

北海道の1酪農場における *Leptospira* 血清型 Hardjo の不顕性感染と繁殖成績の関係

室 矢 武 則¹⁾ 滄 木 孝 弘^{2)†}

1) ㈱ノースベッツ (〒099-0414 紋別郡遠軽町南町2-4-20)
2) 帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター
(〒080-8555 帯広市稲田町西2線11)

(2019年2月2日受付・2019年9月5日受理)

要 約

牛は *Leptospira interrogans* 血清型 Hardjo 及び *Leptospira borgpetersenii* 血清型 Hardjo (*L. Hardjo*) の維持宿主となることが報告されている。近年、*L. Hardjo* の国内、特に北海道における乳用牛群への浸潤が報告されている。本研究では、北海道の1酪農場において、*L. Hardjo* 抗体の保有状況と繁殖成績の関連性を検証した。乳汁中の *L. Hardjo* 抗体を調べ、抗体陽性牛 (n=54) と陰性牛 (n=55) に分類した。分娩後125、150及び200日における受胎率は抗体陽性牛が有意に低かった。生存曲線による空胎日数の比較では抗体陽性牛群で長くなる傾向が認められた。また、妊娠中絶率は、抗体陽性牛で高い傾向が認められた。本研究の結果から、国内の酪農場における *L. Hardjo* の不顕性感染が潜在的に乳牛の生産性を低下させる1要因となり得ることが明らかとなった。

——キーワード：乳牛、*Leptospira* 血清型 Hardjo、不顕性感染、繁殖成績。

-----日獣会誌 73, 91~95 (2020)

レプトスピラ症は、病原性レプトスピラが家畜、野生動物及び人に感染する人獣共通感染症であり、世界的に大きな問題となっている [1]。牛のレプトスピラ症は、流産や死産、繁殖障害を起こすため、生産性を阻害する重要な疾病である [2, 3]。さまざまな血清型の病原性レプトスピラが牛レプトスピラ症に関与することが報告されているが [4, 5]、特に牛で問題となるのは血清型 Hardjo (*L. Hardjo*) による不顕性感染である [6]。

L. Hardjo は、遺伝学的に *Leptospira interrogans* 血清型 Hardjo Hardjoprajitno 型 (*L. Hardjoprajitno*) と *L. borgpetersenii* 血清型 Hardjo Hardjobovis 型 (*L. Hardjobovis*) の2種に分類される [7]。*L. Hardjo* が牛に感染すると、多くが無症状のまま経過し、持続的に尿中に排菌するため、感染が拡大する。さらに、*L. Hardjo* の不顕性感染は、潜在的に繁殖成績を低下させることが示唆されている [2, 8, 9]。

1977~1983年にTsuchimotoら [10] が行った疫学的調査によると、北海道内で *L. Hardjo* の抗体陽性牛が確認されている。レプトスピラの各血清型の分布は地域

差があり、近年、日本国内でも地域ごとの分布に関する調査研究が報告されている。菊池ら [11] の研究では、249の牛群から採取したバルク乳中の *L. Hardjo* 抗体を検査したところ、日本全国の酪農場における平均陽性率は31.3% (n=78/249) であったのに対し、北海道 (50%, n=25/50) と東北 (47.5%, n=19/40) の酪農場では抗体陽性率が高く、地域的にまん延しているリスクが示唆されている。

さらに、東北地方の牛群109から得たバルク乳の *L. Hardjo* 抗体を調べた疫学的研究では、65.1% (n=71/109) の抗体陽性率が報告されており、北海道からの導入牛が多いことや農場の牛群サイズが大きいことがリスク因子としてあげられている [12]。しかし、日本国内で *L. Hardjo* の不顕性感染が牛群に与える影響について調べた報告は見当たらない。

本研究では、北海道の1酪農場において搾乳牛から乳汁を採取し、乳汁中の *L. Hardjo* 抗体を調べ、抗体陽性牛と陰性牛の繁殖成績を比較することにより、*L. Hardjo* の不顕性感染が乳牛の繁殖性に与える影響を検

† 連絡責任者：滄木孝弘 (帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター獣医学研究部門)

〒080-8555 帯広市稲田町西2線11 ☎0155-49-5897 FAX 0155-49-5759 E-mail : aokit@obihiro.ac.jp

