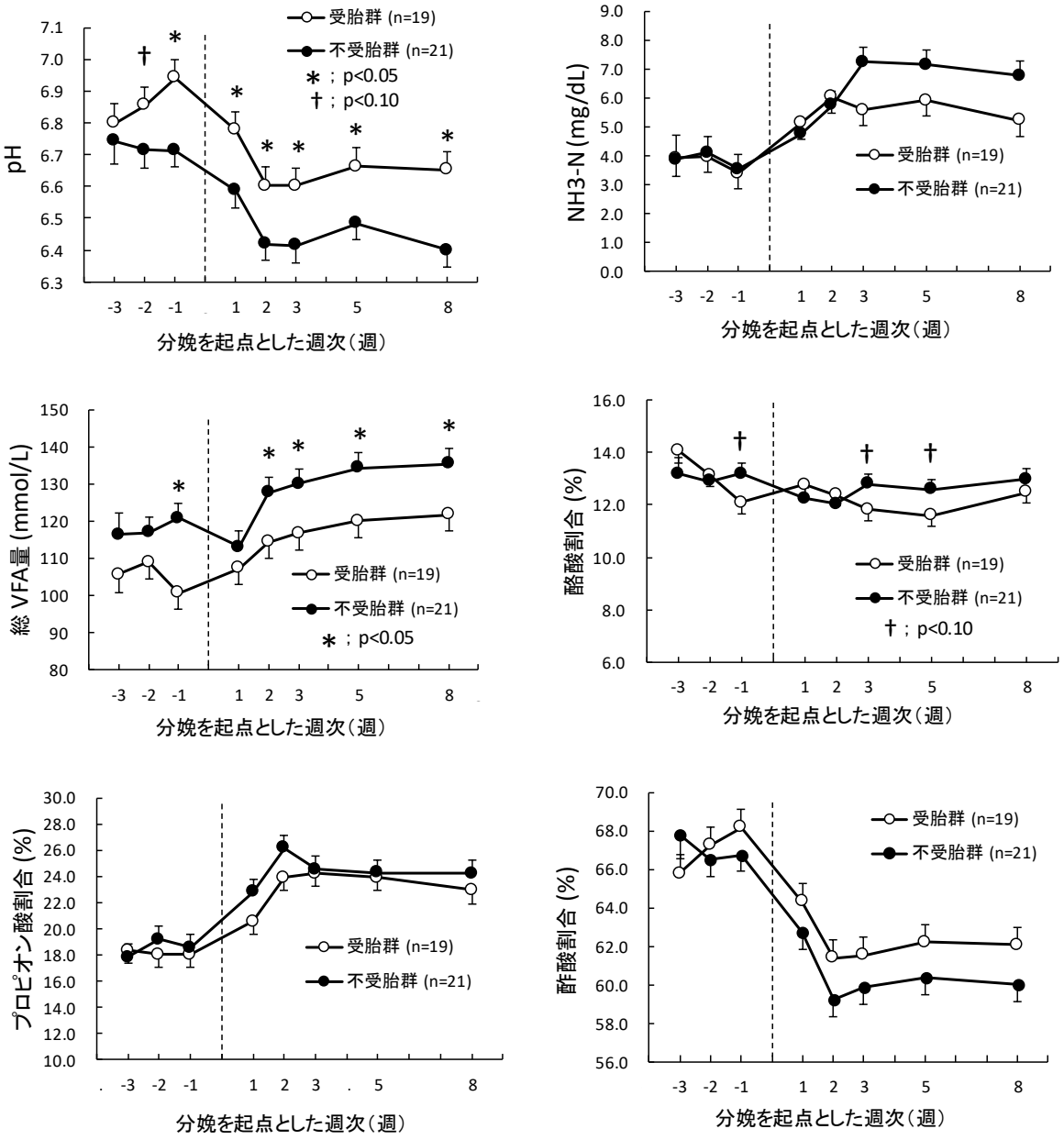


図 4.4 ルーメン液性状の経時的変化

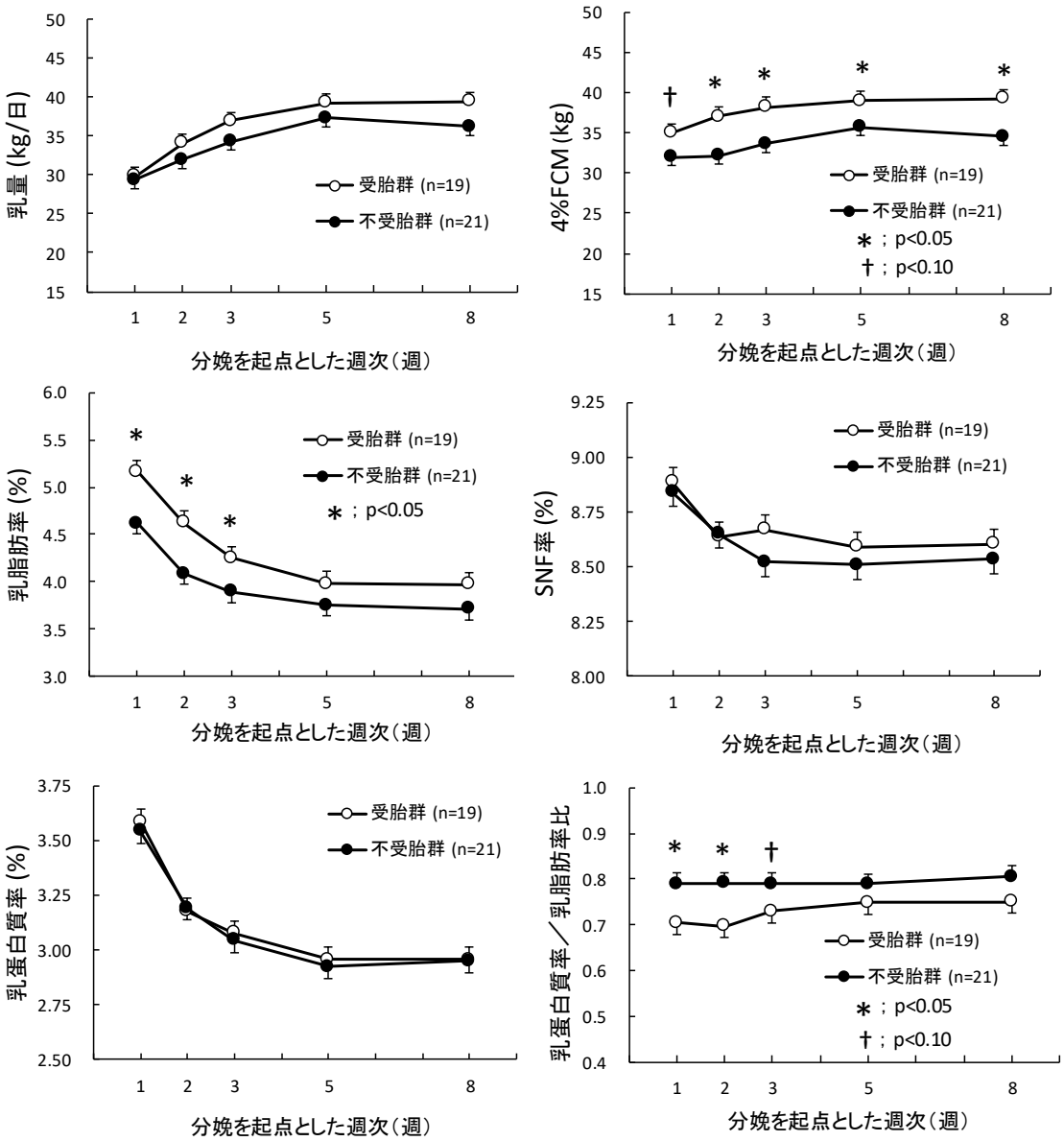


図 4.5　泌乳成績の経時的変化

5 章　総括

酪農経営の収支向上のためには、高い生産性と長命性を両立させていくことが求められる。近年の遺伝的改良によりホルスタイン種乳牛の乳量は大幅に向上したが、それに伴う分娩後の NEB の期間と程度の増大は、多くの弊害を生じている（Esposito *et al.* 2014）。NEB が引き起こす周産期疾病の増加（Herdt. 2000; Andela *et al.* 2019）や繁殖性の低下（Butler & Smith. 1989; Staples *et al.* 1990）は、生産性を低下させるとともに、生産寿命の短縮にもつながり、酪農家の経営に多大な悪影響をもたらしている。国内では、乳房炎を除く疾病とへい死による除籍は平成元年から平成 30 年までの間に約 20%増加しており、平均分娩間隔は 28 日延長し 433 日にまで広がっている。これらの影響により、平成 30 年における検定牛の平均産次は 2.6 産と低くなっている（一般社団法人家畜改良事業団. 2019）。

NEB の軽減を目的とした飼養試験は広く実施されている。例として、乾乳後期における高エネルギー飼料の給与（Rabelo *et al.* 2003; McNamara *et al.* 2003）や、乾乳前期における給与飼料の栄養水準を要求量の 80%に抑えることで（Dann *et al.* 2006）、分娩後の DMI が向上することが報告されている。これらの知見を飼養現場において実践することは、周産期疾病の発生の減少や繁殖性の向上につながると考えられる。

しかし、飼養管理の改善を行ってもなお、全ての疾病の発生をなくす事は難しい。さらなる疾病発生の低減のためには、個体毎に周産期疾病の発生リスクを評価し、予防手段を講じることが重要である。疾病リスクの予測について、分娩 1 週前の Ca 値が 9.6mg/dL 以下の経産牛は分娩後の潜在性低カルシウム血症のリスクが 1.4 倍高くなる（Neves *et al.* 2017）ことや、分娩前 T-Cho 濃度が低い牛は分娩後にケトーシスに罹患しやすい（Akamatsu *et al.* 2007）ことなどが報告されている。これらの報告では、単一の血液成分値と特定の疾病リスクとの関連を示している。しかし、第四胃変位の発生牛の 72%に肝臓への脂肪浸潤が認められること（Taguchi. 1992）、潜在性低カルシウム血症牛では血中の NEFA と 3-HB が正常牛に比べて高値であり、ケトーシスの傾向が認め

