

# 乳牛の脂肪肝と卵胞嚢腫に関する研究

日本大学大学院獣医学研究科

種村 高一

2017

## 目 次

第1章	緒 論	-----1
-----	-----	--------

第2章	乳牛における脂肪肝の発症と予後に関する研究	-----9
-----	-----------------------	--------

第1節	序 言	-----10
-----	-----	---------

第2節	材料および方法	-----11
-----	---------	---------

2-1 供試牛

2-2 調査項目

2-3 ケトーシスの診断

2-4 肝生検

2-5 脂肪肝の病理組織学診断

2-6 脂肪肝の治療

2-7 脂肪肝の治癒判定

2-8 脂肪肝既往牛の区分（群分け）

2-9 血液生化学検査

2-10 統計処理

第3節	結 果	21
3-1	脂肪肝の発症状況と臨床症状	
3-2	脂肪肝既往牛の区分と結果	
3-3	脂肪肝既往牛の概要	
3-4	脂肪肝既往牛における継発症の発症状況	
3-5	脂肪肝既往牛における継発症の発症と予後	
3-6	脂肪肝既往牛における疾病別継発症の発症状況と 予後	
3-7	肝脂肪沈着度と血液生化学性状	
第4節	考 察	32
第5節	小 括	37
第3章	卵胞嚢腫牛の肝 UDP-グルクロン酸転移酵素活性と 肝疾患との関係	39
第1節	序 言	40
第2節	材料および方法	42
2-1	供試牛	

2-2	肝生検	
2-3	病理組織検査	
2-4	肝 UGT の測定と方法	
2-5	統計分析	
第 3 節	結 果	-----46
3-1	卵胞囊腫牛と正常発情周期牛における肝 UGT 活性値 の比較	
3-2	肝疾患牛における肝 UGT 活性値	
3-3	肝 UGT 活性値別の卵胞囊腫発生率および肝疾患の併 発率	
第 4 節	考 察	-----54
第 5 節	小 括	-----56
第 4 章	脂肪肝牛における胆汁中ステロイドホルモンに関する 研究	-----58
第 1 節	序 言	-----59
第 2 節	材料および方法	-----60

第3節	結 果	-----	61
3-1	と場材料における脂肪肝の発症状況		
3-2	正常肝牛と脂肪肝牛の胆汁中非抱合型エストロジェン3分画の比較		
3-3	正常肝牛と脂肪肝牛の胆汁中非抱合型コルチゾール値の比較		
第4節	考 察	-----	69
第5節	小 括	-----	71
第5章	脂肪肝牛におけるチオプロニンの治療効果と予後	---	72
第1節	序 言	-----	73
第2節	材料および方法	-----	75
2-1	供試牛		
2-2	ケトーシスの診断		
2-3	脂肪肝の診断と肝脂肪沈着度による区分		
2-4	MPGによる脂肪肝の治療		
2-5	脂肪肝の治癒判定		

2-6	血液生化学検査	
2-7	統計処理	
第3節	結 果	79
3-1	MPG投与後の臨床症状の変化	
3-2	MPG の投与量と治療効果	
3-3	肝脂肪沈着度別の血液生化学検査結果	
3-4	初診時と終診時の血液生化学検査結果の比較	
3-5	予後判定	
第4節	考 察	89
第5節	小 括	91
第6章	チオプロニンによる卵胞嚢腫牛の治療効果	93
第1節	序 言	94
第2節	材料および方法	96
2-1	供試牛	
2-2	実験方法	
2-3	統計処理	

第3節 結 果	97
第4節 考 察	102
第5節 小 括	105
第7章 總 括	107
謝 辞	116
引用文献	117

# 第 1 章

## 緒 論



乳牛の分娩前後の 3 週間は移行期と呼ばれ、この時期に乳牛は劇的なエネルギーの質的および量的変化を経験する (Drackley, 1999)。妊娠末期には妊娠子宮が第一胃を強く圧迫し、採食の減退による乾物摂取量 (DMI) の減少が起こるが、ボディコンディションスコア (BCS) が高い牛程 DMI の減少率は大きくなる (Grummer et al., 2004)。分娩直後から泌乳開始に伴う DMI の要求量は急激に増大するが、第一胃容積を急に拡大させることは不可能であり、栄養の充足率低下が進行するため、全ての乳牛は負のエネルギーバランス (NEB) に陥る。やがて DMI が増加するにつれ復帰するが、NEB が完全に回復するまでには健康牛でも約 1 カ月半を要するとされている (Grummer, 2008)。

中度～重度の NEB になった乳牛では、周産期疾患を発症することが多く、中でもケトーシスと脂肪肝が最も重要な疾患として挙げられる。近年、ケトーシスは従来の症状分類から原因分類に変更され、食餌性ケトーシス、I 型ケトーシス、II 型ケトーシスの 3 群に分類されている (Holtenius & Holtenius, 1996)。食餌性ケトーシスは酪酸を含む変敗サイレージの給与により起こることが多く、過剰な酪酸がケトン体に変化することでケトーシスを発症する。I 型ケトー

シスは分娩前の影響は少なく、分娩後の慢性的なエネルギー不足による低血糖が原因で発症するケトーシスであり、分娩後 3～6 週間に発症することが多い。Ⅱ型ケトーシスは従来から知られている肥満牛症候群（Fat Cow Syndrome）に関連するものであり、ヒトのⅡ型糖尿病に似ていることからⅡ型と命名された。BCS が 4.0 以上の乳牛では、分娩前から NEB による脂肪動員がすでに始まっており、分娩後に起こる急激なエネルギー要求に対応できない栄養を補うために、さらなる体脂肪動員を起し、血中遊離脂肪酸(NEFA)が急増する。高濃度の NEFA は肝臓にトリグリセリド (TG) として蓄積し、脂肪肝を発症する。脂肪肝では肝臓の重要な働きである糖新生機能が低下するためにケトン体が上昇し、分娩後 1～2 週間以内にケトーシスを発症することが多い。このタイプの脂肪肝を併発したケトーシスは、胎盤停滞や第四胃変位、免疫機能の低下による子宮炎、乳房炎、関節炎、肺炎などを併発または継発する。一部にはⅠ型ケトーシスやⅡ型ケトーシスに食餌性ケトーシスが加わる場合があり、この場合の脂肪肝は、特に重篤化する。乳牛のケトーシス発症試験では、ケトーシスの臨床症状を発現する以前から重篤な脂肪肝が観察されている（Veenhuizen et al., 1991）。

脂肪肝牛は分娩するまで臨床症状を発現することはないとされているが (Mc Cormack, 1978)、分娩後には、分娩のストレス、急激な産乳の要求、環境の変化など、いくつかの要因が重なり臨床症状を発症する。脂肪肝牛の臨床症状は元気消失、食欲不振ないし廃絶、第一胃蠕動の減退、尿または乳汁中ケトン体陽性等であり、ケトosis とほぼ同じ症状である (Morrow, 1976)。脂肪肝の発症は、他の代謝病、感染症、消化器病、繁殖障害などの発症にも繋がり (Bobe et al., 2004)、脂肪肝の発症率の高い牛群では分娩後 4 カ月以内に最大 82% が脂肪肝に罹患し、25% が死亡したと報告されている (Morrow, 1976)。また、脂肪肝牛では 38% のケトosis と 62% の胎盤停滞を併発することも報告されている (Morrow, 1976)。

脂肪肝の診断は、肝生検が最も確実な診断法とされているが (Bobe et al., 2004)、肝生検による確定診断に基づいた薬物による治療成績や、予後などに関する疫学的研究は殆ど実施されていない。

脂肪肝は繁殖障害の発症にも密接に関係し (Butler et al., 1981、Staples et al., 1990、Rukkwamsuk et al., 1999、Bobe et al., 2004)、重度の NEB により代謝ホルモンのインシュリン様成長因子 (IGF-1) やインシュリンが低下することが、間接的に性腺刺激ホル

モンを低下させ、卵胞発育障害（卵巣静止、卵巣萎縮など）を引き起こす（Beam & Butler, 1999）。また、卵胞嚢腫は卵巣疾患の中で廃用率が最も高い疾患になっている。乳牛の分娩後の初回卵胞ウェーブの 23%は卵胞嚢腫になるとされ（Beam & Butler, 1997、 Beam & Butler, 1999）、少なくとも卵胞嚢腫の 70%が分娩後 3 カ月以内に発症すると報告されている（Laporte et al., 1994）。この卵胞嚢腫多発時期は脂肪肝発症時期（分娩後 1～5 週間）と重複する時期でもある（Geelen & Wensing, 2006）。現在のところ、NEB が卵胞嚢腫発症に関係するという報告と、関係しないとする報告があるが（Huszenicza et al., 1988、 Beam, 1995、 Sovani et al., 2000、 Zulu et al., 2002）、脂肪肝と卵胞嚢腫との関連性を検討した研究は殆ど見られない。

卵胞嚢腫は排卵に不可欠な LH サージが起こらないために発症するが、この時期に LH サージに必要な血中エストロジェンは十分に分泌されていることが多い（Hamilton et al., 1995、 Yoshioka et al., 1996）ことから、卵胞嚢腫の原因は視床下部のエストロジェン感受性の低下であるとされている（Gümen & Wiltbank, 2002）。Silvia ら（2002）は発情期の血中プロゲステロン濃度が基礎値をやや上

回り、0.1~1ng/ml（中間値）の時に視床下部の LH サージ中枢は抑制され、卵胞嚢腫が誘発されることを示唆しているが、何故このような血中プロジェステロン濃度の増加が起こるのかについては言及していない。血中のエストロジェンやプロジェステロンは肝臓の抱合酵素により抱合代謝され、胆汁中に排泄されて生物学的活性を失うが、ヒトでは肝障害によるエストロジェンの胆汁中への抱合排泄能の低下が、高エストロジェン症候群を発症すると報告されている（Taylor, 1971）。同様に、脂肪肝牛のステロイドホルモンの代謝においても、脂肪肝による肝障害が肝臓抱合酵素による抱合排泄能を低下させることにより、血中および胆汁中のステロイドホルモンの排泄を遅延させる可能性がある。

ケトーシスにおいて、Ⅰ型ケトーシスや食餌性ケトーシスは原因が比較的明瞭であることから治療効果も高いが、Ⅱ型ケトーシスは脂肪肝や併発症を伴うことが多く、難治性ケトーシスとされている。脂肪肝治療薬としては従来より糖質、メチオニン、グルココルチコイドなどが使用されてきた（Bobe et al., 2004）。

本研究では、解熱、鎮痛、解毒作用を有する漢方薬の有効成分を化学的に抽出して国内で開発されたチオプロニン（MPG）を供試薬

とした。MPG は人医学において、重金属中毒の治療薬、農薬やアルコール毒性拮抗薬、そして慢性肝疾患における肝機能の改善など、代謝促進解毒剤として広く使われているが、乳牛への応用として、肝生検により確定診断された脂肪肝牛を対象とした MPG の大規模な治験は行われていない。

常包ら（1956）は肝疾患を伴う卵胞嚢腫に対してメチオニンやビタミン C の投与だけで卵胞嚢腫が治癒したことを初めて報告した。この論文は肝疾患が卵胞嚢腫の引き金になるということを示唆するだけでなく、肝疾患を治療するだけで卵胞嚢腫が治癒するということを証明した点で評価されるが、その後この病態を追試した研究は見られない。

本研究では、分娩後にケトーシスを発症した乳牛に対して肝生検を実施し、脂肪肝の病理組織学的確定診断を行った。診断結果を基に肝脂肪沈着度別に区分し脂肪肝の評価を行った。脂肪肝と診断された乳牛には肝賦活剤である MPG を投与し、その治療成績、その後の継発症について調査を行い、初診時の肝脂肪沈着度とその後の疾病継発率および死廃率との関連性について検討した（第2章）。

前章において、脂肪肝初診時の肝脂肪沈着度と脂肪肝治癒後の卵

巣疾患の発症率および繁殖機能喪失による廃用率との間に強い関連性を認めたことより、卵巢疾患の中で最も廃用率の高い卵胞嚢腫牛における肝 UDP-グルクロン酸転移酵素(UGT)活性値と肝疾患との関連について検討した（第3章）。

脂肪肝牛における肝 UGT 活性値と卵胞嚢腫との間に関連性があるとの仮説の下に、肝脂肪沈着度ごとの胆汁中非抱合型エストロジェンとコルチゾール濃度を比較検討した（第4章）。

周産期に多発する脂肪肝の治療法として、肝賦活作用のある MPG による治療を行い、治療成績および血液生化学検査項目の変化と、その予後について検討した（第5章）。

第3章と第4章において卵胞嚢腫の発症に肝疾患が関連していることを論じた。これにより卵胞嚢腫が脂肪肝と密接に関連していることを前提に、肝賦活剤である MPG が卵胞嚢腫の治療に効果があるのではないかと考え、卵胞嚢腫牛への MPG 単独投与による治療効果を検討した。さらに初診時のホルモン療法に反応しなかった卵胞嚢腫症例に対する MPG の効果についても検討した（第6章）。

## 第 2 章

乳牛における脂肪肝の発症と予後に関する研究



## 第1節 序 言

分娩後の乳牛では、泌乳開始に伴うエネルギー要求量が摂取エネルギーを上回るため、負のエネルギーバランス（NEB）に陥る。この NEB からの回復力がその後の生産性を左右する要点になっている。分娩後の NEB 下では、不足するエネルギーを補うために皮下組織に蓄積された体脂肪を分解して肝臓に動員させるため、肝臓トリグリセリド (TG) や血中遊離脂肪酸 (NEFA) が増加する (Kobayashi et al., 2002、Radcliff et al., 2006)。しかし、過剰な体脂肪の動員は脂肪肝を引き起こし、肝機能を低下させる (Jorritsma et al., 2000、Katoh, 2000)。