証した。

材料及び方法

調査農場：北海道十勝地方にある1軒の酪農場を調査対象とした。本農場では、*L. Hardjo*に対するワクチンを接種した履歴はなかった。搾乳牛はフリーストールで飼養されており、本農場における1頭当たりの平均乳量は年間9,678kgであった。乳汁を採取した2017年12月時点での搾乳牛の飼養頭数は185頭であった。このうち、2017年の1～12月に分娩した牛160頭を本試験の対象牛とした。305日補正乳量は、北海道酪農検定検査協会による牛群検定のデータを用いた。

乳汁サンプルと抗体検査：2017年12月に搾乳牛160頭から乳汁を無菌的に採取した。乳汁中の抗体検査には、市販の*L. Hardjo*抗体検出用ELISAキット (*Leptospira* ELISA kit, Linnodee Animal Care, U.K.) を用いた。添付の取扱説明書の手順に従い、操作を行った。光学濃度 (OD 値) から明所視輝度に対する暗所視輝度の比 (S/P比) を算出し、S/P比が0.1より大きい検体を陽性、0.03以下を陰性とした。S/P比が0.03より大きいが0.1以下であった検体 (n=6) は擬陽性とし、繁殖成績の統計学的解析から除外した。

繁殖管理と繁殖成績の調査：分娩後人工授精開始予定日までの期間 (自主的授精待機期間) は50日とし、牛群の管理者が発情及び発情徴候の観察を行い、家畜人工授精師が人工授精を行った。授精回数は、1発情につき1回とした。獣医師による定期的な繁殖検診により、授精後30～45日に超音波画像診断装置 (HS-102v, 本多電子(株), 愛知) を用いて第1回の妊娠診断を行い、胚あるいは胎子が確認されたものを妊娠と診断した。さらに授精後48～63日に行う第2回の妊娠診断で胎子の生存を確認した場合を妊娠と診断し、確認できなかった場合を胚死滅と診断した。第2回の妊娠診断以降に妊娠が中絶した場合を流産と診断した。売却予定牛 (n=3)、胎盤停滞などの周産期の記録がない牛 (n=35)、獣医師により黄色ブドウ球菌性乳房炎と診断された牛 (n=2)、及び繁殖検診において子宮あるいは卵巣の癒着や分娩後50日以降に子宮蓄膿症などの生殖器疾患が認められた牛 (n=5) は、繁殖成績の統計学的解析から除外した。

分娩後100、125、150及び200日における授精率、受胎率及び妊娠率を算出し、群間の比較を行った。授精率は各牛群全頭数に対して1回でも授精が行われた牛の割合を示した。受胎率は各牛群の総授精回数に対して妊娠した牛の割合を示し、妊娠率は各牛群全頭数に対して妊娠した牛の割合を示した。妊娠中絶率は、妊娠した牛の頭数に対して胚死滅及び流産と診断された牛の割合を示した。胚死滅率は第1回の妊娠診断で陽性であった牛

に対して第2回の妊娠診断で陰性に転じた牛の割合を示し、流産率は第2回の妊娠診断で陽性であった牛に対して、その後妊娠が中絶した牛の割合を示した。

統計学的解析：群間の中央値の比較はマン・ホイットニ検定を用い、群間の百分比の比較はフィッシャーの直接確率検定を用いて市販のソフト (エクセル統計 Statcel4, (有)オーエムエス出版, 埼玉) により解析した。生存曲線を用いた空胎日数の比較にはログランク検定を用い、空胎日数に与える要因の解析は市販のソフト (エクセル統計 BellCurve, (株)社会情報サービス, 東京) によりCOX比例ハザードモデルを用いた。危険率5%未満を有意な差、危険率10%未満を傾向とみなした。

成 績

乳汁中の*L. Hardjo*に対する抗体検査では、160頭中79頭が陽性であった (49.3%)。これら160頭中から試験期間中に臨床的に健康であった牛109頭を抽出し、*L. Hardjo*抗体陽性牛群54頭と陰性牛群55頭に分類した。抗体陽性牛群の産次数は、陰性牛群に比べて有意に小さかった (中央値：陽性牛2産、陰性牛3産, $P=0.003$)。