られること（Martinez *et al.* 2012）など、周産期疾病は相互に関連する事が知られている。このことから、疾病を特定せず、周産期疾病リスクを総合的に予測可能な手法があれば、リスク牛の重点管理により、広く周産期疾病の予防ができる可能性がある。人医学の分野では、疾病に関連する複数の項目を変数に用いて診断を行う多変量解析の手法が広く利用されており、優れた診断精度を上げている（望月ら. 1993; 佐々木ら. 1996）。周産期疾病の総合的なリスク評価を行うにあたっても、種々の疾病に関連する多くの要因を結びつけて解析が可能な多変量解析の手法が有用と考えられる。

また、実際に周産期疾病を発症した牛に対しては、速やかな診断と対処を行う事で、疾病の影響を最小限にとどめることが可能になる。本研究では、他の周産期疾病とも関わりが深く（Katoh. 2002）、確定診断は肝生検のみによるとされている（Bobe *et al.* 2004）脂肪肝を取り上げ、間接診断を試みた。ホルスタイン種の繁殖管理については、分娩後の授精待機日数や性ホルモン治療の利用方針の違いなど、農家毎に多様な戦略が取られている。そのような中で、分娩牛の繁殖性を早期に評価する指標があれば、農場毎の基本の繁殖管理方針に加え、評価結果に基づいた個体別のアプローチが可能となり、繁殖成績の向上につながる可能性がある。本研究では、繁殖性を評価するうえで重要な指標である初回授精受胎率の改善を念頭におき、分娩後早期の血液成分値を用いた初回授精時の受胎性診断を試みた。脂肪肝の診断と初回授精の受胎性診断についても、多くの要因を総合的に解析することによる精度の向上を目的として、判別式による牛群の分類を試みた。

第 2 章では、多変量解析の手法を用いて、周産期疾病の総合的なリスクを評価するための指標を検討した。まず、分娩後 1 週目において、13 の血液成分値を用いたクラスター解析を実施した。クラスター解析の結果から供試牛を 2 グループに分けて両者の特性を比較したところ、一方のグループで 3-HB の高値と Ca の低値が認められ、潜在性ケトーシスおよび潜在性低カルシウム血症の傾向が同時に認められた。両者の関連性は過去にも報告がある（Martinez *et al*. 2012; Ribeiro *et al*. 2013）。さらに潜在性カ

ルシウム血症は胎盤停滞（Curtis. 1983）や第四胃変位（Massey. 1993）との関連が、潜在性ケトーシスは脂肪肝（Oikawa *et al.* 1997; Shaw. 1956）や第四胃変位（McArt. 2012A）などの疾病との関連が報告されていることから、両疾病の傾向を同時に見いだせたことは、他の周産期疾病のリスク管理にもつなげられる可能性がある。従来のリスク評価は、第四胃変異や子宮内膜炎など、特定の疾病を対象に実施されてきた（Cameron *et al.* 1998; Chapinal *et al.* 2011; Martinez *et al.* 2012）が、本試験で実施したクラスター解析は、疾病を限定せずに周産期の疾病リスクを総合的に評価する新たな手法として利用できる可能性が示された。これまでに乳牛の総合的な疾病リスク評価にクラスター解析を利用した報告は見当たらず、本試験で得られた結果は新たな知見である。