脂肪肝は特に分娩後の乳牛において頻発し、臨床的には食欲不振ないし廃絶を主徴とするケトーシスを伴うことが多く、他の周産期疾患とも密接に関連しており、その後の生産性に著しい障害を来す。脂肪肝により誘発される難治性周産期疾患は高泌乳牛と肥満牛において多発することが知られている (Kimura et al., 1993、Sato et al., 2003、Tamura et al., 2003)。脂肪肝の診断は肝生検による組織学的検査でのみ可能であり (Bobe et al., 2004)、肝脂肪沈着度より、軽度、中度、重度の3群に区分されるが (Collins & Reid, 1980、Bobe

et al., 2004)、臨床の現場では肝生検による確定診断に基づいた治療はあまりなされていない。主に肝臓で産生されるインシュリン様成長因子 (IGF-1) は、乳牛の繁殖成績の要点ともなる分娩後の初回卵胞ウェーブの発現に関与し、分娩後の初回排卵を誘導する重要な因子であることが報告されている。高い血中 IGF-1 濃度とインシュリン濃度は分娩後の初回卵胞ウェーブにおける主席卵胞を成長させ、卵胞成熟の最終段階を刺激し、卵胞の LH に対する感受性を高めている (Kawashima et al., 2007)。IGF-1 の産生と分泌が主に肝臓で行われていることから、肝機能の低下は卵胞の発育、排卵のプロセスを抑制し、繁殖能力を低下させる。

本研究では分娩後にケトーシスと診断した乳牛に肝生検を実施し、ケトーシス牛における脂肪肝の発症状況と、脂肪肝既往牛の肝脂肪沈着度別による继发症の発症と予後について、その概要を知る目的で研究を行った。

## 第 2 節 材料および方法

### 2-1 供試牛

水戸市近郊の農家 78 戸で飼養されていたホルスタイン系乳牛で、

分娩後に尿中ケトン体陽性と食欲不振ないし廃絶を主徴とする 417 頭のケトーシス牛に肝生検を実施し、肝臓実質に 10%以上（Collins & Reid, 1980）の脂肪沈着を認めた脂肪肝牛 284 頭を対象とした。

## 2-2 調査項目

初診時の年齢、産次数、体重、分娩間隔、分娩から発病までの日数、脂肪肝の治療回数、初診から治癒までの日数、脂肪肝既往牛が新たに発症した继发症の発症率と転帰について調査をした。調査期間は供試牛の最終分娩日から一乳期に相当する 305 日間とした。

## 2-3 ケトーシスの診断

ケトーシスの診断は、食欲不振ないし絶廃を主徴とする臨床症状と BM テスト<sup>®</sup>（山之内製薬）による尿中ケトン体半定量試験紙で診断した。尿検査の検体は、尿道カテーテルを用いて導尿した新鮮な膀胱尿を供試し、BM テストでケトン体（+）以上のものをケトーシスと診断した

## 2-4 肝生検

肝臓穿刺は、より多くの肝小葉を採取し供試する目的から、牛用肝臓穿刺器（富士平工業、東京）を用いて行った（図 2-1）。右側第

11～12 肋間で背線より約 25 cm 下方を穿刺部位とした（ Ono et al., 2011 ）。穿刺部位の周囲を剃毛し、洗淨、消毒の後 2%リドカインによる局所浸潤麻酔を施し、縦に 1 cm 位切皮した。切皮は過剰切皮を防ぐ目的で、マツチュウ氏持針器でフェザー替えメス刃 No 22 を先端から 15 mm 付近を鉗圧し、これを皮膚に垂直に穿刺することで行った。切皮部より肝臓穿刺器を左側前肢の肘方向に穿刺し、1.5cm<sup>3</sup>を目安に採材した肝臓組織を供試した（図 2-2、2-3）。



図 2-1 肝臓穿刺器（上：シルバーマン 下：牛用肝臓穿刺器）



図 2-2 穿刺部位を切皮（左）、肝臓穿刺器を腹腔内に挿入（右）



図 2-3 採取した肝臓組織（右は左の拡大図）

## 2-5 脂肪肝の病理組織学診断

採材した肝臓組織は浮遊試験により浮遊したものを直ちに 10%リン酸緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン（H-E）染色を行った（図 2-4）。H-E 染色により肝細胞空胞化を認めた検体について、凍結切片を作製しズダンⅢ（図 2-5）およびナイルブルー（図 2-6）による脂肪染色を行い、脂肪肝の確定診断をした。10%以上の脂肪沈着を認めたものを脂肪肝と判定した。



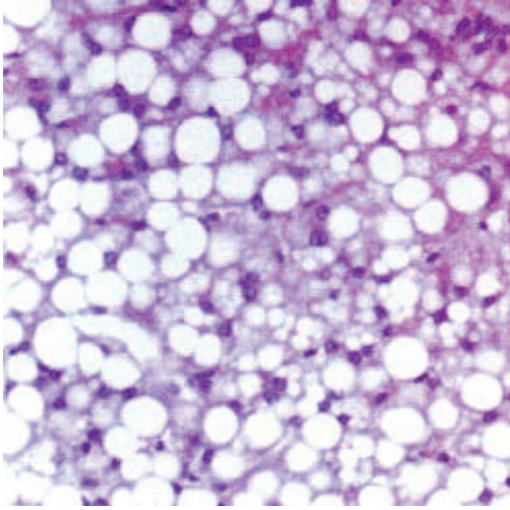


図 2-4 肝細胞変性（90%）（H-E 染色 400 倍）

肝細胞内に空胞形成

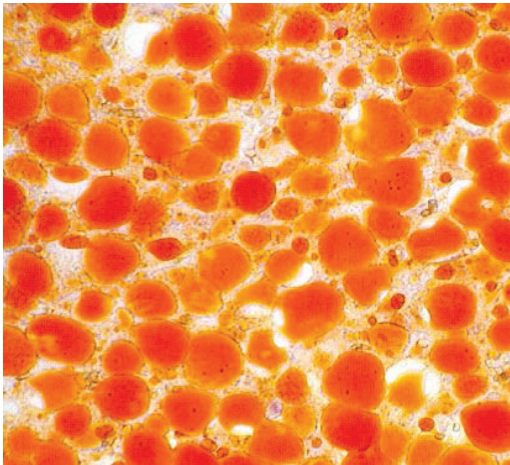


図 2-5 脂肪肝（ズダンⅢ染色 400 倍）

肝細胞内脂肪が橙黄色に染色されている

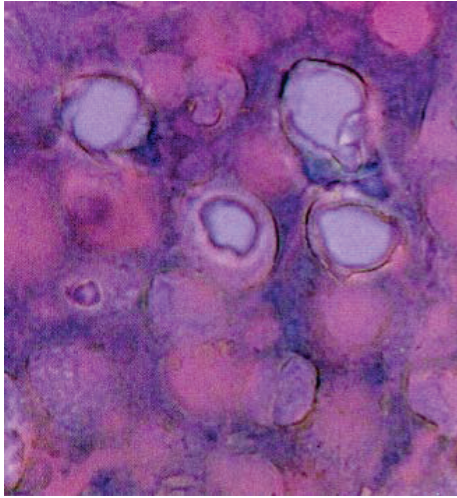


図 2-6 脂肪肝（ナイルブルー染色 400 倍）

赤色を示すトリグリセライド、青紫はコリンエステルが肝細胞内に蓄積



## 2-6 脂肪肝の治療

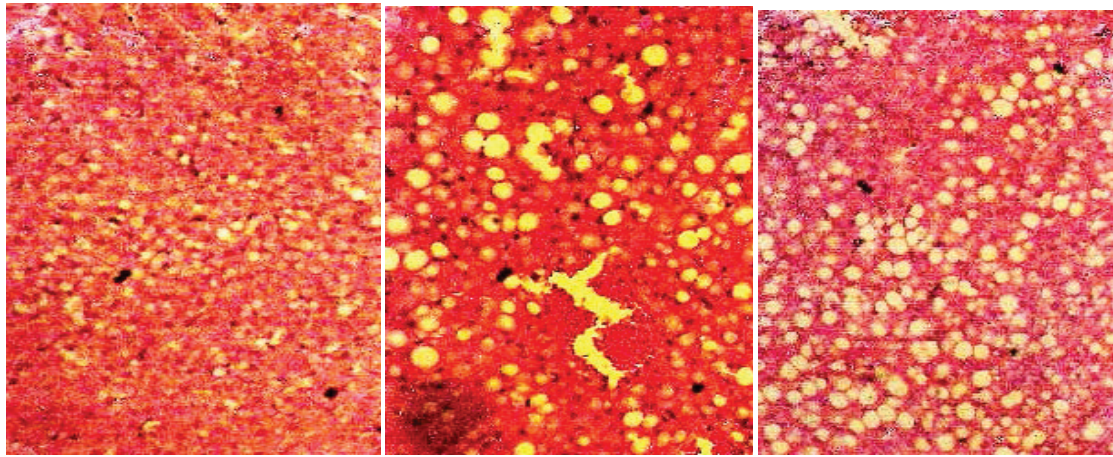
人、馬などで、肝機能賦活・庇護作用が認められているチオプロニン (2-Mercaptopropionylglycine : MPG、参天製薬) 5,000 mg/100 ml/頭を静脈内投与した。投与方法は1日1回5日間連用を基準とし、症状により適宜回数を加減して治療した。

## 2-7 脂肪肝の治療判定

食欲の回復、乳量の回復、元気の回復、起臥の改善、尿中ケトン体の消失、反芻の正常化、正常便の排泄など、臨床症状の改善が確認されたものを治癒と判定した (Tanemura et al.,1986)。

## 2-8 脂肪肝既往牛の区分 (群分け)

Collins と Reid (1980)、Bobe ら (2004) の報告を参考に、脂肪肝牛を初診時の肝脂肪沈着度により区分した。初診時の肝脂肪沈着度が 10%未満の個体は単純なケトosisと診断し、除外した。肝脂肪沈着度が 10%以上 30%未満であった個体の群を脂肪肝軽度群 (軽度群) とし、30%以上 60%未満であった個体の群を脂肪肝中度群 (中度群)、60%以上であった個体の群を脂肪肝重度群 (重度群) とし、脂肪肝牛を 3 群に区分した (図 2-8)。



10% 轻度群

30% 中度群

60% 重度群

图 2-8 肝脂肪沉着度别区分 (H-E 染色)

## 2-9 血液生化学検査

脂肪肝牛の初診時に採血した 73 頭の血液について血中尿素窒素 (BUN)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (GOT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (GPT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ ( $\gamma$ -GTP)、総ビリルビン (T-Bil)、血糖 (Glu)、トリグリセリド (TG)、遊離脂肪酸 (NEFA)、総コレステロール (T-Cho)、総蛋白 (TP) などの 11 項目について血液生化学性状を測定した。血液サンプルは保健科学研究所 (横浜) に依頼し、血液生化学性状の分析を行った。

## 2-10 統計処理

調査結果について、初診時の年齢、産次数、体重、分娩間隔、分娩から脂肪肝発症までの経過日数、臨床所見、治療回数、治癒までの日数について比較するとともに、血液生化学性状、継発症の転帰についての比較を行った。統計処理は、統計解析ソフトの JMP® (SAS INS. Japan) を使用して分析した。3 群間の平均値の比較は、Tukey-Kramer 法、比率についてはカイ二乗検定を用いた。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差 (SEM) で示した。有意水準 5%以下で有意差があると判定した。

### 第3節 結 果

#### 3-1 脂肪肝の発症状況と臨床症状

ケトーシス牛 417 頭のうち、肝生検により 10%以上の肝脂肪沈着を認め脂肪肝と診断された個体は 284 頭（68.1%）であった。これら脂肪肝牛を肝脂肪沈着度別に区分したところ、軽度群 109 頭（38.4%）、中度群 67 頭（23.6%）、重度群 108 頭（38.0%）であった。

上記 284 頭の脂肪肝牛の全頭に共通して認められた初診時の臨床症状は、食欲不振または廃絶、倦怠、尿中ケトン体陽性等であった。これら主要臨床症状以外の症状として、起立困難（34.3%）や起立不能（17.1%）などの起立障害（51.4%）、胎盤停滞（24.5%）、神経症状（9.8%）を認め、その他の疾患（4.1%）として下痢、第一胃鼓脹症、結腸鼓脹症、関節炎、蹄病などを認めた。

#### 3-2 脂肪肝既往牛の区分と結果

284 頭の脂肪肝牛のうち、治療後に治癒した 233 頭の脂肪肝既往牛を初診時の肝脂肪沈着度別に群分けした。その結果、軽度群 99 頭（42.5%）、中度群 56 頭（24.0%）および重度群 78 頭（33.5%）に

区分した。各群別に見た治癒率は、軽度群 55.1% (38/69 頭)、中度群 28.3% (13/56 頭)、および重度群 13.6% (10/78 頭) であった。

### 3-3 脂肪肝既往牛の概要

発症時の年齢は、軽度群で  $5.3 \pm 0.4$  歳、中度群  $4.8 \pm 0.4$  歳、重度群  $5.2 \pm 0.5$  歳、産次数は軽度群で  $3.2 \pm 2.0$  産、中度群  $3.3 \pm 1.6$  産、重度群  $3.0 \pm 1.4$  産であり、年齢と産次数の両者に於いて各群間に差異は認めなかった。体重では軽度群  $658.2 \pm 14.3$  kg、中度群  $636.2 \pm 20.2$  kg、重度群  $670.1 \pm 22.3$  kg で、特に重度群において増体の傾向を認めたが、いずれの群においても 600 kg を大きく超えている個体が多く、分娩前に過肥傾向にあったことが示唆された。分娩間隔については軽度群で  $437.4 \pm 23.7$  日、中度群  $416.7 \pm 20.3$  日、重度群  $455.4 \pm 21.3$  日であり、肝脂肪沈着度に関わりなく、理想の年 1 産から大きく逸脱した延長を認めた。分娩から発症までの日数は軽度群で  $9.9 \pm 7.9$  日、中度群で  $11.0 \pm 9.5$  日、重度群では  $12.7 \pm 11.6$  日であり、肝脂肪沈着度の上昇に伴い発病までの日数の延長を認めた。治癒牛における治療回数は、軽度群  $8.9 \pm 2.7$  回、中度群  $10.8 \pm 5.1$  回、重度群  $12.9 \pm 8.0$  回であり、初診から治癒までの経過日数も軽度群で  $11.2 \pm 4.7$  日、中度群で  $12.2 \pm 5.3$  日、重度