*L. Hardjo*抗体陽性牛群及び陰性牛群の繁殖成績の概要を表1に示した。分娩後100、125、150及び200日における授精率は両群間に有意な差はなかった。一方、分娩後125、150及び200日までの受胎率、分娩後125日における妊娠率は抗体陽性牛が有意に低かった ($P<0.05$)。妊娠中絶 (胚死滅及び流産) の発生率の*P*値は、0.05未満ではなかったが、抗体陽性牛で高い傾向が認められた ($P=0.098$)。

COX比例ハザードモデル解析の結果を表2に示した。胎盤停滞、産歴及び305日補正乳量と空胎日数の間に有意な関連性は認められなかった。一方、*L. Hardjo*抗体の有無は、空胎日数に影響を与える有意な因子であった (ハザード比：0.62, 95%信頼区間：0.41～0.95, $P=0.029$)。分娩後日数と非妊娠牛の割合の関係を図に示した。ログランク検定の結果、*L. Hardjo*抗体陽性牛は陰性牛に比べて、空胎日数が長くなる傾向が認められた (中央値：陽性牛127日、陰性牛113日, $P=0.06$)。

考 察

本研究により、国内の酪農場において初めて、*L. Hardjo*の不顕性感染が乳牛の生産性に負の影響を与えることが明らかとなった。

バルク乳から*L. Hardjo*に対する抗体が検出された北海道内の25酪農場から採取した501頭の乳牛の血清を調べた研究では、68.7% (n=344/501) の牛から*L. Hardjo*に対する抗体が検出されている [11]。本試験では、抗体陽性率が49.3% (n=79/160) であり、既報に比べるとやや低い感染率であった。牛群の保菌率は、牛

表1 乳汁中の *L. Hardjo* 抗体陽性牛群と陰性牛群の繁殖成績

繁殖項目	抗体陽性牛	抗体陰性牛	P 値	有意性
授精率				
分娩後 100 日	74.1% (40/54) ^a	70.9% (39/55)	0.438	
分娩後 125 日	87.0% (47/54)	85.5% (47/55)	0.515	
分娩後 150 日	92.6% (50/54)	89.1% (49/55)	0.383	
分娩後 200 日	94.4% (51/54)	98.2% (54/55)	0.302	
受胎率				
分娩後 100 日	29.4% (15/51)	43.5% (20/46)	0.110	
分娩後 125 日	35.2% (25/71)	50.7% (36/71)	0.045	*
分娩後 150 日	38.2% (34/89)	52.6% (41/78)	0.044	*
分娩後 200 日	37.6% (41/109)	50.0% (49/98)	0.049	*
妊娠率				
分娩後 100 日	27.8% (15/54)	36.4% (20/55)	0.225	
分娩後 125 日	44.4% (24/54)	65.5% (36/55)	0.022	*
分娩後 150 日	63.0% (34/54)	72.7% (40/55)	0.188	
分娩後 200 日	75.9% (41/54)	87.3% (48/55)	0.099	†
妊娠中絶率				
	10.0% (5/50)	2.0% (1/51)	0.098	†
胚死減率				
	8.0% (4/50)	2.0% (1/51)	0.163	
流産率				
	2.2% (1/46)	0% (0/50)	0.479	

a : 該当牛/対象牛

* : $P < 0.05$ (有意差あり) † : $P < 0.1$ (傾向あり)

が接触する機会や糞尿の処理方法などの飼養管理が影響すると考えられる。Miyama ら [12] の研究でも *L. Hardjo* 抗体陽性農場における有意なリスク因子として、牛群サイズが大きく、牛の飼養密度が高いことを指摘している。

本試験では、抗体陽性牛群の平均産次数は、陰性牛群に比べて有意に少なかった。抗体陽性牛は繁殖成績不良のため早期に淘汰されてしまい、相対的に抗体陽性牛群の平均産次数が減少したと考えられた。しかし、本試験を実施した農場において、過去の *L. Hardjo* 抗体保有状況と牛の淘汰理由との関連を調べることはできなかったため、今後精査が必要であろう。

乳量 [13] や、産次数 [14] が空胎日数に影響を与えることが報告されている。また、胎盤停滞は乳牛の繁殖成績を低下させる重要な要因となり得ることが知られている [15]。しかし、本研究では、乳量、産次数及び胎盤停滞と空胎日数の間に有意な関連性は認められな

