

原 著

液状キトサン製剤の子宮内注入が無発情牛の
発情・排卵同期化後の受胎率に及ぼす影響小比類巻正幸^{1)†} 向井真知子¹⁾ 大塚浩通²⁾ 三浦 弘²⁾ 川村清市²⁾

1) 青森県 開業 (小比類巻家畜診療サービス：〒039-2683 上北郡東北町大平63-3)

2) 北里大学獣医学部 (〒034-8628 十和田市東二十三番町35-1)

(2012年9月13日受付・2013年3月7日受理)

要 約

繁殖供用時期に明瞭な発情兆候が観察されなかったホルスタイン種経産牛に対し、液状キトサン製剤200mg/50mlを子宮内に注入した後にCIDR-synch変法で定時人工授精を行った群(キトサンCIDR群, n = 106)と無注入で定時人工授精を行った群(CIDR群, n = 101)の受胎率を比較した。キトサンCIDR群の受胎率は59.4%であり、対照群の44.6%と比べて有意に高かった ($P < 0.05$)。以上のことから無発情のホルスタイン種経産牛に対する発情・排卵同期化の前の液状キトサン製剤の子宮内注入は、受胎率の向上に有効であることが示唆された。

—キーワード：液状キトサン製剤, 乳牛, 受胎率向上, 子宮内注入。

----- 日獣会誌 66, 385~389 (2013)

分娩後の繁殖開始時期に無発情を呈する個体に対しては、発情誘起や排卵同期化・定時授精プログラムとしてOvSynch [1, 2] やCIDR-synch [3, 4] などがフィールドで実用化されているが、受胎率は十分に高いとはいえないのが現状である。受胎率に影響を及ぼす主な要因の一つが子宮内環境であり、分娩時に難産、双子分娩、胎盤停滞を伴った場合、正常に分娩したものと比較して細菌感染を伴う子宮内膜炎に罹患する可能性が高くなるとともに、繁殖成績が低下することが知られている [5-7]。このような症例に対しては繁殖開始時期の前に子宮内環境を正常に回復させる必要があり、子宮内の清浄化や、薬剤の刺激による子宮粘膜上皮の再生及び修復作用を目的に、子宮内への抗生剤やヨード剤の子宮内投与が行われている。しかし、顕著な効果が期待できる子宮内環境の改善を目的とした治療プログラムは少ないのが現状である。また、金子ら [8] は、人工授精後に2%ポビドンヨード溶液や抗生物質を子宮内に注入しても、その後の受胎率の向上はみられなかったと報告している。

キチンは甲殻類や菌類の骨格物質であり、キトサンはキチンのアセトアミド基がアミノ基になったものである。キトサンは組織活性を高め、生体の防御機能を局所的に誘発する特性があり [9]、創傷部位における肉芽形

成を促進して治癒促進作用があることが知られている [10-12]。また、キトサンと同様な性質を有するキチンを牛の子宮内に注入することにより発情が誘起されることも報告されている [13]。しかし、フィールドにおいて受胎率の向上を目的として子宮内にキトサンを注入した場合の効果に関する報告はない。そこで本研究では、キトサンの子宮内膜への組織活性作用と防御機構促進作用に注目し、乳牛の発情・排卵同期化処置を行う前に、液状キトサン製剤を子宮内に注入することが受胎率に及ぼす影響を明らかにする目的で試験を行った。

材料及び方法

試験1：発情・排卵同期化プログラムの前処置として液状キトサン製剤を子宮内注入することが受胎率に及ぼす影響を調査した。試験は平成14年12月～平成15年7月の間、青森県上北郡内の15農場で飼養されていたホルスタイン種経産牛について実施した。すべての農場は成牛35頭から60頭の繋ぎ飼いで、1乳期あたりの平均乳量は7,200～8,800kgであった。各牛群について1カ月間隔で定期検診を行った。分娩時に難産及び胎盤停滞の経歴がない個体のうち、分娩後60日以内に発情が認められず未授精の個体及び授精後40～60日間発情

† 連絡責任者：小比類巻正幸 (小比類巻家畜診療サービス)