群で  $15.9 \pm 10.1$  日を要したことなど、肝脂肪沈着度の上昇に伴う延長を認めた（表 2-1）。

#### 3-4 脂肪肝既往牛における継発症の発症状況

脂肪肝既往牛 233 頭中 188 頭（80.7%）に新たな疾病の継発を認めた（表 2-2）。継発症を多い順に挙げると肝疾患（36.7%）、卵巢疾患（33.0%）、乳房炎（13.3%）、第四胃変位（4.8%）、子宮疾患（3.2%）、その他の疾患（9.0%）であった。その他の疾患の内訳は、腸捻転、鼓脹症、心外膜炎、悪性水腫、後大静脈血栓症、膀胱炎、熱射病などで、発症頭数は 17 頭であった。

#### 3-5 脂肪肝既往牛における継発症の発症と予後

脂肪肝既往牛のうち、継発症を発症した 188 頭を治療した結果、61 頭（32.4%）が治癒したが、127 頭（67.6%）が分娩後 305 日以内に死廃用となった（表 2-2）。肝脂肪沈着度別継発症の発症率とその予後について検討したところ、軽度群での継発症発症率は 69.7%であり、その内の 44.9%が死廃用となり、中度群での継発症発症率は 82.1%で、そのうちの死廃用率は 71.7%、重度群での継発症発症率は 93.6%であり、そのうちの 86.3%が死廃用となった（図 2-9）。

表 2-1 肝脂肪沈着度別にみた供試牛の概要

項 目	年 齢	産次	体 重	分娩間隔	分娩から 発病までの日数	治療回数	初診から 治癒までの日数
	(歳)	(産)	(kg)	(日)	(日)	(回)	(日)
軽 度 群 (n=109)	5.3 ±0.4	3.2 ±2.0	658.2 ±14.3	437.4 ±23.7	9.9 ±7.9	8.9 ±2.7	11.2 ±4.7
中 度 群 (n=67)	4.8 ±0.4	3.3 ±1.6	636.2 ±20.2	416.7 ±20.3	11.0 ±9.5	10.8 ±5.1	12.2 ±5.3
重 度 群 (n=108)	5.2 ±0.5	3.0 ±1.4	670.1 ±22.3	455.4 ±21.3	12.7 ±11.6	12.9 ±8.0	15.9 ±10.0

平均±標準誤差

表 2-2 脂肪肝既往牛における継発症の発症と予後

区 分	項 目	肝疾患	卵巣疾患	乳房炎	第四胃変位	子宮疾患	その他
軽度群 (n=99)	発症頭数 [69]	23	20	12	3	1	10
	69.7%	23.2%	20.2%	12.1%	3.0%	1.0%	10.1%
	治癒頭数 [38]	12	15	7	3	1	0
	55.1%	52.1%	75.0%	58.3%	100%	100%	0
	死廃頭数 [31]	11	5	5	0	0	10
	44.9%	47.8%	25.0%	41.60%	0	0	100%
中度群 (n=56)	発症頭数 [46]	19	14	5	3	1	4
	82.1%	33.9%	25.0%	8.9%	5.3%	1.7%	7.1%
	治癒頭数 [13]	3	5	1	3	1	0
	28.3%	15.8%	35.7%	20.0%	100%	100%	0
	死廃頭数 [33]	16	9	4	0	0	4
	71.7%	84.2%	64.2%	80.0%	0	0	100%
重度群 (n=78)	発症頭数 [73]	27	28	8	3	4	3
	93.6%	34.6%	35.8%	10.2%	3.8%	5.1%	3.8%
	治癒頭数 [10]	3	4	0	0	3	0
	13.6%	11.1%	14.2%	0	0	75.0%	0
	死廃頭数 [63]	25	23	8	3	1	3
	86.3%	92.5%	82.1%	100%	100%	25.0%	100%
発 症 頭 数	[188]	69	62	25	9	6	17
発 症 率	80.7%	36.7%	33.0%	13.3%	4.8%	3.2%	9.0%



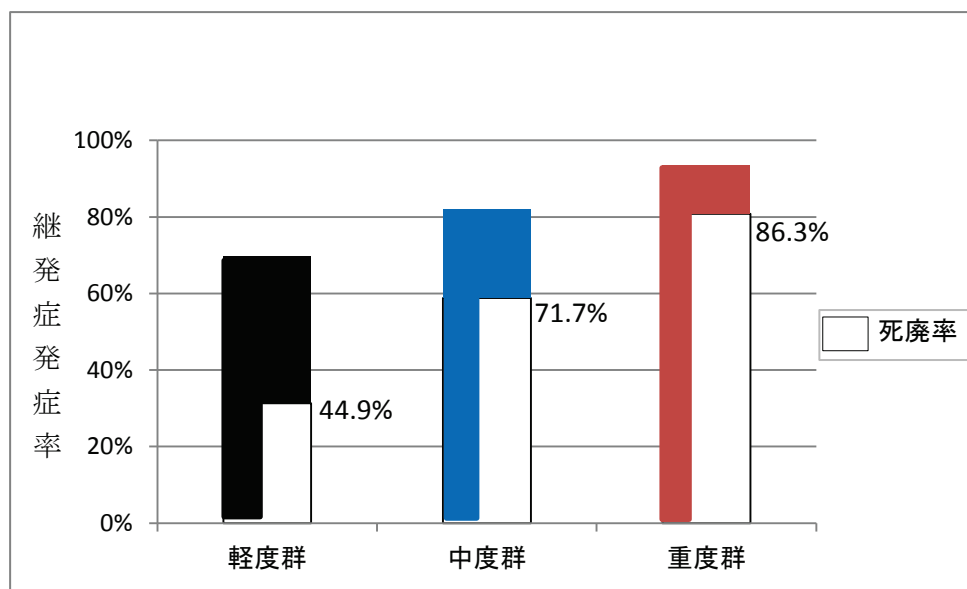


図 2-9 肝脂肪沈着度別合併症の発症率と予後

### 3-6 脂肪肝既往牛における疾病別継発症の発症状況と予後

脂肪肝既往牛における継発症について病名別に肝脂肪沈着度と発症率および死廃用率について検討を加えた。

#### 3-6-1 肝疾患の継発率と予後

肝疾患の継発頭数は 69 頭 (36.7%) であり、軽度群 (n=99) での発症は 23.2% (23 頭) で、治癒 52.1% (12 頭)、死廃用 47.8% (11 頭) であった。中度群 (n=56) での発症は 33.9% (19 頭) で、治癒 15.7% (3 頭)、死廃用 84.2% (16 頭) であった。重度群 (n=78) での発症は 34.6% (27 頭) で、治癒 11.1% (3 頭)、死廃 92.5% (25 頭) であった (図 2-10)。

#### 3-6-2 卵巣疾患の継発率と予後

卵巣疾患の継発頭数は 62 頭 (33.0%) であり、軽度群での発症は 20.2% (20 頭) で、治癒 75.0% (15 頭)、廃用 25.0% (5 頭) であった。中度群での発症は 25.0% (14 頭) で、治癒 35.7% (5 頭)、廃用 64.2% (9 頭) であった。重度群での発症は 35.8% (28 頭) で、治癒 14.2% (4 頭)、廃用 82.1% (23 頭) であった (図 2-11)。

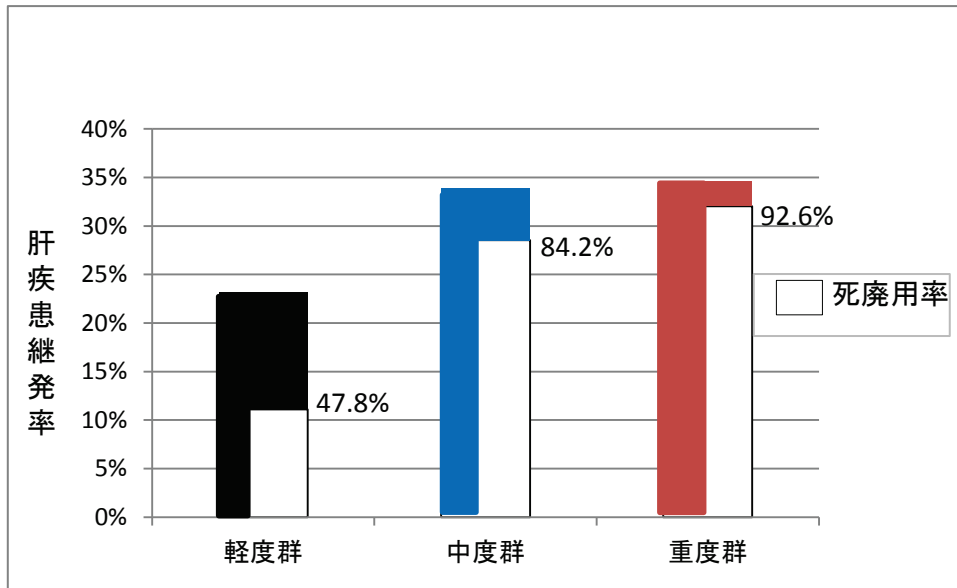


図 2-10 肝脂肪沈着度別肝疾患の継発率と予後

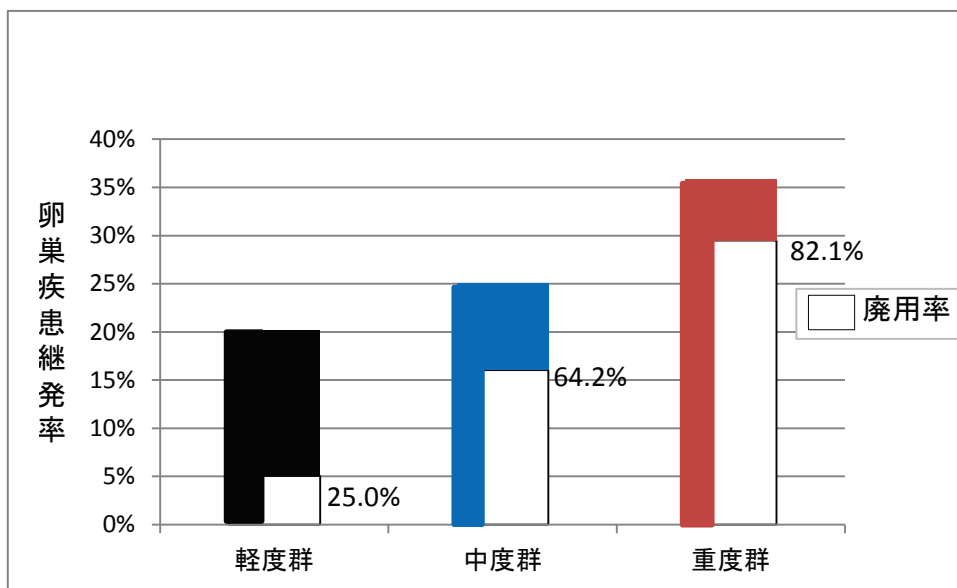


図 2-11 肝脂肪沈着度別卵巣疾患の継発率と予後

### 3-6-3 乳房炎の継発率と予後

乳房炎の継発頭数は 25 頭 (13.3%) であり、軽度群での発症は 12.1% (12 頭)、治癒 58.3% (7 頭)、死廃用 41.6% (5 頭) であった。中度群での発症は 8.9% (5 頭)、治癒 20.0% (1 頭)、死廃用 80.0% (4 頭) であった。重度群での発症は 10.2% (8 頭) であったが、治癒した個体はなく、8 頭全頭が死廃用となった。

### 3-6-4 第四胃変位の継発率と予後

第四胃変位の継発頭数は 9 頭 (4.8%) であり、軽度群での発症は 3.0% (3 頭)、中度群での発症は 5.3% (3 頭) で、2 群ですべてが治癒した。重度群での発症は 3.8% (3 頭) であったが、いずれも術後に食欲の回復が得られず、廃用となった。

### 3-6-5 子宮疾患の継発率と予後

子宮疾患の継発頭数は 6 頭 (3.2%) であり、軽度群での発症は 1.0%、中度群で 1.7% であったが発症頭数はそれぞれ 1 頭であった。重度群での発症は 5.5% (4 頭) で 25.0% (1 頭) が繁殖能力を喪失し廃用となった。

### 3-6-6 その他の疾患の継発率と予後

その他の疾患の継発症として外傷性乳房炎 4 頭、乳房中隔靱帯欠損 2 頭、蹄底腐爛、食滯、膀胱炎、腸捻転、心外膜炎、貧血、悪性腫瘍、産褥熱、熱射病、後大静脈血栓症等各々 1 頭で、発症頭数は 17 頭 (9.0%) であり、軽度群で 10 頭 (10.1%)、中度群で 4 頭 (7.1%)、重度群で 3 頭 (3.8%) であったが、すべてが死廃用となった。