さらに、分娩後 1 週目の IP、Ca、PL または IP、Ca、T-Cho を変数に用いた判別式によってもクラスター解析と同様のグループ分けが可能であり、少ない変数で周産期リスクを評価できる可能性が示された。また、得られた判別式に分娩前の血液成分値を適用したところ、クラスター解析によるグループ分けに対して良好な誤判別率が得られた。過去に分娩前の T-Cho および Ca の単一の血液成分値により分娩後のケトーシスおよび低カルシウム血症のリスクを評価した報告（Neves *et al.* 2017; Akamatsu *et al.* 2007）があるが、本試験では分娩前の T-Cho の値にグループ間の差は無く、Ca には差が認められたものの、過去の報告の基準では、いずれのグループも潜在性低カルシウムのリスク群に分類される値であった。このことは、カルシウム代謝（Ca、IP）と栄養代謝や飼料摂取量（T-Cho、PL、IP）に関連する指標（Payne *et al.* 1970; Payne & Payne 1987; Reist *et al.* 2002）を変数として組み合わせた判別式を用いることで、単一の指標値によっては分娩後のリスク評価が困難であった牛においても、周産期疾病リスクの総合的な評価ができる可能性を示した結果である。

3 章においては、周産期疾病のなかでも、他の周産期疾病との関わりが多く報告されていながらも（Katoh. 2002）、酪農現場において確定診断をすることが困難な疾病で

ある脂肪肝について、発症に関連する因子の検討と、判別式による間接診断および発症予測を試みた。脂肪肝牛では分娩後 1 週目に NEFA、3-HB、AST および ALT の有意な高値が認められ、過去の報告と一致する所見であった（Farid *et al*. 2013; Kalaitzakis *et al*. 2007; 扇ら. 1991; Schäff *et al*. 2013）。分娩前の過肥は脂肪肝発症のリスク指標として知られ、分娩前の BCS が 3.75-4.00 以上の牛でリスクが高いとされている（山岸ら. 2004; 植松ら. 2003）。本試験では分娩 3 週前の BCS で脂肪肝群が有意な高値を示したが、その値は 3.34 と、これらの知見にくらべて低値であり、乾乳期の BCS が 3.5 未満の牛であっても、BCS が高いほど脂肪肝のリスクが高くなることを示唆する結果であった。血液性状では、分娩前の全ての週次において、Alb および IGF-1 が脂肪肝牛で有意な高値を示しており、過肥の要因となる泌乳後期から乾乳に前期にいたるエネルギー摂取過剰の指標として、これらの項目の測定が有用である可能性が示された。

脂肪肝の間接診断や発症予測については過去にも複数報告がある（Farid *et al*. 2013; Haudum *et al*. 2011; 芝野ら. 2005）。しかし、これらの報告には、軽度の脂肪肝における判別精度が十分でない（Haudum *et al*. 2011）、脂肪肝の診断が臨床検査のみに基づいている（芝野ら. 2005）、精度は高いものの、と畜場検査に基づいた診断のため臨床的に重度の脂肪肝のみが選抜された可能性がある（Farid *et al*. 2013）といった点があることから、肝生検に基づいて確定診断された脂肪肝を高い精度で判別可能な間接診断法が求められる。

血液生化学値を用いた判別式による脂肪肝の診断および発症予測は、2 章で得られた周産期疾病リスク評価が可能な判別式の変数に、3 章で脂肪肝牛と正常群に差がみられた指標を加えた新たな判別式を作成し、その精度を検証した。その結果、分娩後 1 週において、IP、Ca、PL および 3HB の 4 変数を用いた判別式により、10.8%と良好な誤判別率が得られ、脂肪肝の診断感度は 100%となった。このことから、周産期リスクの総合評価指標に疾病特有の指標を組み合わせることで、個別疾病を高い精度

で診断できる可能性が示された。

さらに 3 章では、一般的な泌乳成績（乳量、4%FCM、乳脂肪率、乳蛋白質率、SNF 率）に個別脂肪酸の C18:1 を加えた判別式により脂肪肝診断を試みたところ、8.1%と良好な誤判別率が得られた。過去に、肝生検により確定診断した脂肪肝に対して、乳中脂肪酸組成を用いた判別式による診断精度を検証した報告は見当たらず、本研究で初めて得られた知見である。乳中脂肪酸組成は赤外分光法により生乳検査装置での測定も可能であることから（Soyeurt *et al.* 2006）、本判別式の利用は、採血や分析の労力負担の軽減となり、速やかな脂肪肝診断につながることが期待される。

乳牛の分娩間隔の延長の大きな要因の一つとして、初回人工授精率の低下があげられる。一般社団法人家畜改良事業団のホームページによると、初回人工授精率は平成元年の 62.4%から平成 29 年には 41.6%まで低下している。そこで第 4 章では、分娩後の初回人工授精における受胎群と不受胎群について、周産期の各種成績を比較し、受胎に影響する要因を総合的に考察した。そのうえで、分娩後 1 週目の血液生化学値を用いた判別分析により、初回授精における受胎性を分娩後早期に判別することを試みた。

乳牛の周産期の飼養管理や栄養状態の違いは、種々の周産期疾病の発生に加え、繁殖成績にも大きな影響を与える。周産期のエネルギーバランスの悪化は分娩後の初回排卵の遅延を招くことが知られている（Beam & Butler. 1999; Lucy. 2001）。分娩後の黄体活動再開の遅延は、初回授精日数を遅らせ（Darwash *et al.* 1997）、初回授精受胎率を低下させる（Kawashima *et al.* 2006）ことから、周産期のエネルギー状態を良好に保つことは、繁殖成績を向上させる上で重要である。本研究では、受胎群と不受胎群の血液性状の比較において、栄養状態の指標となる Ht、Glu、Alb に有意差や差の傾向が認められた。特に Alb では、分娩後 1～3 週に受胎群が不受胎群に比べて有意に高値となった。Rowland ら（1980）は受胎に要した授精回数が多い牛では分娩後 2 週目までの Alb が低い事を、権ら（1985）は分娩後 1～3 週の Alb と空胎