表2 COX 比例ハザードモデルを用いて空胎日数に与える要因を解析した結果

調査項目	ハザード比	95%信頼区間	P 値	有意性
胎盤停滞	0.65	0.36~1.15	0.144	
産次数	0.90	0.73~1.10	0.333	
305 日補正乳量	0.99	0.99~1.00	0.199	
抗体の有無	0.57	0.37~0.90	0.015	*

* : $P < 0.05$ (有意差あり)

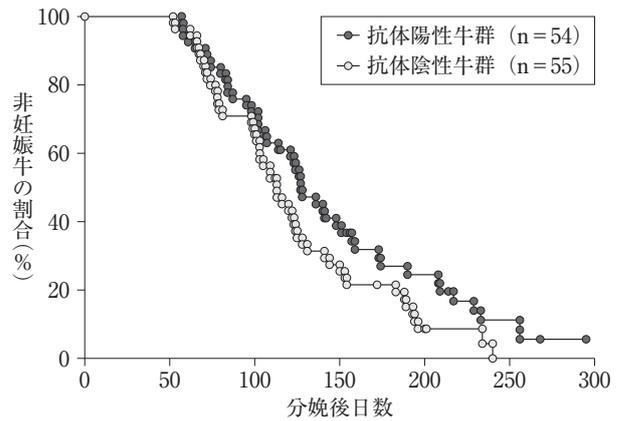


図 乳汁中の *L. Hardjo* 抗体陽性牛群と陰性牛群の分娩後の非妊娠牛の割合

かった。

本研究は、一酪農場内の繁殖成績を扱っており、供試牛が同一の管理下で飼養されていたこと、さらに臨床的な異常を認め獣医師による治療が施された牛は試験対象から除外したことから、これらの要因による影響は最小限であることが推察された。

本研究では、*L. Hardjo* 抗体陽性牛群における繁殖成績の低下を確認した。これは、*L. Hardjo* の不顕性感染は潜在的に繁殖成績を低下させるという海外の報告 [2, 8, 9] を支持する結果となった。*L. Hardjo* は遺伝子型により、*Leptospira interrogans* 血清型 Hardjo Hardjo-parajitno 型と *Leptospira borgpetersenti* 血清型 Hardjo Hardjobovis 型 (*L. Hardjobovis*) の 2 種に分類され、特に *L. Hardjobovis* の感染が、胚死減に関与することが示唆されている [16, 17]。

本試験で用いた ELISA 検査では、*L. Hardjo* に対する抗体についてのみ評価可能であり、遺伝子型の分類まではできなかった。北海道内に *L. Hardjobovis* が浸潤している可能性を示唆している報告もあり [18]、今後は遺伝子型の分類も含めて、より詳細なフィールド調査が必要になると考えられた。

過去の報告では *in vitro* において、透明帯から脱出前の桑実胚に *L. Hardjobovis* を曝露させた後、電子顕微鏡で観察したところ、胚細胞内に *L. Hardjobovis* が入り込んでいるのが確認されている [19]。また、*L.*

Hardjo は腎臓だけでなく子宮や卵管といった生殖器にも持続感染することが確認されており [20], 子宮や卵管に感染している *L. Hardjo* が正常な受精卵の発育を阻害し, 胚の死滅を引き起こす可能性が考えられた。

本試験では, 授精後 30 日以後に起こった妊娠中絶が, 抗体陽性牛群で多い傾向を確認したが, 授精後 16 日以前の早期胚死滅 [21] や, 授精後 30 日までに起こる後期胚死滅を評価することはできなかった。おそらく, それらの胚死滅の発生も含めて, 本研究における抗体陽性牛の妊娠率低下につながったものと推察された。

一方, 抗体が陽性であっても分娩後 200 日の時点で 75.9% の牛が妊娠していた。 *L. Hardjo* の感染が妊娠を妨げる詳細な機序について不明な部分はあるが, おそらく感染している菌の量や感染部位, 宿主側の免疫状態も関与しているであろう。また, 本研究で調べたのは抗体価であるため, 乳汁を検査した時点における感染履歴を評価したにすぎない。

今後は, 尿中の菌の遺伝子検査などを併用しながら, 胚死滅を起こしやすい時期を中心に定期的にサンプリングを行うことで, *L. Hardjo* の感染と繁殖障害の関連性を理解するうえで貴重な情報を得ることができると考えられた。