### 3-7 肝脂肪沈着度と血液生化学性状

脂肪肝初診時に採血した 73 頭の血液について蛋白代謝、脂質代謝、糖質代謝、肝機能など 11 項目の血液生化学検査を実施した結果、NEFA では軽度群 (n=25) の  $1005.5 \pm 141.9 \mu\text{Eq/l}$  と中度群 (n=20) の  $1047.5 \pm 88.9 \mu\text{Eq/l}$  に比べ、重度群 (n=28) では  $1428.5 \pm 108.7 \mu\text{Eq/l}$  と有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。また、Glu は軽度群と比べ、中度群 ( $50.2 \pm 3.5 \text{ mg/dl}$ )、重度群 ( $49.2 \pm 3.1 \text{ mg/dl}$ ) で有意に低い値を示した ( $P < 0.01$ )。GOT は軽度群、中度群、重度群の順に上昇を呈し、軽度群と比べ重度群で有意な上昇を認めた ( $P < 0.05$ )。γ-GTP、TG も軽度群と比べて重度群で上昇を呈した。T-Cho は軽度群と比べ中度群、重度群で低下する傾向を認めた。その他の測定項目には異常値および各群間での有意差は認められなかった (表 2-3)。

表 2-3 肝脂肪沈着度別の血液生化学性状

項 目	軽度群 (n=25)	中度群 (n=20)	重度群 (n=28)
BUN (mg/dl)	3.5 ±2.1	13.2 ±1.1	13.1 ±0.6
GOT (IU/l)	114.3 ±12.3 a	135.5 ±21.4	171.4 ±21.2 b
GPT (IU/l)	15.5 ±2.3	20.2 ±3.4	16.2 ±1.6
ALP (IU/l)	4.6 ±0.6	5.1 ±0.6	5.3 ±0.6
γ-GTP (U/l)	28.8 ±3.6	22.1 ±2.3	50.0 ±13.5
T-Bil (mg/dl)	0.8 ±0.2	0.8 ±0.1	0.8 ±0.1
Glu (mg/dl)	72.7 ±8.5 A	50.2 ±3.5 B	49.2 ±3.1 B
TG (mg/dl)	18.1 ±3.2	18.8 ±1.3	28.0 ±6.6
NEFA (μEq/l)	1,005.5 ±141.9 a	1,047.5 ±88.9 a	1,428.5 ±108.7 b
T-Cho (mg/dl)	127.8 ±23.7	89.1 ±8.1	99.7 ±10.9
TP (g/dl)	8.3 ±0.4	7.7 ±0.2	7.7 ±0.2

A/B : P<0.01 , a/b : P<0.05

#### 第4節 考 察

分娩後にケトーシスと診断された乳牛 417 頭に肝生検を実施し病理組織学的に検査したところ、脂肪肝とされる 10%以上の肝脂肪沈着が認められた乳牛は 284 頭 (68.1%) であった。脂肪肝牛の主な臨床症状は、元気消失、食欲不振ないし絶廃、第一胃蠕動減退、尿中ケトン体陽性、起立困難などであり、Morrow ら (1976) の報告と同様であった。泌乳初期における尿中ケトン体の出現は、肝細胞における TG の蓄積によるもので、乾乳期における過剰なエネルギー摂取や分娩後の代謝エネルギー不足に由来している (Reid, 1980、Roberts et al., 1981、 Reid & Roberts, 1982、 Reid et al., 1983)。

肝臓における脂肪沈着度の正確な診断法は現在のところ肝生検以外に見当たらない (Grohn et al., 1983)。従って、肝生検を行うことなく、臨床の現場におけるケトーシスと脂肪肝の明確な判別は困難であり、さらにケトーシスと脂肪肝の併発が多くの症例で認められていることから、類症鑑別を含め、より正確な診断を行うためにも、肝生検による脂肪肝の確定診断の重要性が示唆された。

Reid と Roberts (1983) は血中 Glu 値の低下や血中 NEFA 値の上昇などの血液生化学性状の変化が、脂肪肝に伴う過肥牛症候群

(FCS)において存在することを報告しているが、臨床所見については述べていない。本研究においても、重度脂肪肝牛では血中 Glu 値が低く、血中 NEFA 値が高かったことから、FCS の病態として脂肪肝の発症に至ったことが示唆された。417 頭のケトosis牛のうち 284 頭 (68.1%) が脂肪肝であったが、MPG の投与により 233 頭 (82.0%) が治癒し、51 頭 (18.0%) が死廃用となった。治癒した脂肪肝既往牛 233 頭のうち、80.7% (188 頭) に継発症を認めた。継発症の治癒率は僅か 32.4% (61/188) であり、残りの 67.6% (127/188) は死廃用となった。これより、脂肪肝牛における高い継発症の発症率と、高い死廃用率が注目された。以上のことから、脂肪肝既往牛では臨床症状が改善しても、肝機能を始め何らかの病因や抗病性の低下、あるいは採食や消化、吸収、代謝等を阻害する因子が潜在し、これらが障害となって継発症を多発させているものと思われた。現に、脂肪肝牛の死廃用率 (18.0%) に対し、脂肪肝既往牛の継発症による死廃用率 (67.6%) が約 4 倍 (3.8 倍) に達していることから、分娩後に多発する乳牛の脂肪肝が致命的な周産期疾患と関連することが示唆された。

脂肪肝は肝障害を伴い、様々な生産病の発症と密接に関係してい



る (Coppock et al., 1972、McCormack, 1978、Higgins & Anderson, 1983)。また、脂肪肝は受胎率の低下や、分娩間隔の延長のような繁殖能力にも著しく影響を及ぼしている (Rowlands et al., 1977、Reid et al., 1979a、 Reid et al., 1979b、 Reid et al., 1983)。さらに、脂肪肝牛では血中プロジェステロン値やグルココルチコイド値が減少することが知られており、ホルモン前駆物質であるコレステロールの低下が繁殖能力や免疫力の低下をもたらすことが示唆されている (Morrow, 1976、 Gerloff et al., 1986)。Veenhuizen ら (1991) は、乳牛のケトーシス発症試験において、ケトーシスの徴候が発現する前に脂肪肝は重度に進行しており、ステロイドホルモンの抱合代謝を担う肝酵素である UDP-glucuronosyltransferase (UGT) が低下していることを観察している。Ono ら (2011) は乳牛の 4 日間の短期絶食後の発情期において血中プロジェステロン濃度やエストロジェン濃度が非絶食牛より有意に高いことを観察している。このステロイドホルモン濃度の上昇は、肝血流量が減少することによりホルモン代謝が遅延することによるものと思われる。中・重度の脂肪肝牛における臨床症状の特徴として食欲不振ないし廃絶が挙げられるが (種村ら, 1986)、脂肪肝では肝内血流量が減少することから

ステロイドホルモンのうっ滞による上昇をもたらすものと思われる。  
Silvia ら (2002) は、血中プロジェステロン値が 0.1~1ng/ml とやや上昇した時に、視床下部に作用して LH サージが抑制されて卵胞嚢腫を発症すると報告している。本研究においても、肝脂肪沈着度が上昇するにつれ、卵巣疾患の発症率や廃用率が上昇した。この結果は脂肪肝の進行が肝内血流量や肝 UGT 活性の低下をもたらし、血中プロジェステロン濃度が上昇して卵巣疾患を発症したものと考えられた。

周産期の栄養制御には幾つかの代謝ホルモンが関係しているが、成長ホルモン (GH) やインシュリン様成長因子-1 (IGF-1) が主な調節因子になっている。GH は下垂体前葉から分泌され、主に泌乳制御、インシュリン感受性の低下、脂肪の分解、成牛における肝臓での IGF-1 の刺激などに関与している (Zulu et al., 2002)。IGF-1 は肝臓で主に産生され、一部は他の組織でも産生されるが、そのレセプターは卵胞や黄体にも存在する (Zulu et al., 2002、 Kawashima et al., 2007)。IGF-1 は卵胞刺激ホルモン(FSH)の卵胞感受性を増加させたり、顆粒層細胞における LH レセプター作用により卵胞発育に重要な役割を果たしている (Zulu et al., 2002、 Kawashima et al.,

2007)。IGF-1 は卵胞の顆粒層細胞の増殖を刺激し (Glister et al., 2001、Armstrong et al., 2003、Bulter et al., 2004、Bulter et al., 2006)、ステロイドホルモン産生を促進している (Spicer et al., 1993)。さらに IGF-1 は性腺への栄養状態の変化に対するシグナルを介して内分泌機能の調節に重要な役割を果たしている (Zulu et al., 2002、Patton et al., 2007)。IGF-1 は分娩後の初回排卵にも関係しており、高い IGF-1 濃度とインシュリン濃度は分娩後初回卵胞ウェーブの主席卵胞の成長と最終段階の成熟を刺激する (Kwashima et al., 2007)。IGF-1 の産生と分泌は肝臓で行われるが、脂肪肝による肝機能の低下が IGF-1 の産生と分泌を抑制することから、脂肪肝が卵巣疾患の発症に関与することが考えられる。本研究において、卵巣疾患の発生率と廃用率は肝脂肪沈着度の上昇に伴い増加しており、肝機能と卵巣疾患発症との間に密接な関係のあることが示唆された。脂肪肝は牛の廃用後に屠場などで確認されることが多いが、肝生検は生体の脂肪肝レベルを確認できる最も信頼性のある方法である。また、顕微鏡検査での組織に占める脂肪量を推定することにより、脂肪肝のグレード判定が可能となり、予後判定にも繋がっている。

中度の脂肪肝牛に、グルカゴン 15mg を 8 時間毎に 14 日間投与し

た試験では、分娩後の高体温期間の減少や乳房炎の発生率を減少させている (Bobe et al., 2007)。また、グルカゴン (10mg/日) の 14 日間静脈内連続投与により、重度脂肪肝レベルを軽減する効果があることを報告している (Hippen et al., 1999)。このように重度脂肪肝牛の治療には集中的かつ長期間の治療を必要とすることから、脂肪肝の治療に関する研究は今後の大きな課題として残されている。

以上のことから、卵巢疾患発症率と廃用率は肝脂肪沈着度が上昇するに伴い増加し、特に 60%以上の重度群では廃用率が極めて高くなり、さらに他疾患でも同様の転帰になることが明らかになった。

## 第5節 小 括

臨床症状から分娩後ケトーシスと診断された乳牛 417 頭中、肝生検による病理組織学的検査で 10%以上の肝脂肪沈着を認めた 284 頭全ての脂肪肝牛に肝臓賦活・底護剤である MPG を投与した。51 頭は死廃用となったが、233 頭が治癒し、その後 188 頭が継発症を発症した。継発症のうち、肝障害の継発が 69 頭 (36.7%)、卵巢疾患の継発が 62 頭 (33.0%) であり 2 者で 69.7%と高い継発率を認めた。これに、乳房炎 (13.3%) の継発症を含めると 83.0%の継発率で

あった。このように継発症が多発する状況下で、特に次期妊娠に関わる卵巣疾患の継発状況と予後について検討を加えた。卵巣疾患の継発率と予後には他の継発症同様、肝脂肪沈着度と高い相関が見られた。軽度群における卵巣疾患の継発率と廃用率は 20.2%と 25.0%であり、中度群における継発率と廃用率は 25.0%と 64.2%であった。重度群では継発率 35.8%の中、繁殖機能喪失による廃用率が 82.1%であり、重度群の卵巣疾患の継発率と廃用率が軽度群や中度群より有意に高い結果であった。

以上の結果から、脂肪肝牛における継発的卵巣疾患の発生率と廃用率は肝脂肪沈着度が上昇するにつれて高くなり、特に肝臓脂肪沈着度が 60%以上の重度群では廃用率が著しく高く、ほとんどが 305 日以内の死廃用に繋がることが判明した。

## 第3章

### 卵胞嚢腫牛の肝 UDP-グルクロン酸転移酵素活性と 肝疾患との関係

## 第1節 序 言

乳牛の乾乳期から泌乳期の移行期における代謝の変化と、中度ないし重度の負のエネルギーバランスのために、周産期に脂肪肝を呈する乳牛は50%以上に達するとされている (Jorristma et al., 2000、Jorritsma et al., 2001、 White, 2015)。脂肪肝は周産期疾患の主要原因であり (Bobe et al., 2004 、 Veenhuizen et al., 1991 、 Wada et al., 1995)、繁殖障害にも密接に関係している (Butler et al., 1981 、 Rukkwamsuk et al., 1999 、 Staples et al., 1990)。著者らは、分娩後において中度から重度の脂肪肝を呈した乳牛は卵胞嚢腫を含め様々な継発症を引き起こし、多くの牛は乳期の305日以内に死亡または廃用になることを報告している (Tanemura et al., 2016)。乳牛の卵胞嚢腫は分娩後早期に発症するものが多く (Sakaguchi, 2011)、分娩後初回卵胞ウエーブの23%が卵胞嚢腫に移行するとの報告がある (Beam & Butler, 1997、 Beam & Butler, 1999)。卵胞嚢腫の発症には2つのピークがあり、1つは分娩後30～40日 (Bartlett et al., 1986)、もう1つは分娩後190～220日 (Bartlett et al., 1986 、 Kittok et al., 1974) であり、分娩後3カ月以内に卵胞嚢腫の70%が発症すると報告されている (Laporte et al., 1994)。この卵胞嚢腫多

発時期は脂肪肝発症多発時期（分娩後 1～5 週間）とかなり重複している（Geelen & Wensing, 2006）。発症した卵胞嚢腫は自然治癒し、発情周期を回帰するものもあるが、過半数は卵胞嚢腫を繰り返す（ターンオーバー）（Cook et al., 1990、 Silvia et al., 2002）。卵胞嚢腫の共存卵胞がターンオーバーするときエストロゲン濃度が上昇し（Kengaku et al., 2007、 Yoshioka & Iwamura, 1996）、卵胞嚢腫のエストロゲン濃度は発情周期時より高値になる（Kittok et al., 1974、 Hamilton et al., 1995、 Vanholder et al., 2005、 Vanholder et al., 2006）。ラットでは、卵胞嚢腫になる前のエストロゲン濃度の上昇が、視床下部のプロジェステロンレセプターを増加させるとの報告（Simerly et al., 1996）がある。羊においてもエストラジオールが子宮組織のプロジェステロンレセプターmRNAを増加させることが知られている（Ing & Tornesi, 1997）。