日数との間に相関があることを報告しているが、分娩後の Alb 濃度は初回授精の受胎性に対しても影響を与えることが示された。本研究では両群の DMI には差が無かったが、ルーメン液性状において、総 VFA 濃度が不受胎群で高く推移しており、VFA 利用効率の違いが受胎群と不受胎群の栄養状態の差につながった可能性が考えられた。本試験で認められた両群のルーメン液性状の違いは主に個体差によるものと考えられるが、良好な繁殖成績を達成するために、周産期管理におけるルーメン機能の健全性の維持が重要であることが示された。

判別分析により初回授精時の受胎結果の予測を試みたところ、Glu、Alb、PL を変数に用いた判別式により誤判別率が 19.5%、受胎牛の予測感度が 89.5%と良好な精度が得られた。江口ら（2005）は、初回授精遅延牛における分娩後の高 NEFA と低 Ca ならびに、空胎日数延長牛における分娩前の低 Glu と分娩後の高 NEFA および低 T-Cho を報告している。また、Patton ら（2007）は初回授精時の BCS が低値の牛では受胎率が低くなることを、Butler ら（1996）は人工授精日の BUN が 19mg/dL を上回る牛では妊娠の割合が低いことを報告している。しかし、これまでに分娩後早期の時点において、多変量解析の手法を用いて初回人工授精の受胎結果を予測した報告はなく、分娩牛の繁殖性を予測する新たな手法を提示することができた。

本試験では、初回授精日を分娩後74～80日にそろえ、TAIによる初回授精を実施した。過去の研究では、栄養状態が初回授精日数や初回授精受胎率に影響を及ぼすことが報告されている（Senatore *et al.* 1996）が、本研究では、人為的に初回授精日を調整した際の受胎性においても同様に、周産期の栄養状態が重要であることが示された。初回授精にTAIを用いている農場においては、本試験で得られた判別式で受胎性が高いと判定された牛に対してTAIを実施することで、より効率的な繁殖管理を行える可能性がある。今後は、TAIを実施する分娩後日数の違いが判別率に与える影響や、自然発情の発見に基づいて初回授精を行う場合における判別式の適用性などについて検証を行っていく必要がある。

本研究において、各章で得られた判別式は、いずれも良好な精度で牛群の特性を分類できることを示した。データには示していないが、各章で得られた判別式の変数は、いずれも個々の項目のみによる牛群の分類精度は低い結果であった。このことから、多変量解析の手法は、周産期牛の様々な特性を分類する上で、従来の単一指標のみを用いた分類では評価や診断が難しかった牛に対しても、有用な手法であることが示された。2～4 章で得られた血液成分値を変数に用いた判別式には、いずれも栄養状態や飼料摂取量を反映する項目が含まれており、周産期疾病の発生と繁殖性に影響する共通した要因として、周産期の栄養状態が重要であることがあらためて示された。

3 章での脂肪肝診断においては、乳中脂肪酸組成を含む泌乳成績を用いた判別式により、高い精度で脂肪肝の診断が可能であった。2 章および 4 章の試験においては乳中脂肪酸組成を分析していないが、乳中脂肪酸組成は飼料摂取量や体脂肪動員を反映して変動する（Lerch *et al*. 2015; Moate *et al*. 2008; Woolpert *et al*. 2017）ことが知られており、栄養状態とも関係が深い。このことから、脂肪酸組成を利用した判別式は、脂肪肝だけでなく他の疾病のリスクや繁殖性の評価にも活用できる可能性がある。乳量および乳汁検体から得られる指標のみでこれらの評価が可能になれば、酪農業への貢献は非常に大きいと考えられる。

本研究では、いずれの試験においても、単一の牛群における測定データを用いて判別式を作成している。今後、より多くの牛や農場を対象とした研究を行うことで、クラスター解析や判別式の汎用性について検証を行うとともに、さらなる精度の向上を図っていくことが重要である。2 章においてはクラスター解析の樹形図を元に供試牛を 2 群に分類したが、人医学の分野では、臨床評価や血中成分を用いたクラスター解析により、気管支喘息患者を病理学的な機序別に 4 つの亜型に分類した報告もある（Youroukova *et al*. 2017）。より多くの供試牛を用いたクラスター解析を行うことで、周産期牛のリスクを細分化して評価ができる可能性がある。

本研究では、異なる特性をもつ 2 群を分類する手法として判別分析を用いた。判別

式により牛群を 2 群に分類することで、その結果から群毎の対応方針を明確に決定できる利点があると考えられる。一方で、同様に多変量解析によりデータを分類する手法として、ロジスティック回帰分析が用いられている（Farid *et al*. 2013）。ロジスティック回帰分析は、ある事象が発生する確率を予測する解析手法であることから、牛の特性の把握に用いる際には、解析を目的とする事象の発生確率に応じて、個体別に対応方針を決定することで、より細やかなリスク管理や治療を行える可能性がある。目的とする疾病や特性毎に、または個々の農場の牛群管理体系によって多変量解析の手法を使い分けることで、より実用的な解析を行える可能性がある。

今後は、多変量解析による牛群の特性の分類にとどまらず、各特性を持つ牛に対して、リスクの低減や、疾病治療および繁殖性の改善に有効な栄養管理や予防的措置、治療法および繁殖管理方法について研究を実施し、提示していく必要があると考える。周産期において特に重点的な管理が必要な牛を早期に予測・診断し適切な対応を行うことは、生産性の向上に加え、淘汰リスクの低減と繁殖性の向上による生産寿命の延長をもたらし、酪農家の利益向上に大きく貢献する。

引用文献

Akamatsu, H., Saitoh, Y., Serizawa, M., Miyake, K., Ohba, Y., Nakashima, K. (2007). Changes of serum 3-methylhistidine concentration and energy-associated metabolites in dairy cows with ketosis. Journal of Veterinary Medical Science, 69, 1091-1093.

Allbrahim, R. M., Crowe, M. A., Duffy, P., O'Grady, L., Beltman, M. E., Mulligan, F. J. (2010). The effect of body condition score at calving and supplementation with saccharomyces cerevisiae on energy status and some reproductive parameters in early lactation dairy cows. Animal Reproduction Science, 121, 63-71.

Allen, W. M. & Davies, D. C. (1981). Milk fever, hypomagnesaemia and the 'downer cow' syndrome. The British Veterinary Journal, 137, 435-441.

Andela, B. G., Van, Eerdenburg, F. J. C. M., Choukeir, A., Buják, D., Szelényi, Z., Boldizsár, S., Kézér, F. L., Molnár, L., Kovács, L., Szenci, O. (2019). Relationships among some serum enzymes, negative energy balance parameters, parity and postparturient clinical (endo) metritis in Holstein Friesian cows - Short communication. Acta Veterinaria Hungarica, 67, 241-245.

Anderson, L. (1988). Subclinical ketosis in dairy cows. Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice, 4, 233-251.