L. Hardjobovis 感染動物に対する各種抗菌剤 (オキシテトラサイクリン, チルミコシン及びセフトオフル) を用いた治療の有効性が報告されているが [22], 多くが持続感染となり臨床症状を示さないため, 牛群内でまん延させないためには, 予防対策が重要であろう。ネズミなどの野生の齧歯類はレプトスピラの保菌動物として知られており, 感染しても症状を示さず, 尿を介して持続的に排菌する [1]。そのため, 農場内におけるネズミの防除は本症の予防に重要と考えられる。

海外では, 5 種混合ワクチン (*L. interrogans* 血清型 Hardjo Hardjoprajitno 型, 血清型 Pomona, 血清型 Canicola, 血清型 Icterohaemorrhagiae 及び *L. kirschneri* 血清型 Grippotyphosa) が市販されているが [23], 日本では市販されていない。さらに, 5 種混合ワクチンは *L. Hardjobovis* が牛から最も一般的に分離される地域では, 牛の流産や繁殖障害に対する予防効果は不十分であるとする報告もある [24]。

日本でも市販されている *L. Hardjobovis* に対する不活化ワクチン (スパイロバック®, ゴエティス・ジャパン(株), 東京) は, *L. Hardjobovis* の腎臓における定着を防ぐことが報告されている [25]。しかし, ワクチン接種だけでは, すでに感染している牛から病原菌を完全に排除できないことも示唆されている。したがって, すでにまん延してしまった農場では, ワクチン接種を励行するとともに, 可能であれば抗菌剤を用いた集中的な治療 (乾乳期治療など) が, 牛群から *L. Hardjo* を排除する

ために重要と考えられる。

引用文献

- [1] Adler B, de la Peña Moctezuma A : *Leptospira* and leptospirosis, *Vet Microbiol*, 140, 287-296 (2010)
- [2] Guitian J, Thurmond MC, Hietala SK : Infertility and abortion among first-lactation dairy cows seropositive or seronegative for *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*, *J Am Vet Med Assoc*, 215, 515-518 (1999)
- [3] Ellis WA : Animal leptospirosis, *Curr Top Microbiol*, 387, 99-137 (2015)
- [4] Miller DA, Wilson MA, Beran GW : Survey to estimate prevalence of *Leptospira interrogans* infection in mature cattle in the United States, *Am J Vet Res*, 52, 1761-1765 (1991)
- [5] Rajeev S, Ilha M, Woldemeskel M, Berghaus RD, Pence ME : Detection of asymptomatic renal *Leptospira* infection in abattoir slaughtered cattle in southeastern Georgia, United States, *Sage Open Medicine*, 2, 2050312114544696 (2014), (online), (<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2050312114544696>), (accessed 2018-12-11)
- [6] Ellis WA, O'Brien JJ, Cassells J : Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype Hardjo infection in Northern Ireland, *Vet Rec*, 108, 555-557 (1981)
- [7] Marshall RB, Winter PJ, Thiermann AB, Ellis WA : Genotypes of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in cattle in the UK, *Vet Rec*, 117, 669-670 (1985)
- [8] Dhaliwal GS, Murray RD, Dobson H, Montgomery J, Ellis WA : Reduced conception rates in dairy cattle associated with serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection, *Vet Rec*, 139, 110-114 (1996)
- [9] Dhaliwal GS, Murray RD, Ellis WA : Reproductive performance of dairy herds infected with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* relative to the year of diagnosis, *Vet Rec*, 138, 272-276 (1996)
- [10] Tsuchimoto M, Kida H, Yanagawa R, Inui S : *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection in cows of Hokkaido, Japan - Serological evidence, *Jpn J Vet Sci*, 45, 811-814 (1983)
- [11] 菊池直哉, 鳥海史恵, 中野良宣, 森谷浩明, 高橋樹史 : わが国の乳牛におけるレプトスピラ症の抗体調査, *日獣会誌*, 66, 463-467 (2013)
- [12] Miyama T, Watanabe E, Ogata Y, Urushiyama Y, Kawahara N, Makita K : Herd-level risk factors associated with *Leptospira* Hardjo infection in dairy herds in the southern Tohoku, Japan, *Prev Vet Med*, 149, 15-20 (2018)
- [13] Harman JL, Gröhn YT, Erb HN, Casella G : Event-time analysis of the effect of 60-day milk production on the parturition-to-conception interval in dairy cows, *Am J Vet Res*, 57, 634-639 (1996)
- [14] Gröhn YT, Rajala-Schultz PJ : Epidemiology of reproductive performance in dairy cows, *Anim Reprod Sci*,