臨床的に卵胞嚢腫の発生率は 6～19%とされており（Silvia et al., 2002）、治療せず放置した場合、卵胞嚢腫の半数は共存卵胞のターンオーバーを繰り返す（Cook et al., 1990、 Sakaguchi et al., 2006、 Silvia et al., 2002）。卵胞嚢腫のターンオーバーを繰り返す原因や機序は不明であるが、同じ時期にしばしば発症する肝疾患との関係に



については検討されていない。

本研究ではステロイドホルモンを代謝する肝機能に焦点を当て、肝臓の主要な抱合酵素である肝 UDP-グルクロン酸転移酵素（肝 UGT）活性値と乳牛の卵胞嚢腫発症との関連について検討した。

## 第 2 節 材料および方法

### 2-1 供試牛

水戸市近郊の 23 農家で飼養されているホルスタイン種乳牛 70 頭（卵胞嚢腫牛 62 頭、正常発情周期牛 8 頭）を対象とした。供試牛は全てがタイストール牛舎で管理され、分娩前は乾牧草（チモシー、オート麦、イタリアンライグラスなど）を中心に給与し、分娩 1 週間前から配合飼料が加えられた。分娩後はルーサン、チモシー、オート麦などの乾牧草とヘイキューブ、コーンサイレージ等の粗飼料を基本に、乳量に応じた配合飼料を給与するという飼養形態である。

卵胞嚢腫の診断は直腸検査法により行った。人工授精後約 30 時間に排卵確認を目的に直腸検査を行い、発情徴候の有無に関わらず卵胞が遺残していた排卵障害の個体や、分娩後 60～90 日の繁殖検診で卵胞嚢腫が疑われた個体を対象とした。これらについて 7 日間隔

で2回の直腸検査を行い、卵胞の大きさ、卵胞の波動性、外陰部の形状、性行動的な所見に基づき、波動感のある直径 25 mm 以上の卵胞が持続的に残存し、黄体の共存を認めないものを卵胞嚢腫と診断した。62 頭の卵胞嚢腫牛は分娩後  $94.4 \pm 7.6$  日に診断され、正常発情周期牛は分娩後  $89.3 \pm 14.6$  日に確認した。

## 2-2 肝生検

初診時に行った肝臓穿刺は、牛用肝臓穿刺器（富士平工業、東京）を用いて、Ono らの方法(2011)に準じて行った。採取した肝臓組織（約  $1.5\text{cm}^3$ ）は血清凍結チューブに入れて、肝 UGT 活性測定まで液体窒素（ $-196^\circ\text{C}$ ）内で保管した。卵胞嚢腫牛と正常発情周期牛の合計 70 頭の肝生検組織は基質代謝法による UGT 活性測定に供した。また、組織の一部は病理組織検査のためにフォルムカルシウム液で保存した。

## 2-3 病理組織検査

病理組織学的診断はヘマトキシリン・エオジン（H-E）染色、ズダンⅢ染色、ナイルブルー染色標本の組織所見に基づいて行った。H-E 染色組織内にリンパ球や好中球などの炎症細胞の浸潤を認めた

ものを肝炎と診断した。H-E 染色により肝臓組織に空胞形成を認めたものについては、ズダンⅢ、ナイルブルーにより脂肪染色を実施し、10%以上の脂肪沈着を認めたものを脂肪肝と診断した。肝炎や肝細胞変性を伴った脂肪肝牛は肝疾患に分類した。

## 2-4 肝 UGT の測定と方法

肝 UGT 活性値の測定は過去の報告 (Rao et al., 1977) を一部修正して測定した。超遠心用チューブに半融解の肝湿重量約 0.25 g と 4 倍量の氷冷した 0.15 M 塩化カリウムを入れて眼科ばさみで細切した。懸濁液はテフロンーガラス管(5 ml)に移し、ホモジナイザー (B. Brun Melsungen, Wendelstreinstr, Germany) を使い、氷冷しながら 1000 rpm で 60 秒ホモジナイズした。全ホモジナイズ液は超遠心管に移し、9,000 xg, 4 °C、15 分間遠心し、上清をさらに 105,000 xg, 4 °C、1 時間超遠心した (Beckman Coulter Inc., Brea, USA)。超遠心上清を捨てて、沈査に 250  $\mu$ l の 0.25 M ショ糖-0.1 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.4) を加えて、懸濁し、このミクロゾーム分画をサンプルとした。予備試験で正常周期牛の肝ミクロゾーム分画の 0, 5, 15, 20  $\mu$ l を用いて測定したところ、0~10  $\mu$ l で直線性が得られたので、サンプル量は 5  $\mu$ l とした。5  $\mu$ l サンプルを用いて 0~20 分の時

間設定試験を行った結果から 10 分間を反応時間と設定した。各サンプルは 2 重測定を行った。

サンプルを含んだ試験管は氷冷水に浸し、 $250\ \mu\text{l}$  の  $0.25\ \text{M}$  ショ糖- $0.1\ \text{M}$  トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.4)、 $20\ \mu\text{l}$  の  $1\text{mg/ml}$  牛血清アルブミン (Sigma Chemical Co., St Louis、 USA)、 $50\ \mu\text{l}$  の  $0.1\ \text{M}$  塩化マグネシウム、 $100\ \mu\text{l}$  の  $10\text{mM}$  UDP-グルクロン酸 (Sigma Chemical Co., St. Louis、 USA)、 $5\ \mu\text{l}$  のマイクロゾーム分画、 $1.88 \times 10^5$  dpm ( $100\ \mu\text{l}$ ) の  $[4\text{-}^{14}\text{C}]$  エストラジオール- $17\beta$  (比放射能  $58.2\ \text{Ci mMol}^{-1}$ , New England Nuclear Co., Boston、 USA) を加えて攪拌し、 $37^\circ\text{C}$ 、10 分間、120 回/分で振盪させながら反応させた。反応液に  $200\ \mu\text{l}$  のエタノールを加えて、直ちに攪拌した。さらに  $1\ \text{ml}$  の蒸留水を加えて攪拌の後、 $5\ \text{ml}$  のクロロホルムを加えて攪拌した。混合液は振盪器で 2 分間激しく攪拌した後に、 $3000\ \text{rpm}$ 、15 分間遠心分離した。 $500\ \mu\text{l}$  の上清と  $2\ \text{ml}$  の液体シンチレーターを合わせて攪拌した後に、液体シンチレーション測定器 (Hitachi Aloka Medical, Ltd., Tokyo) を使って放射活性を測定した。マイクロゾームの蛋白濃度は牛血清アルブミンを標準として Lowry らの方法 (1951) で測定した。酵素活性値は  $\text{pM/min/mg protein}$  で算出し、2 つの測定値

の平均値とした。本測定における測定内変動係数は 8%であった。

## 2-5 統計分析

統計分析は統計分析ソフト JMP 11.2.0(SAS INS, Japan)を使って行った。群間比較はノンパラメトリック・ウイルコクソン検定、比率は $\chi^2$ 二乗検体を行った。測定結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で表し、5%水準以下で有意差を求めた。

## 第3節 結 果

### 3-1 卵胞嚢腫牛と正常発情周期牛における肝 UGT 活性値の比較

卵胞嚢腫牛と正常発情周期牛の肝 UGT 活性値は  $2.19 \pm 0.15$  pM/min/mg protein と  $4.28 \pm 0.22$  pM/min/mg protein であり（図 3-1）、卵胞嚢腫牛の値は正常発情周期牛の値より有意に低値であった ( $P < 0.01$ )。正常発情周期牛と同じ時期である分娩後 60～90 日の範囲に限定しても、卵胞嚢腫牛の値は  $2.30 \pm 0.36$  pM/min/mg protein (n=21) であり、正常発情周期牛の値(n=8)より有意に低値であった ( $P < 0.05$ )。

### 3-2 肝疾患牛における肝 UGT 活性値

卵胞囊腫牛における肝疾患と肝 UGT 活性値との関係性について検討した。卵胞囊腫牛 62 頭の肝臓穿刺材料について、H-E 染色、ズダンⅢ染色、ナイルブルー染色による病理組織検査を行った結果、62 頭中 30 頭に肝病変を認めたが、32 頭には肝病変を認めなかった。肝病変を認めた群を肝疾患群、肝病変を認めなかった群を非肝疾患群とした 2 群に区分して検討を加えた。さらに、肝疾患群を病理学的所見から肝炎群 (n=13)、脂肪肝群 (n=11)、脂肪肝と肝炎が合併した合併群 (n=6) の 3 群に区分した。肝疾患の有無による肝疾患、非肝疾患両群の肝 UGT 活性値は肝疾患群で  $1.57 \pm 0.12$  pM/min/mg protein、非肝疾患群で  $2.78 \pm 0.23$  pM/min/mg protein であり、正常発情周期牛の  $4.28 \pm 0.22$  pM/min/mg protein に比べ有意に低値であった ( $P < 0.01$ )。従って、肝 UGT 活性値は肝疾患の有無に関係なく、卵胞囊腫牛では正常発情周期牛より低値であった (図 3-2)。一方、肝 UGT 活性値と分娩後日数との間に明瞭な傾向は観察されなかった (図 3-3)。しかしながら、正常発情周期牛と同一ステージである分娩後 60~90 日に限定して検討したところ、肝疾患群と非肝疾患群の UGT 活性値はそれぞれ  $1.27 \pm 0.20$  pM/min/mg protein と  $3.10 \pm 0.51$  pM/min/mg protein であり、肝疾患群では一貫して低値を示