AOAC. (2000). Official Method of Analysis of AOAC International, 17th edition. AOAC International, Gaithersburg, MD.

Bach, K. D., Barbano, D.M., McArt, J. A. A. (2019). Association of mid-infrared-predicted milk and blood constituents with early-lactation disease, removal, and

production outcomes in Holstein cows. Journal of Dairy Science, 102, 10129-10139.

Beam, S. W. & Butler, W. R. (1999). Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. Journals of Reproduction and Fertility, Supplement, 54, 411-424.

Bell, A.W. (1979). Lipid metabolism in liver and selected tissues and in the whole body of ruminant animals. Progress in Lipid Research, 18, 117-164.

Bjerre-Harpøth, V., Storm, A, C., Eslamizad, M., Kuhla, B., Larsen, M. (2015). Effect of propylene glycol on adipose tissue mobilization in postpartum over-conditioned Holstein cows. Journal of dairy science, 98, 8581-8596.

Blowey, R. W., Wood, D. W., Davis, J. R. (1973). A nutritional monitoring system for dairy herds based on blood glucose, urea and albumin levels. The Veterinary record, 92, 691-696.

Bobe, G., Ametaj, B.N., Young, J.W., Anderson, L.L., Beitz, D.C. (2007). Exogenous glucagon effects on health and reproductive performance of lactating dairy cows with mild fatty liver. Animal Reproduction Science, 102, 194-207.

Bobe, G., Young, J.W., Beitz, D.C. (2004). Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. Journal of Dairy Science, 87, 3105-3124.

Brumby, P. E., Anderson, M., Tuckley, B., Storry, J. E. and Hibbitt, K. G. (1975). Lipid metabolism in the cow during starvation-induced ketosis. The Biochemical Journal, 146, 609-615.

Butler, W.R., Calaman, J.J., Beam, S.W. (1996). Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. Journal of Animal Science, 74, 858-865.

Butler, W. R. & Smith, R. D. (1989). Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. Journal of dairy science, 72, 767-783.

Caixeta, L. S., Ospina, P. A., Capel, M.B., Nydam, D. V. (2015). The association of subclinical hypocalcemia, negative energy balance and disease with bodyweight change during the first 30 days post-partum in dairy cows milked with automatic milking systems. The Veterinary Journal, 204, 150–156.

Caixeta, L.S., Ospina, P.A., Capel, M.B., Nydam, D.V. (2017). Association between subclinical hypocalcemia in the first 3 days of lactation and reproductive performance of dairy cows. Theriogenology, 94, 1-7.

Cameron, R.E.B., Dyk, P. B., Herdt, T. H., Kaneene, J. B., Miller, R., Bucholtz, H. F., *et al*. (1998). Dry cow diet, management, and energy balance as risk factors for displaced abomasum in high producing dairy herds. Journal of Dairy Science, 81, 132-139.

Cavestany, D., Kulcsar, M., Crespi, D., Chilliard, Y., La Manna, A., Balogh, O., Keresztes, M., Delavaud, C., Huszenicza, G., Meikle, A. (2009). Effect of prepartum energetic supplementation on productive and reproductive characteristics, and metabolic and hormonal profiles in dairy cows under grazing conditions. Reproduction in Domestic Animals, 44, 663-671.

Chamberlin, W.G., Middleton, J.R., Spain, J.N., Johnson, G.C., Ellersieck, M.R., Pithua, P. (2013). Subclinical hypocalcemia, plasma biochemical parameters, lipid metabolism, postpartum disease, and fertility in postparturient dairy cows. Journal of Dairy Science, 96, 7001-7013.

Chapinal, N., Carson, M., Duffield, T. F., Capel, M., Godden, S., Overton, M., Santos, J.E., LeBlanc, S.J. (2011). The association of serum metabolites with clinical

disease during the transition period. Journal of Dairy Science, 94, 4897-4903.

Cozzi, G., Ravarotto, L., Gottardo, F., Stefani, A. L., Contiero, B., Moro, L., Brscic, M., Dalvit, P. (2011). Short communication: Reference values for blood parameters in holstein dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production. Journal of Dairy Science, 94, 3895–3901.

Curtis CR, Erb HN, Sniffen CJ, Smith RD, Powers PA, Smith MC, White ME, Hillman RB, Pearson EJ. (1983). Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows. Journal of the American Veterinary Medical Association, 183, 559-561.

Dann, H.M., Litherland, N.B., Underwood, J.P., Bionaz, M., D'Angelo, A., McFadden, J.W., Drackley, J.K. (2006). Diets during far-off and close-up dry periods affect periparturient metabolism and lactation in multiparous cows. Journal of Dairy Science, 89, 3563-77.

Darwash, A. O., Lamming, G. E., Woolliams, J.A. (1997). The phenotypic association between the interval to post-partum ovulation and traditional measures of fertility in dairy cattle. Animal Science, 65, 9-16.

Deluyker, H.A., Gay, J.M., Weaver, L.D., Azari, A.S. (1991). Change of milk yield with clinical diseases for a high producing dairy herd. Journal of Dairy Science, 74, 436–45.

Detilleux, J.C., Gröhn, Y.T., Eicker, S.W., Quaas, R.L. (1997). Effects of left displaced abomasum on test day milk yields of Holstein cows. Journal of Dairy Science, 80, 121-126.

Dohoo, I. R., & Martin, S.W. (1984). Subclinical Ketosis: Prevalence and associations with production and disease. Canadian Journal of Comparative Medicine, 48, 1–5.

Duffield, T. (2000). Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice, 16, 231-253.

Duffield, T. F., Lissemore, K. D., McBride, B. W., Leslie, K. E. (2009). Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. Journal of Dairy Science, 92, 571–580.

江口理香，山岸則夫，李仁炯，大星健治，高木光博，中川昭. (2005). 乳牛の移行期における臨床検査成績とその後の繁殖成績との関係．日本家畜臨床学会誌，28, 34-41.

Esposito G, Irons PC, Webb EC, Chapwanya A. (2014). Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. Animal Reproduction Science, 30, 144, 60-71.

Farid, A. S., Honkawa, K., Fath, E. M., Nonaka, N., Horii, Y. (2013). Serum paraoxonase-1 as biomarker for improved diagnosis of fatty liver in dairy cows. BMC veterinary research, 9, 73.

Ferguson, J. D., Galligan, D. T., Thomsen, N. (1994). Principal descriptors of body condition score in holstein cows. Journal of Dairy Science, 77, 2695–2703.

Fraga, A.B., de Lima Silva, F., Hongyu, K., Da Silva Santos, D., Murphy, T.W., Lopes, F.B. (2016). Multivariate analysis to evaluate genetic groups and production traits of crossbred Holstein × Zebu cows. Tropical Animal Health and Production, 48, 533–538.