〒039-2683 上北郡東北町字大平63-3 ☎0175-64-2710 FAX 0175-64-9748 E-mail: kopi@kopi-kopi.com

が認められなかったものの不受胎であった個体を試験に用いた。直腸検査により子宮壁の著しい肥厚や子宮内貯留物が認められた個体は除外した。供試牛数は1回の検診時に2～6頭であり、同一農場で同時期に投与群と対照群がほぼ均等になるように区分した。

投与群には酢酸を溶質とした液状キトサン製剤（明治キトサイドC, Meiji Seika ファルマ(株), 東京) 200mg/50ml を人工授精用シース管を用い子宮内に注入した（キトサンCIDR-synch群）。対照群には液状キトサン製剤の子宮内注入を行わなかった（CIDR-synch群）。子宮内注入から7日後をDay0としてCIDR-synch変法を実施した。CIDR-synch変法はDay0に黄体ホルモン製剤：CIDR（ファイザー(株), 東京）を腔内に挿入し、安息香酸エストラジオール製剤： $E_2\beta$ （オバホルモン, あすか製薬(株), 東京）2mgを筋肉内投与、Day7にCIDRを抜き、PGF₂α類縁体クロプロステノール：PG（レシプロンC, あすか製薬(株), 東京）0.25mgを筋肉内投与、Day9に $E_2\beta$ を1mg筋肉内投与し、Day10に定時人工授精を行った。試験牛数はキトサンCIDR-synch群が106頭とCIDR-synch群が101頭であった。両群の年齢及び分娩後日数の平均±標準偏差（SD）はそれぞれ、 4.3 ± 0.2 及び 116.7 ± 16.5 と 4.0 ± 0.2 及び 133 ± 6.0 であった。

両群ともDay0にボディコンディションスコア（BCS）の測定を行った。また、血液採取を行い、各個体の栄養摂取状態や健康状態の指標として血液生化学検査を行った。さらに、機能性黄体の有無を推定する目的で血清プロジェステロン濃度の測定を行った。採血はヘパリン添加真空採血管を用いて尾静脈から行い、採血後120分以内に3,000rpmで20分遠心分離し、血漿を測定時まで -20°C で凍結保存した。血液生化学検査は自動分析装置（AU400, オリンパス(株), 東京）を用い、総コレステロール（Tcho）、血中尿素窒素（BUN）、アルブミン（ALB）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、リン脂質（PL）、総タンパク質（TP）を測定した。プロジェステロンの測定はマイクロプレート（NUNC-IMMUNOMODULE, NuncA/S, Denmark）を使用した酵素免疫測定法〔14〕を用い、1ng/ml以上のプロジェステロン値を示す個体は機能的黄体を有するものと判断した。授精から40日経過後に直腸検査による妊娠診断を行った。

試験2：PG投与による発情誘起前の液状キトサン製剤の子宮内注入が受胎率に及ぼす影響を調査した。平成14年2～5月までの期間、青森県上北郡内14農場で飼養されていたホルスタイン種経産牛を用いた。すべての農場は成牛36～54頭の繋ぎ飼いで、1乳期あたりの平均乳量は6,800～8,900kgであった。各牛群について1カ月間隔で定期検診を行った。分娩時に難産及び胎

盤停滞の経歴がない個体のうち、分娩後60日以内に発情が認められなかったホルスタイン種経産牛を試験に用いた。直腸検査により子宮壁の著しい肥厚や子宮内貯留物が認められた個体は除外した。供試牛数は1回の検診時に2～6頭であり、同一農場で同時期に投与群と対照群がほぼ均等になるように区分した。投与群には液状キトサン製剤200mg/50mlを人工授精用シース管を用いて子宮内に注入した（キトサンPG群）。対照群には子宮内注入を行わなかった（PG群）。子宮内注入から7～14日後の直腸検査で黄体の認められた牛に対してPGを筋肉内投与し、3～4日後の外部徴候と直腸検査で発情を確認して、人工授精を実施した。キトサンPG群32頭のうち5頭、PG群35頭のうち6頭はPG投与後に明瞭な発情が確認されず、人工授精が実施できなかったため試験から除外した。この結果、試験牛数はキトサンPG群27頭とPG群29頭であった。両群の年齢及び分娩後日数の平均±SDはそれぞれ、 4.7 ± 0.4 及び 160.4 ± 16.9 と 5.0 ± 0.4 及び 143.5 ± 12.1 であった。授精から40日後に直腸検査により妊娠診断を行った。PG投与後の授精で不受胎であった牛は、自然発情の回帰時に人工授精を実施したが、PG群では2頭、キトサンPG群では1頭が不受胎のため淘汰され、それ以外の牛は全頭が受胎した。