したが、非肝疾患群では正常発情周期群と同じレベルを示す例も見られ、有意差を認めなかった。

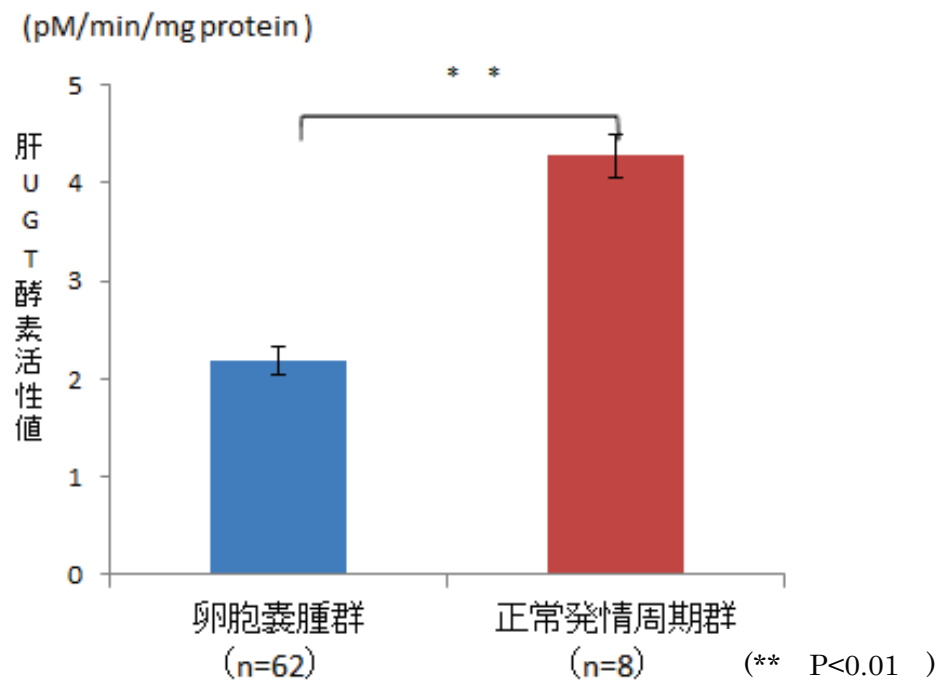


図 3-1 卵胞嚢腫群と正常発情周期群における肝 UDP-グルクロン酸転移酵素活性値の比較

棒グラフは平均値±標準誤差を示す。群間の有意差 (\*\* P<0.01) はウイルコックソン検定による。



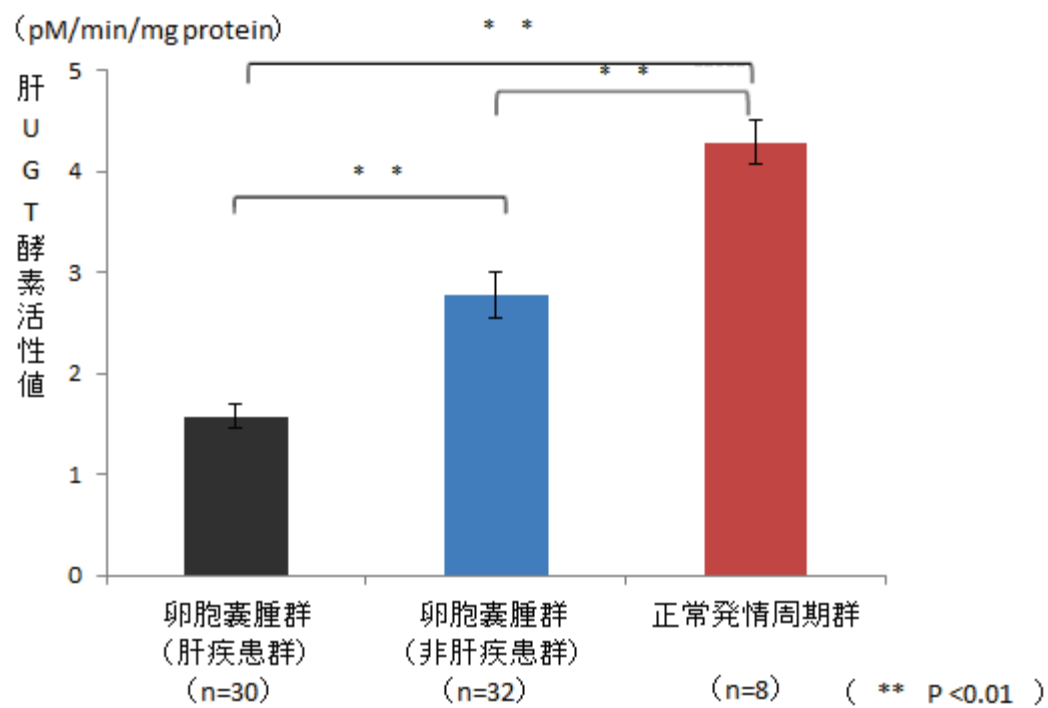


図 3-2 肝疾患の有無による卵胞嚢腫群における肝 UDP-グルクロン酸転移酵素活性値の比較

棒グラフは平均±標準誤差を示す。群間の有意差 (\*\* P<0.01) はウィルコックソン検定による。

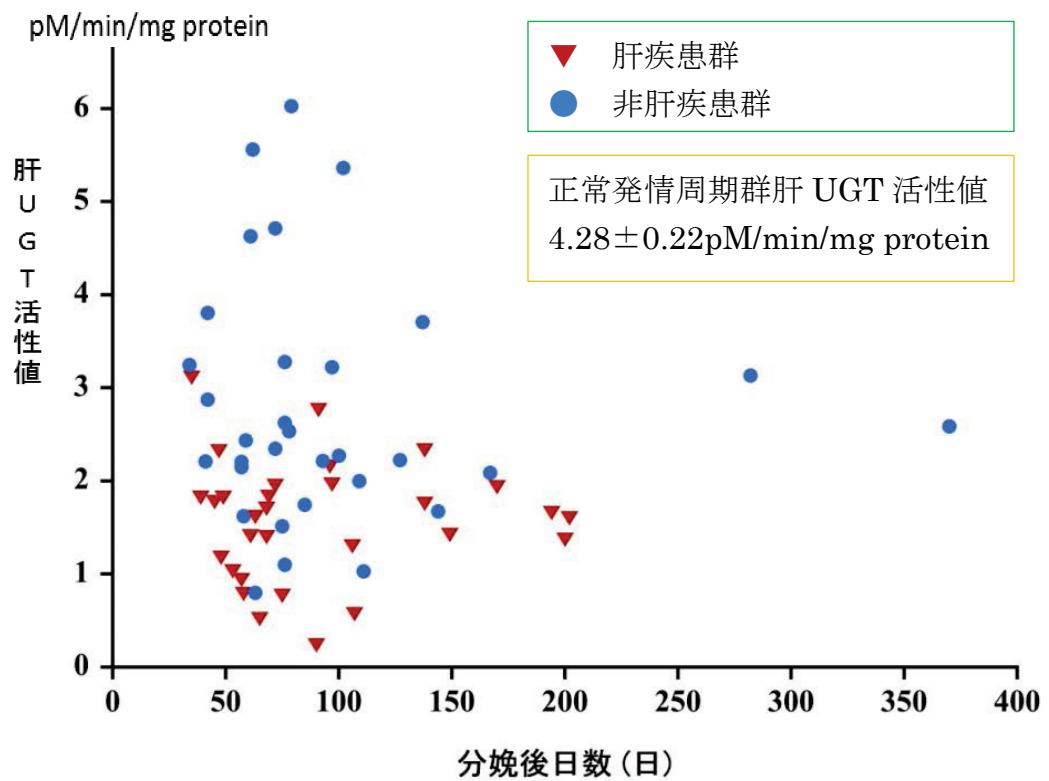


図 3-3 卵胞嚢腫牛の肝疾患の有無別による肝 UDP-グルクロン酸転移酵素活性値と分娩後経過日数の推移

### 3-3 肝 UGT 活性値別の卵胞嚢腫発症率と肝疾患の併発率

肝 UGT 活性値に基づき 3 群に区分して卵胞嚢腫と肝疾患併発率を検討した。肝 UGT 活性値が 2.0 pM/min/mg protein 以下の群を低値群 (n=31) と区分したところ、低値群の活性値平均は  $1.37 \pm 0.08$  pM/min/mg protein であった。2.0~3.0 pM/min/mg protein の群を中間値群 (n=18) と区分したところ、活性値平均は  $2.35 \pm 0.06$  pM/min/mg protein であった。3.0 pM/min/mg protein 以上の群を高値群 (n=12) と区分した活性値平均は、 $4.15 \pm 0.31$  pM/min/mg protein であった。肝 UGT 低値群、中間値群、高値群における卵胞嚢腫の発症率は 51.6% (32/62)、29.0% (18/62)、19.4% (12/62) であり、UGT 活性値が低い群での発症が明らかに高率であった。また、肝 UGT 低値群、中間値群、高値群における肝疾患の割合は 78.1% (25/32)、22.2% (4/18)、8.3% (1/12) であり、低値群における肝疾患の割合が他群より有意に高かった (図 3-4、 $P < 0.01$ )。

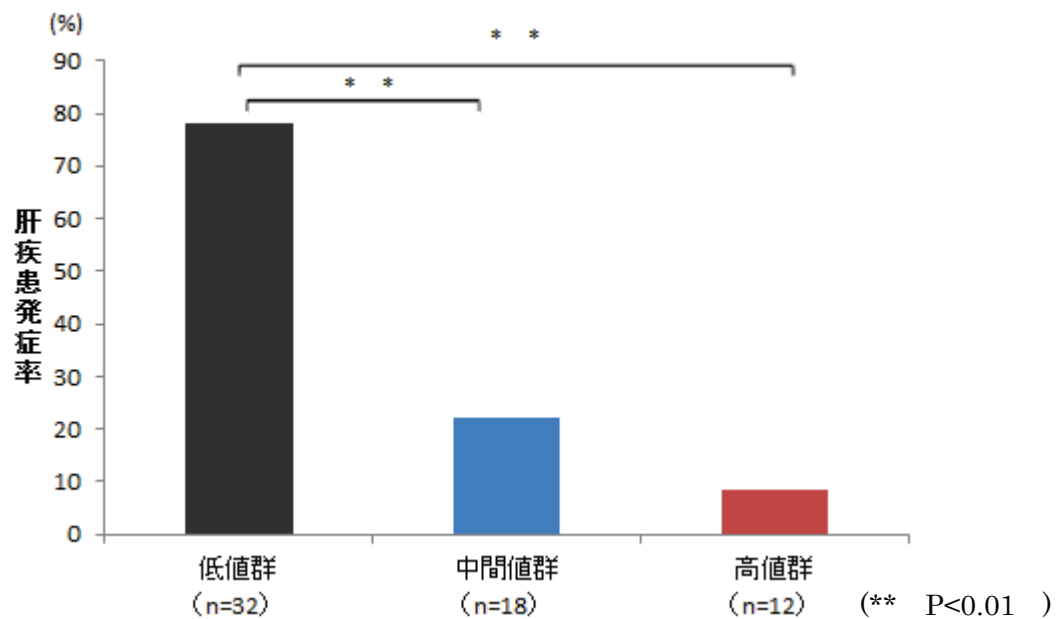


図 3-4 卵胞嚢腫発症時における肝 UDP-グルクロン酸転移酵素活性値と肝疾患発症率との関係

卵胞嚢腫乳牛における肝 UDP-グルクロン酸転移酵素活性値を低値、中間値、高値の 3 群に区分した場合の肝疾患の発生率。有意差(\*\*)は  $P<0.01$  の危険率を示す。

#### 第4節 考 察

卵胞嚢腫牛において、エストラジオール-17 $\beta$ を基質とし肝 UGT 活性値を測定した。エストロジェンは肝臓で第Ⅱ相代謝酵素である肝 UGT により抱合され、腸肝循環を経由して尿や糞に排泄される (Xu et al., 2012)。Rao ら(1977)は、卵巢を摘出したラットにおいてエストロン肝 UGT 活性値がエストラジオール-17 $\beta$ の連続投与 6 日以降に増加することを認めているが、卵巢を摘出していない正常ラットではエストラジオール-17 $\beta$ の投与によるエストロン・肝 UGT 活性値の増加を認めていない。乳牛を対象とした、著者らのエストラジオール-17 $\beta$ 連続投与の実験においても、乳牛の発情周期の 0, 7, 14, 21 日における肝 UGT 活性値に有意な変動は認めなかった。従って、牛発情周期における短期的なエストロジェン濃度の増加では肝 UGT 活性に影響しないことが示唆された (未発表データ)。

本研究において、エストラジオール-17 $\beta$ を基質として卵胞嚢腫牛の肝 UGT 活性を測定したところ、正常発情周期牛の値より有意に低値を示した(P<0.05)。このことからエストロジェン抱合代謝の遅延が示唆された。また、卵胞嚢腫牛を肝 UGT 活性値の低値群、中間値群、高値群に区分したところ、肝 UGT 低値群に卵胞嚢腫が 51.6%

含まれ、肝疾患の割合は低値群で 78.1%(25/32)、中間値群で 22.2%(4/18)、高値群では 8.3%(1/12)と低値群で有意に高率であった。この結果は肝疾患が卵胞嚢腫発症に密接に関係していることを示唆している。Veenhuizen ら(1991)は乳牛を使ってケトーシス発症試験を行っているが、ケトーシス症状を示す前に重度の脂肪肝や肝 UGT 活性値の低下を観察しており、我々の結果と一致している。しかしながら、分娩後 60~90 日に限定してみると、正常発情周期群と非肝疾患群との肝 UGT 活性値に有意差はなく、この時期における卵胞嚢腫の発症は肝 UGT 活性の減少に起因しないことが示唆された。卵胞嚢腫と肝内血流量との関係は明らかでないが、Wiltbank ら(2006)は高泌乳牛の肝血流量は低泌乳牛より多く、これに伴う肝臓におけるステロイドホルモン代謝量の増加が、高泌乳牛における発情徴候減退の理由としている。Ono ら(2011)は乳牛の 4 日間絶食直後の発情期において、絶食をしない自由給餌群に比較して血中エストロジェンとプロジェステロン濃度が有意に高いことを報告している。その理由として絶食による肝内血流量の減少がステロイドホルモンの代謝を遅延させたためとしている。さらに飢餓状態では、エストラジオール-17 $\beta$  は肝脂質とトリグリセリドを肝臓に蓄積させ、超低密度

リポ蛋白質濃度を増加させるが、これが脂肪肝の成立を促進する (Grummer et al., 1990)。Silvia ら (2002) は発情期血中プロジェステロンが基礎値をやや上回る 0.1~1ng/ml (中間値) の時、視床下部 LH サージ中枢は抑制され、卵胞嚢腫を誘導することを示唆している。Vanholder ら(2005)も卵胞嚢腫の存在時に基礎値を上回るプロジェステロン値が中間値であることを報告しているが、そのようなプロジェステロン増加の起こる理由については述べていない。これらの結果が末梢血のステロイド代謝状況を完全に説明している訳ではなく、今後の検討を必要とする。卵胞嚢腫牛の肝 UGT 活性値が低いことから、肝賦活剤の投与が卵胞嚢腫の有用な治療手段になることを前提に、卵胞嚢腫牛に肝賦活剤を投与したところ、高い治療効果を認めている (第 6 章)。

結論として、肝臓におけるエストラジオール- $17\beta$  に対するグルクロン酸抱合能の低下および肝疾患は、乳牛の卵胞嚢腫発症と密接に関連していることが示唆された。

## 第 5 節 小 括

卵胞嚢腫乳牛の肝 UDT-グルクロン酸転移酵素 (肝 UGT) 活性値

を放射性エストラジオール- $17\beta$  を基質として測定した。卵胞嚢腫牛の肝 UGT 活性値は正常発情周期牛と比べ有意に低値であった

( $P<0.01$ )。脂肪肝や肝炎などの肝疾患を有する牛の 48.4% に卵胞嚢腫が観察され、それらの肝 UGT 活性値は正常発情周期牛の値より有意に低値であった。さらに、肝疾患を持たない卵胞嚢腫の肝 UGT 活性値も正常発情周期牛と比べ有意に低値であった。肝 UGT 活性値を低値群、中間値群、高値群の 3 群に区分して、肝疾患との関連について検討したところ、肝 UGT 活性値の低値群では肝疾患が 78.1% 含まれたのに対し、中間群では 22.2%、高値群では 8.3% であった。これらの結果から、肝臓におけるエストラジオール- $17\beta$  ・UGT 活性の低下および肝疾患が乳牛の卵胞嚢腫発症に密接に関係することが示唆された。しかしながら、分娩後 60～90 日に限定した場合の非肝疾患群と正常発情周期群との間における肝 UGT 活性値には有意差はなく、非肝疾患における卵胞嚢腫発症には他の要因が関与することが示唆された。



## 第4章

### 脂肪肝牛における胆汁中ステロイドホルモンに関する研究

## 第1節 序 言

水溶性の低いステロイドホルモンの大部分は血中の蛋白質と結合して安定性を保っているが（結合型）、その存在が僅か数%の遊離型は標的組織で作用した後に肝臓で速やかに代謝される。遊離型ステロイドホルモンは肝臓における酸化、還元、グルクロン酸抱合または硫酸抱合により生物学的活性を失い、最終的には胆汁中に放出された後に、尿中または糞便中に排泄される（本庄、1979）。中でもエストロジェンは、主要代謝酵素である肝 UDP-グルクロン酸転移酵素（UGT）によってグルクロン酸抱合することが知られている（You, 2004）。一方、抱合型は嫌氣的細菌群の酵素類（ $\beta$ -グルクロニダーゼ、 $28\beta$ -グルコシダーゼ、アゾ還元酵素）により、主に還元と加水分解を受けて遊離型となり、再び腸管から吸収されて肝臓に戻るが（腸管循環）（Norin et al., 1991）、一部のエストロジェンは全身的に血液循環をする（本庄、1979）。ヒトでは肝疾患における高エストロジェン症候群の発症が知られている（Barr & Sommers, 1957）が、牛におけるエストロジェンの代謝異常並びに肝臓機能との関連についてはあまり検討されていない。