Geishauser, T., Leslie, K., Duffield, T., Edge, V. (1997). An evaluation of milk ketone tests for the prediction of left displaced abomasum in dairy cows. Journal of Dairy Science, 80, 3188–3192.

Goff, J. P. (2008). The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. The Veterinary Journal, 176, 50–57.

Gohary, K., Overton, M.W., Von Massow, M., LeBlanc, S.J., Lissemore, K.D., Duffield, T. F. (2016). The cost of a case of subclinical ketosis in Canadian dairy herds. The Canadian Veterinary Journal, 57, 728-732.

Goselink, R. M. A., Schonewille, J. T., van Duinkerken, G. and Hendriks, W. H. (2020). Physical exercise prepartum to support metabolic adaptation in the transition period of dairy cattle: A proof of concept. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 104, 790-801.

Grummer, R. R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. Journal of Animal Science, 73, 2820-2833.

Haudum, A., Starke, A., Beyerbach, M., Wohlsein, P., Rehage, J. (2011). Ultrasonographic assessment of liver dimensions in dairy cows with different hepatic triacylglycerol content. Journal of Animal Science, 89, 1392-1400.

Herdt, T. H. (2000). Ruminant adaptation to negative energy balance. Influence on the etiology of ketosis and fatty liver. The Veterinary clinics of North America. Food Animal Practice, 16, 215-230.

Hirabayashi, H., Kawashima, K., Okimura, T., Tateno, A., Suzuki, A., Asakuma, S., Isobe, N., Obitsu, T., Sugino, T., Kushibiki, S. (2017). Effect of nutrient levels during the far-off period on postpartum productivity in dairy cows. Animal Science Journal, 88, 1162-1170.

廣田滋.(1999). 臨床医学における多変量解析の応用 -判別分析を中心として-. 国立医療学会誌, 53, 380-386.

Holtenius, P. & Niskanen, R. (1985). Leberzellverfettung bei Kuehen mit labmagenverlagerung. Dtsch. Tieraarztl. Wochenschr, 92, 398-400.

福島宜彦, 白石徹, 増田達明. (2018). 乳牛における分娩後の子宮内環境改善を目的としたプロスタグランディン F2α(PGF2α)製剤2回投与. 愛知県農総試研報,

50, 87-90.

Ibănescu, I., Leiding, C., Bollwein, H. (2018). Cluster analysis reveals seasonal variation of sperm subpopulations in extended boar semen. Journal of Reproduction and Development, 64, 33–39.

Inabu, Y., Murayama, K., Inouchi, K., Sugino, T. (2019). The effect of tributyrin supplementation to milk replacer on plasma glucagon-like peptide 2 concentrations in pre-weaning calves. Animal Science Journal, 90, 1185-1192.

一般社団法人家畜改良事業団.（1990）. 乳用牛群能力検定成績のまとめ（平成元年度版）

一般社団法人家畜改良事業団.（2019）. 乳用牛群能力検定成績のまとめ（平成 30 年度版）.

Kalaitzakis, E., Roubies, N., Panousis, N., Pourliotis, K., Kaldrymidou, E., Karatzias, H. (2007). Clinicopathologic evaluation of hepatic lipidosis in periparturient dairy cattle. Journal of Veterinary Internal Medicine, 21, 835–845.

Kamegai, T., Kasai, M., Ikeda, I. (2001). Improved method for Preparation of the methyl ester of conjugated linoleic acid. Journal of Oleo Science, 50, 237–241.

Kamgarpour, R., Daniel, R.C., Fenwick, D.C., Mcguigan, K., Murphy, G. (1999). Postpartum subclinical hypocalcaemia and effects on ovarian function and uterine involution in a dairy herd. The Veterinary Journal, 158, 59–67.

柏村文郎, 増子孝義, 古村圭子. (2006). 乳牛管理の基礎と応用2006年改訂版.

Katoh, N. (2002). Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. The Journal of Veterinary Medical Science, 64, 293-307.

川島 千帆. (2017). 乳牛における分娩前後の栄養代謝状態が分娩後の繁殖機能回復と産子の体質に及ぼす影響. 家畜感染症学会誌, 6, 39-46.

Kawashima, C., Kaneko, E., Amaya Montoya, C., Matsui, M., Yamagishi, N., Matsunaga, N., Ishii, M., Kida, K. Miyake, Y., Miyamoto, A. (2006). Relationship between the first ovulation within three weeks postpartum and subsequent ovarian cycles and fertility in high producing dairy cows. The Journal of Reproduction and Development, 52, 479-486.

Kawate, N., Sakase, M., Seo, Y., Fukushima, M., Noda, M., Takeda, K., Ueno, S., Inaba, T., Kida, K., Tamada, H., Sawada, T. (2006). Relations between plasma IGF-I concentrations during treatment with CIDR-based or Ovsynch protocol for timed AI and conception in early postpartum Japanese black beef cows. The Journal of Reproduction and Development, 52, 81-89.

Kume, S., Nonaka, K., Oshita, T. (2003). Relationship between parity and mineral status in dairy cows during the periparturient period. Animal Science Journal, 74, 211-215.

権五鏡，小野斉，山科秀也，金川弘. (1985). 乳牛の分娩前後の血液成分および疾病発生と繁殖成績との関係. 家畜繁殖学雑誌, 31, 63-67.

LeBlanc, S. J., Leslie, K. E., Duffield, T. F. (2005). Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle. Journal of Dairy Science, 88, 159–170.

Lerch, S., Pires, J.A., Delavaud, C., Shingfield, K.J., Pomiès, D., Martin, B., Chilliard, Y., Ferlay, A.（2015）. Rapeseed or linseed in dairy cow diets over 2 consecutive lactations: effects on adipose fatty acid profile and carry-over effects on milk fat composition in subsequent early lactation. Journal of Dairy Science, 98, 1005-1018.

Li, X., Yang, T., Li, S., Wang, D., Guan, D. (2015). Detecting esophageal cancer using surface-enhanced ramen spectroscopy (SERS) of serum coupled with hierarchical cluster analysis and principal component analysis. Applied Spectroscopy, 69, 1334–1341.

Lucy, M. C. (2001). Reproductive loss in highproducing dairy cattle: where will it end? Journal of Dairy Science, 84, 1277-1293.

Macmillan, K.L., Lean, I.J., Westwood, C.T. (1996). The effects of lactation on the fertility of dairy cows. Australian Veterinary Journal, 73, 141-147.