- 60-61, 605-614 (2000)
- [15] Fourichon C, Seegers H, Malher X : Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis, *Theriogenology*, 53, 1729-1759 (2000)
- [16] BonDurant RH : Selected diseases and conditions associated with bovine conceptus loss in the first trimester, *Theriogenology*, 68, 461-473 (2007)
- [17] Garry F : *Leptospirosis, Rebhun's diseases of dairy cattle*, Divers TJ, et al eds, 2nd ed, 610-612, Saunders, St Louis (2008)
- [18] Koizumi N, Yasutomi I : Prevalence of leptospirosis in farm animals, *Jpn J Vet Res, Suppl*, 60, 55-58 (2012)
- [19] Bielanski AB, Surujballi O : *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo* type *hardjobovis* in bovine embryos fertilized in vitro, *Can J Vet Res*, 62, 234-236 (1998)
- [20] Ellis WA, Songer JG, Montgomery J, Cassells JA : Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in genital and urinary tracts of non-pregnant cattle, *Vet Rec*, 118, 11-13 (1986)
- [21] Humblot P : Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants, *Theriogenology*, 56, 1417-1433 (2001)
- [22] Alt DP, Zuerner RL, Bolin CA : Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo*, *J Am Vet Med Assoc*, 219, 636-639 (2001)
- [23] Givens MD : A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle, *Theriogenology*, 66, 648-654 (2006)
- [24] Bolin CA, Thiermann AB, Handsaker AL, Foley JW : Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *hardjo-bovis* infection of pregnant cattle, *Am J Vet Res*, 50, 161-165 (1989)
- [25] Bolin CA, Alt DP : Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo*, *Am J Vet Res*, 62, 995-1000 (2001)

Latent Infection with *Leptospira* Serovar Hardjo and Reproductive Performance in a Dairy Farm in Hokkaido, Japan

Takenori MUROYA¹⁾ and Takahiro AOKI^{2)†}

1) NORTH VETS Inc., 2-4-20 Minamimachi, Engaru-cho, Monbetsu-gun, 099-0414, Japan

2) Research Center for Global Agromedicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, 080-8555, Japan

SUMMARY

Bovine leptospirosis is a serious issue that impedes productivity because it often results in abortions and stillbirths. Moreover, cows can be asymptomatic carriers of *Leptospira* serotype Hardjo (*L. Hardjo*). Recently, the high prevalence of *L. Hardjo*-seropositive cows has been reported in Japan. However, to the best of our knowledge, the influence of subclinical infection with *L. Hardjo* on dairy productivity in Japan has not been reported. Thus, we compared the reproductive performance between *L. Hardjo*-seropositive and -seronegative cows at a dairy farm in Hokkaido, Japan. Milking cows were divided into *L. Hardjo*-seropositive (n = 54) and -seronegative (n = 55) groups according to the presence or absence of antibody-specific to *L. Hardjo* in the milk. The conception rates per insemination at 125, 150, and 200 days postpartum were significantly lower in *L. Hardjo*-seropositive cows than in -seronegative ones ($P < 0.05$). The calving-to-conception interval tended to be longer in the seropositive cows (median: 127 days vs. 113 days, $P = 0.06$); furthermore, incidence of pregnancy loss (embryo death and abortion) tended to be higher in the seropositive cows (10% vs. 2%, $P = 0.098$). *L. Hardjo* has been found to cause latent infections in the reproductive organs, possibly impeding the normal development of the embryo and resulting in lower fertility. The study results revealed that subclinical infection with *L. Hardjo* in dairy cows is one of the potential factors decreasing dairy productivity in Japan.

— Key words : Dairy cow, *Leptospira* serovar Hardjo, subclinical infection, reproductive performance.

† Correspondence to : Takahiro AOKI (Research Center for Global Agromedicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Inada-cho, Obihiro, 080-8555, Japan

TEL 0155-49-5897 FAX 0155-49-5759 E-mail : aokit@obihiro.ac.jp

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 73, 91 ~ 95 (2020)