常包ら(1956)は、肝機能障害により肝のエストロジェン不活性化能

が低下し、血中エストロゲン濃度が上昇する結果、下垂体ホルモンの分泌異常により卵胞嚢腫を発生させるとの仮説を立てた。そこで、肝疾患を伴った卵胞嚢腫牛にメチオニンとビタミンCを投与し、hCG製剤に反応しなかった卵胞嚢腫牛が治癒した例を報告している。著者らも、乳牛の脂肪肝既往牛の卵胞嚢腫牛に肝賦活剤であるチオプロニン製剤（参天製薬、大阪）を投与した結果、84.2%の高い治癒率を認めている（未発表、第6章）。

以上のことから、脂肪肝乳牛におけるステロイドホルモンの肝臓での代謝が正常牛と異なることが示唆された。これより、本研究では従来の化学的測定法より精度の高い放射免疫測定法(RIA)で胆汁中のステロイドホルモン濃度を測定し、正常肝牛と脂肪肝牛における肝臓のステロイドホルモン代謝能について比較検討した。

## 第2節 材料および方法

材料は北海道根室と畜場（81頭）、東京都芝浦と畜場（50頭）および横浜市と畜場（157頭）においてと殺されたホルスタイン系種乳牛288頭から肝臓および胆汁を採取し、胆汁はRIA測定まで-20℃で凍結保存した。肝臓組織は10%燐酸緩衝ホルマリン液で固

定し、常法に従いヘマトキシリン・エオジン（H-E 染色）、ズダンⅢ染色、ナイルブルー染色を施した。これらについて脂肪沈着率を Reid(1980)の区分に従い、肝実質に占める脂肪の割合から、10%未満の正常肝群、10%以上 30%未満の軽度脂肪肝群と 30%以上の中・重度脂肪肝群に区分した。胆汁中のエストロジェンの測定は Tsumagari ら(1993) の報告に準じて、エストロン(E1)、エストラジオール-17β(E2)およびエストリオール(E3)をゲル濾過クロマトグラフィー法（Sephadex LH-20<sup>®</sup>、GE ヘルスケアジャパン）により分画した後に RIA 法により測定した。コルチゾールは牧野(1973)の方法に準じて直接 RIA 法により測定した。各ステロイドホルモンは E1-6 カルボキシ・メチル・オキシーム-BSA、E2-6 カルボキシ・メチル・オキシーム-BSA、E3-6 カルボキシ・メチル・オキシーム-BSA、コルチゾール-6 カルボキシ・メチル・オキシーム-BSA を抗原とした抗血清（あすか製薬、東京）を用いた。

### 第3節 結 果

#### 3-1 と場材料における脂肪肝の発生状況

採取した 288 例のうち正常肝は 179 例（62.2%）、脂肪肝は 109

例（37.8％）であった。また、軽度群は 65 例（59.6％）、中・重度群は 44 例（40.4％）であった。脂肪肝牛 109 例について採取したと場別に脂肪肝の検出率を比較したところ、北海道 71.6％（58/81）、東京 52.1％（26/50）、横浜 15.9％（25/157）とに地域差異を認めた（図 4-1）。

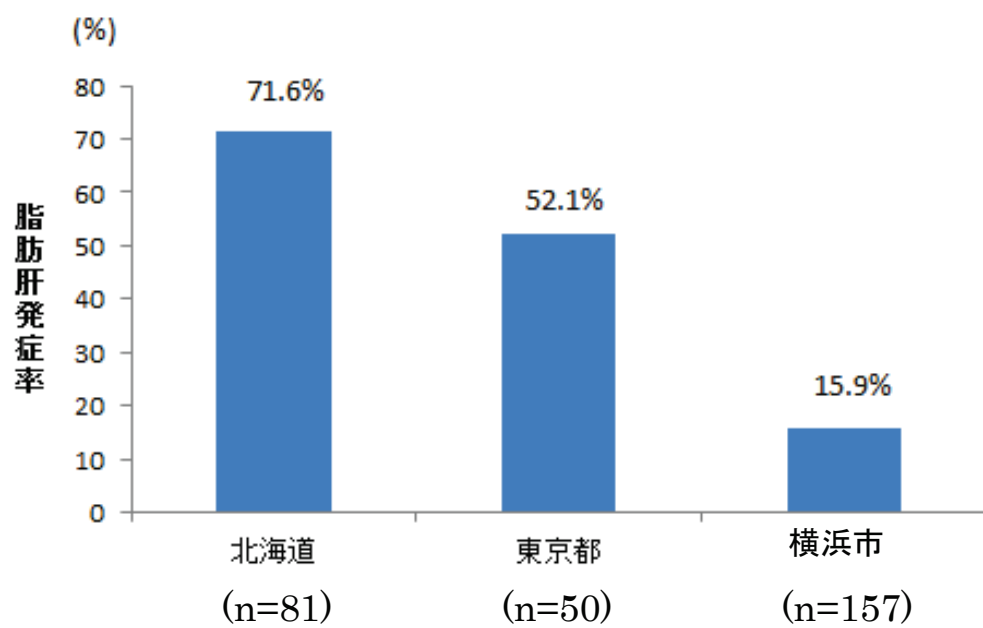


図 4-1 と場別の脂肪肝検出率

### 3-2 正常肝牛と脂肪肝肝牛の胆汁中非抱合型エストロジェン3分画の比較

胆汁中  $E_1$  値は正常肝群の  $0.24 \pm 0.03$  ng/ml に対し、軽度群では  $0.66 \pm 0.16$  ng/ml、中・重度群では  $1.05 \pm 0.29$  ng/ml と有意に高い値を示した ( $P < 0.01$ ) (図 4-2)。また、 $E_2$  値は正常肝群の  $0.06 \pm 0.009$  ng/ml に対し、軽度群では  $0.17 \pm 0.041$  ng/ml、中・重度群では  $0.23 \pm 0.058$  ng/ml と肝脂肪沈着度の進行に対し増加の傾向が認められ、正常肝群の  $E_2$  値に対し中・重度群では有意に高い値を示した ( $P < 0.01$ ) (図 4-3)。同様に、 $E_3$  値においても正常肝群では  $0.02 \pm 0.003$  ng/ml、軽度群では  $0.03 \pm 0.003$  ng/ml、中・重度群では  $0.08 \pm 0.031$  ng/ml と増加の傾向を認め、正常肝群の  $E_3$  値に対し中・重度群では有意に高い値を示した ( $P < 0.01$ )。

### 3-3 正常肝牛と脂肪肝肝牛の胆汁中非抱合型コルチゾール値の比較

コルチゾール値については正常肝群のコルチゾール値  $11.8 \pm 0.7$  ng/ml に対し、軽度群では  $12.4 \pm 1.1$  ng/ml、中・重度群では  $24.0 \pm 6.7$  ng/ml と高値を示し、正常肝群および軽度群に対して中・重度群で有意に高値を示した ( $P < 0.01$ ) (図 4-4)。

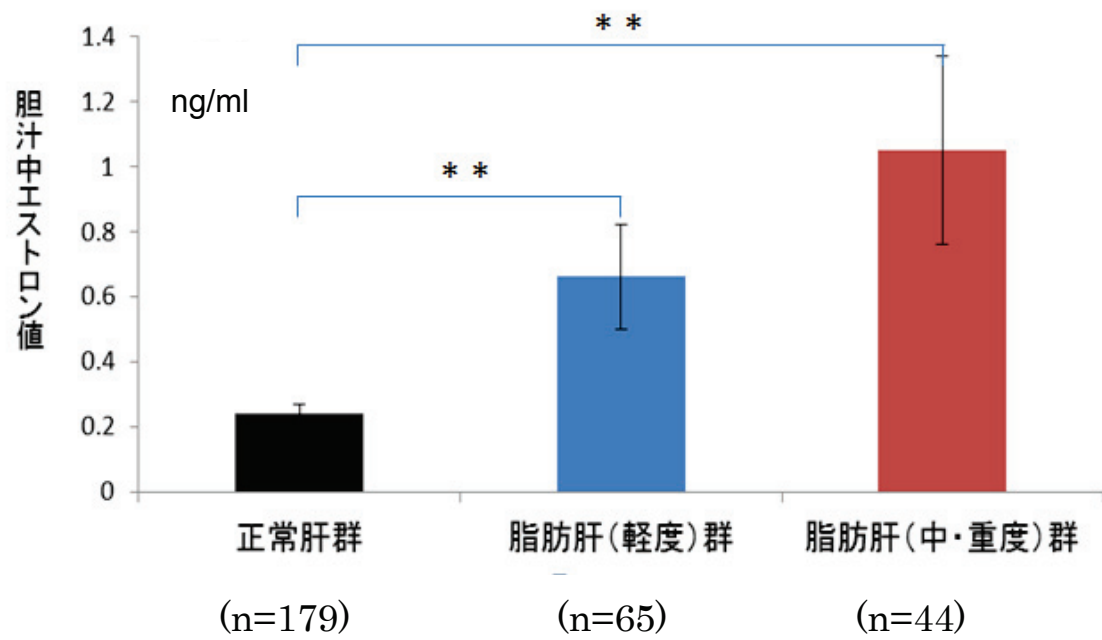


図 4-2 正常肝群と脂肪肝牛の胆汁中エストロン値の比較

\*\*正常肝群、軽度脂肪肝群、中・重度群との間に有意差 (P<0.01)



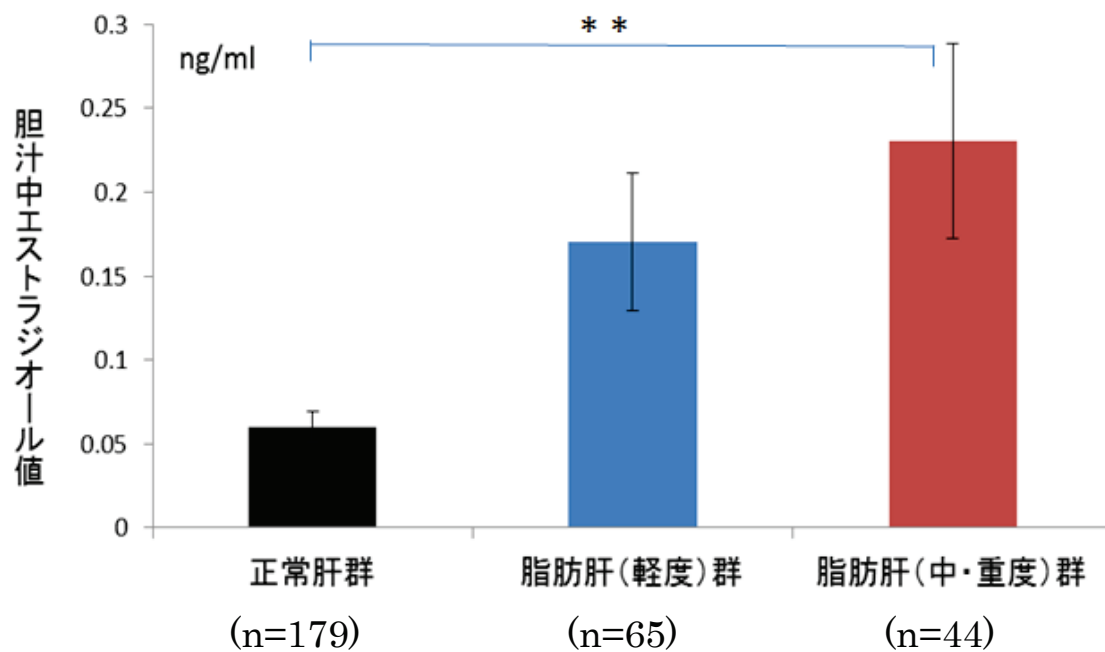


図 4-3 正常肝群と脂肪肝群の胆汁中エストラジオール-17β 値

の比較 \*\*正常肝群と脂肪肝群との間に有意差 (P<0.01)

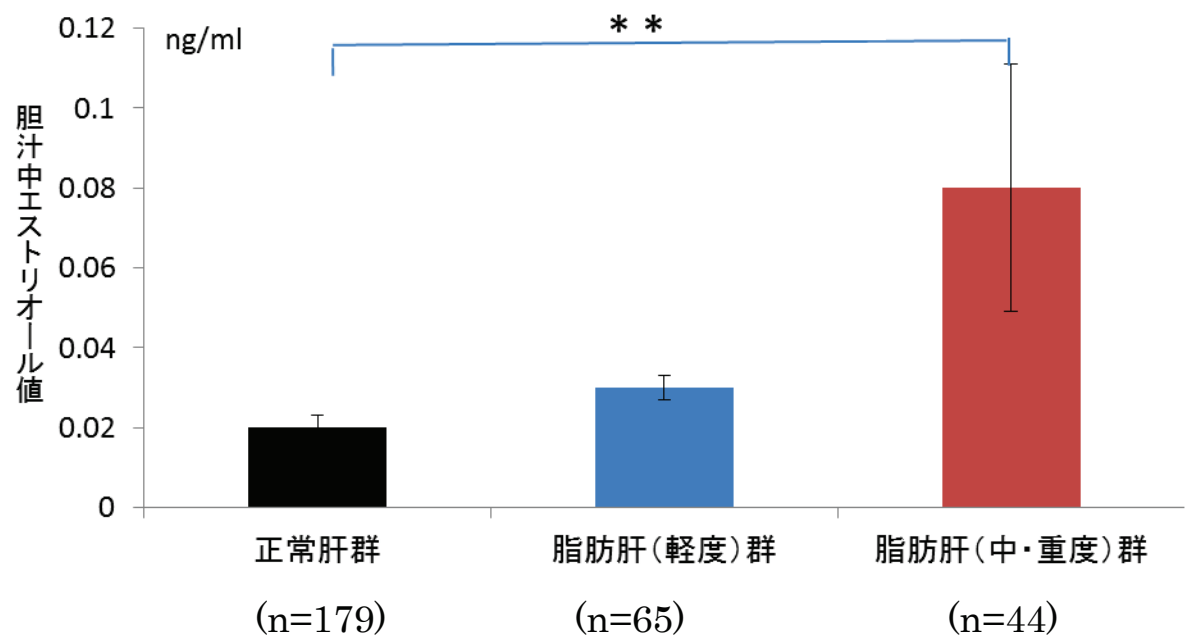


図 4-4 正常肝群と脂肪肝群の胆汁中エストロール値の比較

\*\*正常肝群と脂肪肝群との間に有意差 (P<0.01)