得られた結果は平均±標準誤差（SE）で表示し、受胎率は χ^2 検定、その他はStudent *t*-testにより解析した。

成 績

試験1：CIDR-synch群の受胎率は44.5%（101頭中45頭）であったのに対し、キトサンCIDR-synch群は59.4%（106頭中63頭）と有意に高い受胎率を示した（ $P < 0.05$ ）。両群の受胎率に及ぼす年齢、分娩後日数、BC、及びホルモン処置開始時における機能性黄体の有無の影響を調査した（図）。年齢については受胎群と不受胎群間で有意差はなかった。分娩後日数は、キトサンCIDR-synch群において、受胎群よりも不受胎群の方が少なかった（ $P < 0.05$ ）。BCSについては、いずれも、受胎群と不受胎群間で有意差がなかった。

CIDR-synch変法開始時に機能性黄体を有した牛の割合は、キトサンCIDR-synch群の受胎群で63.5%、不受胎群で62.8%であり、有意差はなかった。同様に、CIDR-synch群では受胎群で68.9%、不受胎群で57.1%であり有意差はなかった。血液生化学検査値については、すべての項目において正常範囲内であり、受胎群と不受胎群間で有意差は認められなかった。

試験2：PG投与後の授精による受胎率は、PG群で37.9%（29頭中11頭）であったが、キトサンPG群では74.1%（27頭中20頭）と、有意に高かった（ $P <$

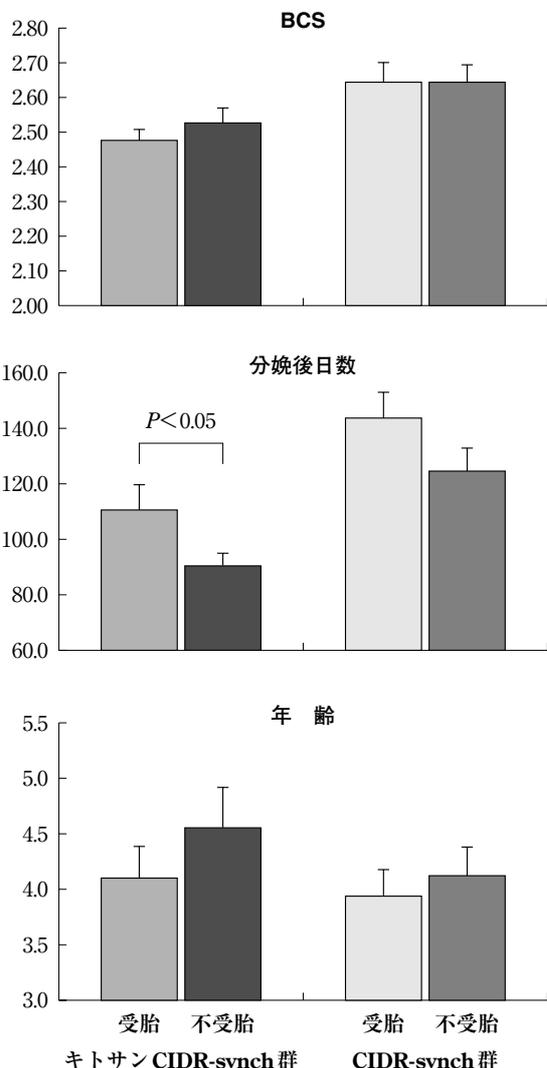


図 キトサン CIDR-synch 群及び CIDR-synch 群の受胎例と不受胎例における年齢、分娩後日数、BCS の比較 (試験 1) (平均 ± 標準誤差)

0.01) (表). PG 投与から受胎までの日数は, PG 群と比較してキトサン PG 群では有意な短縮がみられた ($P < 0.01$) (表). 同じく PG 投与から受胎までに要した平均授精回数は, PG 群と比較してキトサン PG 群で有意な減少がみられた ($P < 0.01$) (表).