Mann, S., Yepes, F. A., Overton, T. R., Wakshlag, J. J., Lock, A. L., Ryan, C. M., Nydam, D. V. (2015). Dry period plane of energy: Effects on feed intake, energy balance, milk production, and composition in transition dairy cows. Journal of Dairy Science, 98, 3366-3382.

Martinez, N., Risco, C. A., Lima, F. S., Bisinotto R. S., Greco, L. F., Ribeiro, E. S., *et al*. (2012). Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. Journal of Dairy Science, 95, 7158–7172.

Massey, C.D., Wang, C., Donovan, G.A., Beede, D.K. (1993). Hypocalcemia at parturition as a risk factor for left displacement of the abomasum in dairy cows. Journal of the American Veterinary Medical Association, 15, 203, 852-853.

McArt, J.A.A., Nydam, D.V., Oetzel, G.R. (2012A). Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. Journal of Dairy Science, 95, 5056-5066.

McArt, J. A. A., Nydam, D. V., Oetzel, G. R. (2012B). A field trial on the effect of propylene glycol on displaced abomasum, removal from herd, and reproduction in fresh cows diagnosed with subclinical ketosis. Journal of Dairy Science, 95, 2505–2512.

McNamara, S., O'Mara, F.P., Rath, M., Murphy, J.J. (2003). Effects of different transition diets on dry matter intake, milk production, and milk composition in dairy cows. Journal of Dairy Science, 86, 2397-2408.

三浦道三郎, 小倉喜八郎, 酒井健夫, 五十嵐幸男.(1987). 乳牛における肝生検術

式の改良．日本獣医師会雑誌, 40, 867-870.

Moate, P. J., Chalupa, W. Boston, R. C. and Lean, I. J. (2007). Milk fatty acids I: Variation in the concentration of individual fatty acids in bovine milk. Journal of Dairy Science, 90, 4730–4739.

Moate, P. J., Chalupa, W., Boston, R. C., and Lean, I. J. (2008). Milk fatty acids II: prediction of the production of individual fatty acids in bovine milk. Journal of Dairy Science, 91, 1175-1188.

望月真弓, 久米光, 鶴田陽和, 朝長文弥, 奥平雅彦. (1993). 真菌症の早期発見の試み．日本医真菌学会雑誌, 34, 265-273.

Moore, S. J., VandeHaar, M. J., Sharma, B. K., Pilbeam, T. E., Beede, D. K., Bucholtz, H. F., *et al*. (2000). Effects of altering dietary cation-anion difference on calcium and energy metabolism in peripartum cows. Journal of Dairy Science, 83, 2095-2104.

Morrow, D. A., Hillman, D., Dade, A. W., Kitchen, H. (1979). Clinical investigation of a dairy herd with the fat cow syndrome. Journal of the American Veterinary Medical Association, 174, 161-167.

本好茂一.(1990)．脂肪肝　牛の代謝性疾患, 73～98, 学窓社, 東京.

Nafikov, R. A., Ametaj, B. N., Bobe, G., Koehler, K. J., Young, J. W., Beitz, D. C. (2006). Prevention of fatty liver in transition dairy cows by subcutaneous injections of glucagon. Journal of Dairy Science, 89, 1533-1545.

Neves, R. C., Leno, B. M., Stokol, T., Overton, T. R., McArt, J. A. A. (2017). Risk factors associated with postpartum subclinical hypocalcemia in dairy cows. Journal of Dairy Science, 100, 3796–3804.

Nishimura, K., Shimizu, S., Urata, H., Aoyama, Y., Kojima, T., Mtta, M., Kawabata, Y., Uchiyama, M., Sakuragi, K., Ohnishi, Y. (1999). The Relationship between

Serum Insulin-like Growth Factor-I and Changes in Body Weight in Early-Lactating Cows. 獣医疫学雑誌, 2, 89-96.

農業・食品産業技術総合研究機構. (2007). 日本飼養標準乳牛（2006 年版）

Oetzel, G. R. (2004). Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 20, 651–674.

及川伸. (2015). 乳牛の潜在性ケトーシスに関する最近の研究動向. 日本獣医師会雑誌, 68, 33-42.

Oikawa, S., Katoh, N., Kawawa, F., Ono, Y. (1997). Decreased serum apolipoprotein B-100 and A-I concentrations in cows with ketosis and left displacement of the abomasum. American Journal of Veterinary Research, 58, 121-125.

扇勉, 八田忠雄. (2001). 北海道根室管内の 217 乳牛群における死廃・病傷事故と乳量水準および飼養形態との関連. 日本獣医師会雑誌, 54, 667-672.

扇勉, 上村俊一. (1991). 乳牛における分娩前後のエネルギー水準が肝臓の脂肪沈着, 血液成分および乳蛋白率に及ぼす影響. 日本獣医師会雑誌, 44, 992-999.

Osman, M. A., Allen, P. S., Mehyar, N. A., Bobe, G., Coetzee, J. F., Koehler, K. J., Beitz, D. C. (2008). Acute metabolic responses of postpartal dairy cows to subcutaneous glucagon injections, oral glycerol, or both. Journal of Dairy Science, 91, 3311-3322.

Ospina, P.A., Nydam, D.V., Stokol, T., Overton, T.R. (2010). Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. Journal of Dairy Science, 93, 3595-3601.

Patton, J., Kenny, D.A., McNamara, S., Mee, J.F., O'Mara, F.P., Diskin, M.G., Murphy, J.J. (2007). Relationships among milk production, energy balance, plasma analytes, and reproduction in Holstein-Friesian cows. Journal of Animal Science, 90, 649-

658.

Payne, J.M., Dew, S.M., Manston, R., Faulks, M. (1970). The use of a metabolic profile test in dairy herds. The Veterinary Record, 87, 150-158.

Payne, J.M. & Payne, S. (1987). The Metabolic Profile Test. Oxford University Press, Walton Street, Oxford.

Rabelo, E., Rezende, R.L., Bertics, S.J., Grummer, R.R. (2003). Effects of transition diets varying in dietary energy density on lactation performance and ruminal parameters of dairy cows. Journal of Dairy Scienc, 86, 916-925.

Reid, I. M., Roberts, C. J., Manston, R. (1979). Reduced fertility associated with fatty liver in high-yielding dairy cows. Veterinary Science Communications, 3, 231–236.

Reinhardt, T. A., Lippolis, J. D., McCluskey, B. J., Goff, J. P., Horst, R. L. (2011). Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. The Veterinary Journal, 188, 122–124.