考 察

本研究では液状キトサン製剤の子宮内注入が発情・排卵同期化後の受胎率に及ぼす影響を調査した. その結果, 試験 1 では, CIDR-synch 群の受胎率は 44.5% であったのに対しキトサン CIDR-synch 群は 59.4% と有意に高い受胎率を示した. また試験 2 では対照である PG 群の受胎率は 37.9% であり, これまで報告されている受胎率とほぼ同一の結果であった [15] が, キトサン PG 群では 74.1% と有意に高い受胎率が得られた. これらのことより, 液状キトサン製剤の子宮内注入は, その

表 キトサン PG 群と PG 群における繁殖成績の比較 (試験 2)

	頭数	初回授精受胎率 (%)	PG 投与から受胎までの平均日数 (日)	PG 投与から受胎までの平均授精回数 (回)
キトサン PG 群	27	74.1 ^a	16.3 ^e	1.4 ^e
PG 群	29	37.9 ^b	49.1 ^d	2 ^f

ab, cd, ef 間に有意差あり ($P < 0.01$)

後の発情・排卵同期化による人工授精において受胎成績を向上させることが示唆された. 液状キトサン製剤の子宮内注入により繁殖成績が向上する明確な機序についての報告はないが, 液状キトサンが子宮内膜や子宮の内分泌系に一定の作用を及ぼし, 子宮内に下降してきた受精卵の着床及び着床維持に好条件である子宮内環境となったことが推察される.

排卵同期化・定時授精プログラムの受胎率とその個体の栄養状態には密接な関連がある [16, 17]. Yamada ら [18] は, 分娩予定 10 日前から泌乳最盛期までのエネルギー不足が大きく, かつ長期に続くと, 分娩後の卵巣機能の回復が遅延し, 排卵同期化・定時人工授精による受胎率は低下すると報告している. 今回, 試験 1 では, BCS, 分娩後日数, 年齢, 血液生化学検査値に投与群と対照群間に有意差はなかったことから両群の牛はほぼ同一の条件であったと考えられる. 次に, それぞれを受胎群と不受胎群で比較すると, 分娩後日数については, キトサン CIDR-synch 群において受胎群に比べて不受胎群の方が有意に少なかった. 血液生化学検査値の中で栄養状態を反映すると考えられる Tcho と BUN の値にはこれらの群間で差は認められなかったが, 分娩後日数の少ない個体の方が分娩後の負のエネルギーバランスの影響を受けている可能性が高いものと考えられた.

Singh ら [19] は, 子宮内膜炎に罹患し, リピーターとなった交雑種牛の子宮内に *E. coli* から抽出したリポポリサッカライドを注入したところ, 子宮内の好中球数や白血球の貪食能が改善するとともに, 子宮内免疫調整機構の正常化と繁殖機能の回復がみられたことを報告している. 彼らは, 本来生体が持つ防御機構や免疫調整機構を刺激することで, 子宮機能の改善が図られる可能性があり, それは受胎成績の向上に貢献すると考察している. 組織活性作用や局所における防御機能の誘発作用 [10] を持つ液状キトサン製剤を子宮内に注入することにより, これと類似した反応が子宮内で起きていることが推察され, 今後, 液状キトサン製剤注入後の子宮内における免疫機能について詳細に調査する必要があると考えられる.

CIDR-synch 変法開始時における機能性黄体の存在する頭数の割合はキトサン CIDR-synch 群と CIDR-synch 群

の間で差はみられなかった。また、それぞれの受胎群、不受胎群の間でも差はなかった。CIDR-synch 開始時における機能性黄体の有無は受胎率と関連がある[20]とされているが、液状キトサン製剤注入7日後におけるプロゲステロン値の著しい低値や機能性黄体を有する個体数の減少は対照群と比較して認められなかったことから、液状キトサン製剤の子宮内注入によるこれらに対する影響は軽微なものであると考えられた。

これまで子宮内膜炎の治療として多く行われてきた抗生剤やポビドンヨード剤の子宮内注入は、細菌により汚染された子宮内の清浄化や、薬剤による炎症刺激の代償による組織の修復に主眼が置かれてきた[9, 21]。しかし、子宮内膜炎の診断については確立された基準がなく、治療法についても不明な点が多い[22]。また、子宮機能の客観的な評価が難しいという背景があり、数回の授精を行うものの受胎にいたらないものに対し子宮内膜炎を疑い、子宮洗浄などの診断的治療を試みる例が少なくない[9]。

本研究では、子宮に異常を認めない牛に対して液状キトサン製剤の子宮内注入を行うと受胎率が向上する可能性があることが明らかにされた。今後、臨床的に子宮内膜炎と診断される症例に対する液状キトサン製剤の治療効果を明らかにすることが必要と思われる。

引用文献

- [1] El-Zarkouny SZ, Cartmill JA, Hensley BA, Stevenson JS : Pregnancy in dairy cows after synchronized ovulation regimens with or without presynchronization and progesterone, *J Dairy Sci*, 87, 1024-1037 (2004)
- [2] Yamada K : Development of ovulation synchronization and fixed time artificial insemination in dairy cows, *J Reprod Dev*, 51, 177-186 (2005)
- [3] 上村俊一 : 牛の繁殖障害の治療法および定時人工授精, *家畜診療*, 459, 571-577 (2001)
- [4] Peeler ID, Nebel RL, Pearson RE, Swecker WS, Garcia A : Pregnancy rates after timed AI of heifers following removal of intravaginal progesterone inserts, *J Dairy Sci*, 87, 2868-2873 (2004)
- [5] Kim IH, Kang HG : Risk factors for postpartum endometritis and the effect of endometritis on reproductive performance in dairy cows in Korea, *J Reprod Dev*, 49, 485-491 (2003)
- [6] 松崎 勉, 田中樹竹 : 乳牛の子宮内膜炎の治療法および予後に関する考察, *家畜診療*, 362, 27-33 (1993)
- [7] Ghanem M, Shalaby AH, Sharawy S, Saleh N : Factors leading to endometritis in dairy cows in Egypt with special reference to reproductive performance, *J Reprod Dev*, 48, 371-375 (2002)
- [8] 金子一幸, 吉原進平, 山中 栄 : 低受胎牛に対する2%ポビドンヨード溶液の子宮内注入効果について, *家畜診療*, 307, 43-45 (1989)
- [9] Kosaka T, Kaneko Y, Nakada Y, Matsuura M, Tanaka S : Effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress, *J Vet Med Sci*, 58, 963-967 (1996)
- [10] Hayashi T, Matsuyama T, Hanada K, Nakanishi K, Uenoyama M, Fujita M, Ishihara M, Kikuchi M, Ikeda T, Tajiri H : Usefulness of photocrosslinkable chitosan for endoscopic cancer treatment in alimentary tract, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 71, 367-372 (2004)
- [11] Muzzarelli RA, Mattioli-Belmonte M, Tietz C, Biagini R, Ferioli G, Brunelli MA, Fini M, Giardino R, Ilari P, Biagini G : Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan, *Biomaterials*, 15, 1075-1081 (1994)
- [12] Usami Y, Okamoto Y, Minami S, Matsushashi A, Kumazawa NH, Tanioka S, Shigemasa Y : Chitin and chitosan induce migration of bovine polymorphonuclear cells, *J Vet Med Sci*, 56, 761-762 (1994)
- [13] Suzuki T, Murakami M : Recovery of estrus and ovulatory response in cows after intrauterine injection of chitin suspension, *J Mamm Ova Res*, 15, 157-160 (1998)
- [14] Munro C, Stabenfeldt G : Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone, *J Endocrinol*, 101, 41-49 (1984)
- [15] Kim IH, Suh GH, Son DS : A progesterone-based timed AI protocol more effectively prevents premature estrus and incomplete luteal regression than an Ovsynch protocol in lactating Holstein cows, *Theriogenology*, 60, 809-817 (2003)
- [16] 阿部 栄, 植松正巳, 斉藤博水, 渡辺大作 : 乳牛のボディコンディションスコアの変化と繁殖成績, *家畜臨床誌*, 27, 46-50 (2004)
- [17] 江口理香, 山岸則夫, 李仁 炯, 大星健治, 高木光博, 中川 昭 : 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, *家畜臨床誌*, 28, 34-41 (2005)
- [18] Yamada K, Nakao T, Isobe N : Effects of body condition score in cows peripartum on the onset of postpartum ovarian cyclicity and conception rates after ovulation synchronization / fixed-time artificial insemination, *J Reprod Dev*, 49, 381-388 (2003)
- [19] Singh J, Sidhu SS, Dhaliwal GS, Pangaonkar GR, Nanda AS, Grewal AS : Effectiveness of lipopolysaccharide as an intrauterine immunomodulator in curing bacterial endometritis in repeat breeding crossbred cows, *Anim Reprod Sci*, 59, 159-166 (2000)
- [20] Miura H, Kotani S, Kohirumaki M, Ohtsuka H, Kikuchi M, Ohnami Y : Relationships between the conception rate of estrus synchronization using estradiol benzoate and CIDR (progesterone) and other parameters in holstein lactating dairy cows, *J Reprod Dev*, 54, 214-216 (2008)
- [21] 檜垣恒夫, 土肥 学, 秋田真司 : 牛の子宮内膜炎と繁殖成績について, *家畜診療*, 328, 15-20 (1990)
- [22] 中尾敏彦 : 牛子宮内膜炎の診断と治療, *家畜診療*, 48, 717-726 (2001)