Reist, M., Erdin, D., von Euw, D., Tschuemperlin, K., Leuenberger, H., Chilliard, Y., Hammon, H.M., Morel, C., Philipona, C., Zbinden, Y., Kuenzi, N., Blum, J.W. (2002). Estimation of energy balance at the individual and herd level using blood and milk traits in high-yielding dairy cows. Journal of Dairy Science, 85, 3314–3327.

Ribeiro, E. S., Lima, F. S., Greco, L. F., Bisinotto, R. S., Monteiro, A. P. A., Favoreto, M., *et al*. (2013). Prevalence of periparturient diseases and impacts on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. Journal of Dairy Science, 96, 5682–5697.

Ron, M., Bar-Anan, R., Wiggans, G. R. (1984). Factors affecting conception rate of Israeli Holstein cattle. Journal of dairy science, 67, 854-60.

Rowlands, G., Manston, R., Stark, A., Russell, A., Collis, K., Collis, S. (1980).

Changes in albumin, globulin, glucose and cholesterol concentrations in the blood of dairy cows in late pregnancy and early lactation and relationships with subsequent fertility. The Journal of Agricultural Science, 94, 517-527.

佐々木賢二，三好康敬，寺嶋吉保，國友一史，田代征記. (1996). 甲状腺腫瘤の超音波診断 -判別分析を用いた検討-. 日本臨床外科医学会雑誌, 57, 2350-2354.

Schäff, C., Börner, S., Hacke, S., Kautzsch, U., Sauerwein, H., Spachmann, S. K., Schweigel-Röntgen, M., Hammon, H. M., Kuhla, B. (2013). Increased muscle fatty acid oxidation in dairy cows with intensive body fat mobilization during early lactation. Journal of Dairy Science, 96, 6449–6460.

Senatore, E., Butler, W., Oltenacu, P. (1996). Relationships between energy balance and post-partum ovarian activity and fertility in first lactation dairy cows. Animal Science, 62, 17-23.

Shaw, J. C. (1956). Ketosis in dairy cattle. A review. Journal of dairy science, 39, 402-434.

芝野 健一，井上 雅介，山城 幸夫，大西 真美. (2005). 乾乳牛のレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ活性値を用いた脂肪肝発生予察. 日本獣医師会雑誌, 58, 815-819.

Sofyan, A., Uyeno, Y., Shinkai, T., Hirako, M., Kushibiki, S., Kanamori, H., Mori, S., Katayose, Y., Mitsumori, M. (2019). Metagenomic profiles of the rumen microbiota during the transition period in low-yield and high-yield dairy cows. Animal science journal, 90, 1362-1376.

Soyeurt, H., Dardenne, P., Dehareng, F., Lognay, G., Veselko, D., Marlier, M., Bertozzi, C., Mayeres, P., Gengler, N. (2006). Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. Journal of Dairy Science, 89, 3690-3695.

Staples, C. R., Thatcher, W. W., Clark, J. H. (1990). Relationship between ovarian

activity and energy status during the early postpartum period 49 of high producing dairy cows. Journal of Dairy Science, 73, 938-947.

Taguchi, K., Satoh, T., Hirota, K. (1992). Relationship between halftime for sulfobromophthalein clearance and post-surgical prognosis in cows with abomasal displacement. The Journal of Veterinary Medical Science, 54, 425-428.

植松 正巳, 阿部 榮, 阿部 省吾, 齋藤 博水, 川村 清市.(2003). クローズアップ期乾乳牛に対するプロピレングリコール投与の周産期疾患予防効果. 日本獣医師会雑誌, 56, 583～586.

Venjakob, P.L., Pieper, L., Heuwieser, W., Borchardt, S. (2018). Association of postpartum hypocalcemia with early-lactation milk yield, reproductive performance, and culling in dairy cows. Journal of Dairy Science, 101, 9396–9405.

Walsh, R.B., Walton, J.S., Kelton, D.F., LeBlanc, S.J., Leslie, K.E., Duffield, T.F. (2007). The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. Journal of Dairy Science, 90, 2788-96.

Wathes, D. C., Cheng, Z., Chowdhury, W., Fenwick,M. A., Fitzpatrick, R., Morris, D. G., Patton, J., Murphy, J. J. (2009). Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. Physiological Genomics, 39, 1-13.

Watson, E. D. & Williams, L. A. (1987). Influence of liver fat on post-partum hormone profiles in dairy cows. Animal Science, 45, 9-14.

Woolpert, M. E., Dann, H. M., Cotanch, K. W., Melilli, C., Chase, L.E., Grant, R.J., Barbano, D.M. (2017). Management practices, physically effective fiber, and ether extract are related to bulk tank milk de novo fatty acid concentration on Holstein dairy farms. Journal of Dairy Science, 100, 5097-5106.

山岸 則夫, 李 仁炯, 大星 健治, 安藤 道雄, 高木 光博, 中川 昭. (2004). 乳牛

の乾乳後期における第一胃内容および尿性状の簡易臨床検査所見と各種周産期疾病発生との関係．日本家畜臨床学会誌, 27, 13-19.

Yoshimura, T. & Namikawa, K. (1982). Influence of breed, sex and anatomical location on lipid and fatty acid composition of bovine subcutaneous fat. 日本畜産学会報告 54, 97-105.

Youroukova, V.M., Dimitrova, D.G., Valerieva, A.D., Lesichkova, S.S., Velikova, T.V., Ivanova-Todorova, E.I., Tumangelova-Yuzeir, K.D. (2017). Phenotypes determined by cluster analysis in moderate to severe bronchial asthma. Folia Medical, 59, 165–173.

謝　辞

本論文の作成に当たり、筑波大学大学院生命環境科学研究科先端農業技術科学専攻の櫛引史郎教授にご懇切なるご教示とご校閲を賜った。また、同大学大学院生命環境科学研究科先端農業技術科学専攻の三森眞琴教授、田島清准教授、同大学大学院生命環境科学研究科生物圏資源科学専攻の田島淳史教授に貴重なご意見をいただき心からの謝意を表する。

本研究は兵庫県立農林水産技術総合センター畜産部生田健太郎部長、明治飼糧株式会社水戸研究所小原嘉昭氏、寺田文典氏、大谷喜永氏、株式会社微生物化学研究所岡章生氏、北海道大学大学院農学研究院畜産化学分野唄花子助教、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構本部中央技術支援センター高橋雄治氏、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門櫛引史郎氏らとの共同研究であり、試験に携わった方々には、試験設計、データ解析、家畜の飼養管理について有益なご助言とご協力を戴いた。

また、椿原健右所長、生田健太郎畜産部長をはじめ、兵庫県立農林水産技術総合センター淡路農業技術センターの各位には、試験研究や家畜の飼養管理において常に多大なご教示とご協力を戴いた。ここに記して、深く感謝の意を表します。