Effect of Intrauterine Infusion of Chitosan Acetic Acid Solution on Conception Rate after Synchronization of Estrus or Ovulation in Dairy Cows with Anestrus

Masayuki KOHIRUIMAKI^{1)†}, Machiko MUKAI¹⁾, Hiromichi OHTSUKA²⁾,
Hirosi MIURA²⁾ and Seiichi KAWAMURA²⁾

1) *Kohiruimaki Animal Medical Service, 63-3 Ohdaira, Tohoku, Kamikita-gun, 039-2683, Japan*

2) *School of Veterinary Medicine, Kitasato University, 35-1 Higashi niju-san-ban-cho, Towada, 034-8628, Japan*

SUMMARY

We performed two experiments to determine the effect of intrauterine administration of chitosan acetic acid solution (chitosan solution) on the conception rate after synchronization of estrus-ovulation. In the first experiment, the cows were given intrauterine administration of chitosan solution at a dose of 200 mg/50 ml. Seven days after the chitosan solution administration, the cows were given variant CIDR-synch (chitosan CIDR group : n = 106). The conception rate of cows with CIDR-synch only (control group : n = 101) was 44.5%, whereas the rate for chitosan-treated cows was 59.4% ($P < 0.05$). In the second experiment, the subjects were postpartum Holstein cows, which showed no clear estrus until after parturition. The cows were given intrauterine administration of a chitosan solution. Rectal examinations were performed 7-14 days after administration, and cows with corpus luteum were given intramuscular injections of PGF₂α (PG) to induce estrus, and were artificially inseminated (chitosan group : n = 27). The conception rate of cows with PG only (n = 29) was 37.9%, whereas the rate for chitosan-treated cows was 74.1%. The rate for chitosan-treated cows was thus significantly higher than that for cows with PG only ($P < 0.01$). These findings suggest that with intrauterine administration of the chitosan solution before synchronization of estrus-ovulation, conception rates improved.

— Key words : Chitosan acetic acid solution, Dairy cows, Improve reproductive performance, Intrauterine administration.

† Correspondence to : Masayuki KOHIRUIMAKI (*Kohiruimaki Animal Medical Service*)

63-3 Ohdaira, Tohoku, Kamikita-gun, 039-2683, Japan

TEL 0175-64-2710 FAX 0175-64-9748 E-mail : kopi@kopi-kopi.com

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 66, 385 ~ 389 (2013)