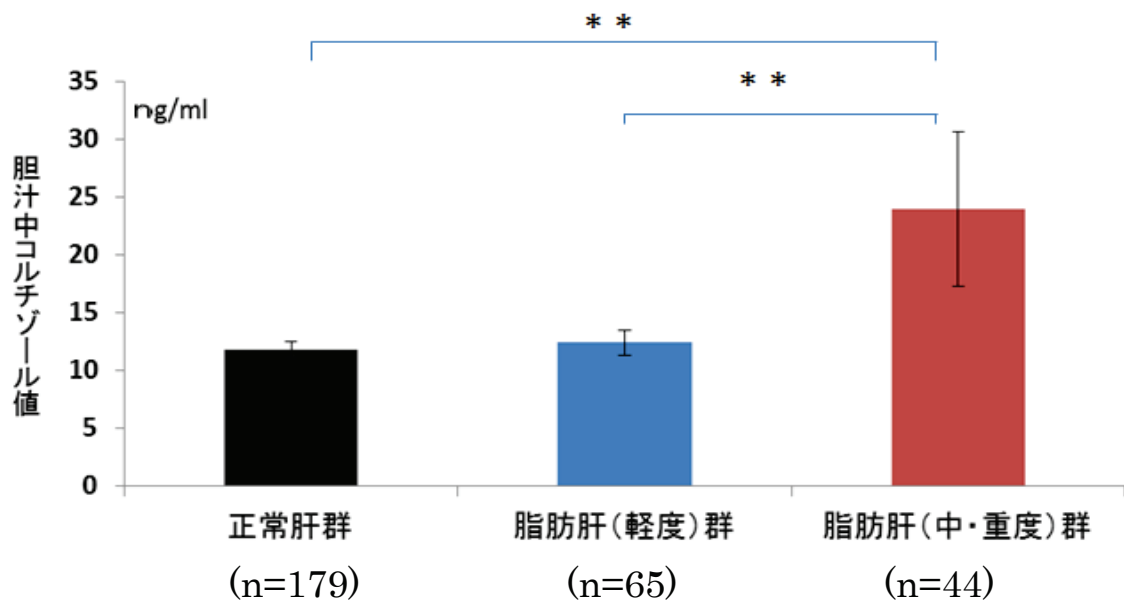


図 4-4 正常肝牛と脂肪肝牛の胆汁中コルチゾール値の比較

\*\*正常肝および軽度脂肪肝と中・重度脂肪肝との間に有意差  
( $P<0.01$ )

#### 4 節 考 察

北海道、東京、横浜の各と場における脂肪肝の検出率に大きな差異が見られたが、北海道の生産地においては分娩後間もない廃用牛が多くと殺されることが多く、一方、都市部（特に横浜）のと場では分娩後ある程度経過した牛がと殺されたことを反映していると思われる(Reid, 1980)。

武石ら(1976)は、と畜検査により異常の見られない正常肝牛および肝臓の半分もしくは全廃棄された重度肝疾患牛の胆汁中の抱合型、結合型、遊離型を合わせた全エストロジェン 3 分画を化学的分析法を用いて測定し、正常肝牛の E1 値が最も高値であったことを報告している。この報告は結合型と遊離型が合体したエストロジェン 3 分画を測定した本研究の結果とも一致した。武石ら（1976）は肝障害牛における胆汁中の E2 および E3 が E1 より高値であったとしているが、本研究では高い方から E1, E2, E3 の順であった。この差異は測定法の違いによる抱合型の有無に由来すると考えられた。さらに、武石ら(1976)は肝疾患牛の胆汁中全エストロジェン値が正常牛のそれより高いことを報告している。本研究においても中・重度群（30%以上）のエストロジェン 3 分画値は正常肝群の 3 分画値と比較して

有意 ( $P < 0.001$ ) に高い値であった。

また、胆汁中のコルチゾール値は正常肝群および軽度群と比べ、中・重度群で有意 ( $P < 0.01$ ) に高い値を示し、エストロゲンと同様にコルチゾールの不活化能の低下が認められた。ヒトの肝硬変患者ではコルチゾールの肝抱合能が低下したり (Zumoff, 1967)、慢性肝疾患者のコルチコステロイド結合蛋白質が低下するために、結合型および遊離型コルチゾール値が増加すると報告 (McCann & Fulton, 1975) されているが、乳牛での報告は見当たらない。

牛に ACTH を連続投与すると LH サージが抑制され卵胞嚢腫を発症させることが知られており (Dobson et al., 2000)、強いストレスにより分泌されるコルチゾールが卵胞嚢腫を発症させる可能性が指摘されている (Stoebel & Moberg, 1982、Bosu & Peter, 1987)。従って、脂肪肝によるコルチゾールの増加も卵胞嚢腫の発症素因となる可能性がある。

以上のことから、脂肪肝レベルが上がるにつれて肝臓のエストロゲンやコルチゾールの抱合能が低下した結果として、胆汁中のエストロゲン値やコルチゾール値が上昇し、繁殖障害の原因になる可能性が示唆された。

## 第5節 小 括

脂肪肝乳牛におけるステロイドホルモンの肝臓代謝を間接的に知る目的で正常牛と脂肪肝牛の胆汁中エストロジェンを測定した。胆汁中エストロジェン 3 分画では正常肝群および脂肪肝群において何れも E<sub>1</sub> が最も高値で、E<sub>3</sub> が最も低値であった。正常肝群と脂肪肝群との比較において胆汁中エストロジェン 3 分画値は中・重度群で最も高濃度であり正常肝群で最も低値であった。胆汁中コルチゾール値は中・重度群で高値を示した。以上のことから、脂肪肝レベルの上昇に伴い肝臓のステロイドホルモン抱合能が低下した結果として胆汁中のエストロジェンおよびコルチゾール濃度が上昇したものである。胆汁中のエストロジェンのうっ滞は、血中エストロジェン濃度の上昇を惹起し、これが繁殖障害の原因になる可能性が示唆された。

## 第 5 章

脂肪肝牛におけるチオプロニンの治療効果と予後

## 第1節 序 言

乳牛の乾乳期における飼料給与の失宜による過肥は、分娩後の泌乳量の増加に伴うエネルギーの摂取不足を助長し、その不足分を補うために多量の体脂肪の動員が引き起こされ、肝臓の脂肪化や脂肪肝の原因となることが報告されている(McCormack, 1978、Morrow et al., 1979、Reid et al., 1981、Roberts et al., 1981)。また、分娩前後の飼料摂取の不足やストレスによる食欲減退も、産乳のためのエネルギー不足や蛋白不足に移行し、負のエネルギーバランス (NEB) に陥る。これにより産乳のためのエネルギー源として急激な脂肪の動員が起こり、肝トリグリセリド (TG) 濃度、血中遊離脂肪酸 (NEFA) 濃度が上昇する (Kobayashi et al., 2002、Radcliff et al., 2006)。これは、脂肪組織中の蓄積脂肪を分解して肝臓に送り、エネルギー不足を補おうとする現象であるが、体脂肪が過剰に動員されることで脂肪肝を発症し、肝機能の低下を招く。そして、更なる急激で大量の体脂肪の動員が起こると、肝の代謝能の低下によりケトン体が過剰に生産され、食欲不振を主徴とするケトーシスを発症する (Jorritsma et al., 2000、Katoh, 2000)。

特に分娩後の乳牛に多発する脂肪肝は、他の周産期疾患と深く関



わりを持ち、その後の生産性を大きく低下させる疾患であり、特に高泌乳牛や過肥牛では、脂肪肝に起因する難治性の周産期病を多発する傾向がある(Kimura et al., 1993、Sato et al., 2003、Tamura et al., 2003)。

Collins と Reid(1980)は脂肪肝の原因は肝細胞内における TG の蓄積であり、脂肪の蓄積が肝臓の組織構造を変化させたり、肝臓機能を低下させると述べている。乳牛におけるエネルギー代謝の異常は、血糖値の低下を伴う肝実質障害を引き起こし、総ビリルビン(T-Bil)、総コレステロール(T-Cho)が上昇する。また肝細胞膜の透過性が亢進し、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミラーゼ(GOT)、血清乳酸脱水素酵素(LDH)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(MDH)、血清  $\gamma$ -グルタミールトランスぺプチダーゼ( $\gamma$ -GTP)、グルタメイトデヒドロゲナーゼ(GLDH)が上昇し、GOT と T-Bil、T-Cho と T-Bil、および血清蛋白(TP)と T-Bil の間に相関関係が認められている (Sommer, 1975)。

Grohn ら (1983) は 54 頭の乳牛について、肝臓の脂肪沈着の程度とグルコース(Glu)、アルブミン(Alb)、TP および  $\gamma$ -GTP との間に相関関係を認め、これら脂肪肝の予防対策としては乾乳期を含めて分娩前後の適切な栄養管理が最も大切であるとしている。また、

Morrow ら（1976）も分娩に伴う牛の脂肪肝を予防するには、乾乳期の過肥を避け分娩後の健康状態を極端に悪化させないことであると述べているが、脂肪肝が発症した場合のより確実な治療法が望まれる。

本研究では、合成SH化合物であり、糖、脂質、蛋白代謝を改善し、肝障害に対して肝臓庇護作用（市田ら、1980）があるとされている、チオプロニン製剤（2-Mercaptopropionylglycine: MPG、参天製薬、大阪）を脂肪肝乳牛に投与し、一般臨床症状、血液性状の変化を指標に治療成績および予後判定について検討した。

## 第2節 材料および方法

### 2-1 供試牛

水戸市近郊の酪農家で飼養されているホルスタイン系乳牛で、分娩後に臨床症状および尿中ケトン体の検出によりケトosisと診断された113頭のうち、肝生検により脂肪肝と診断した63頭を供試牛とした。また、臨床的生化学所見を比較する目的で、脂肪肝を認めなかった50頭を対照群とした。供試牛63頭の年齢は $4.7 \pm 2.6$  歳（平均 $\pm$ 標準偏差）、産次数は $2.6 \pm 2.0$  回、分娩間隔は $435.8 \pm 77.4$  日、分娩から発症までの経過日数は $15.0 \pm 22.9$ 日であった。

## 2-2 ケトーシスの診断

食欲不振ないし廃絶の主訴をもとに、検温、聴診、打診等による診察後、牛用尿道カテーテルにより採尿した新鮮尿について、尿検査試験紙（BMテスト<sup>®</sup>、山ノ内製薬、東京）でケトン体反応（+）以上のものをケトーシスと診断した。

## 2-3 脂肪肝の診断と肝脂肪沈着度による区分

肝臓穿刺により採材した肝臓組織は浮遊試験で浮遊を確認した後、直ちに10%リン酸緩衝ホルマリンで固定し、ヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色を実施した。H-E染色により肝細胞の空胞化を認めた検体について、ズダンⅢおよびナイルブルーによる脂肪染色を行い脂肪肝の確定診断を行った。10%以上の脂肪沈着を認めたものを脂肪肝と診断した。肝脂肪沈着の度合いをCollinsとReid（1980）の方法に従い百分率で示し、10%未満の対照群、10～30%未満の軽度群、30%以上の中・重度群の3群に区分した（図5-1）。一部の供試牛について、治癒判定のための肝生検を行った（図5-2）。

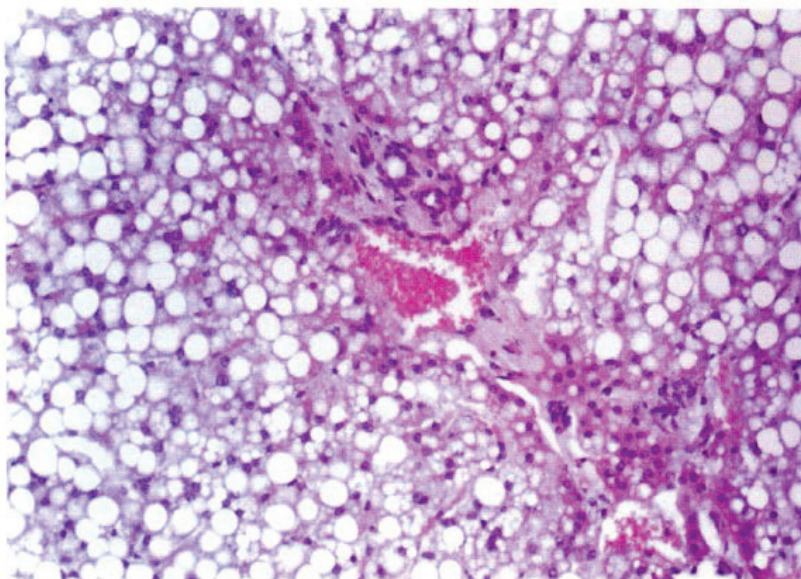


図5-1 初診時の肝細胞内空胞化した所見 (90%) (H-E染色 200倍)

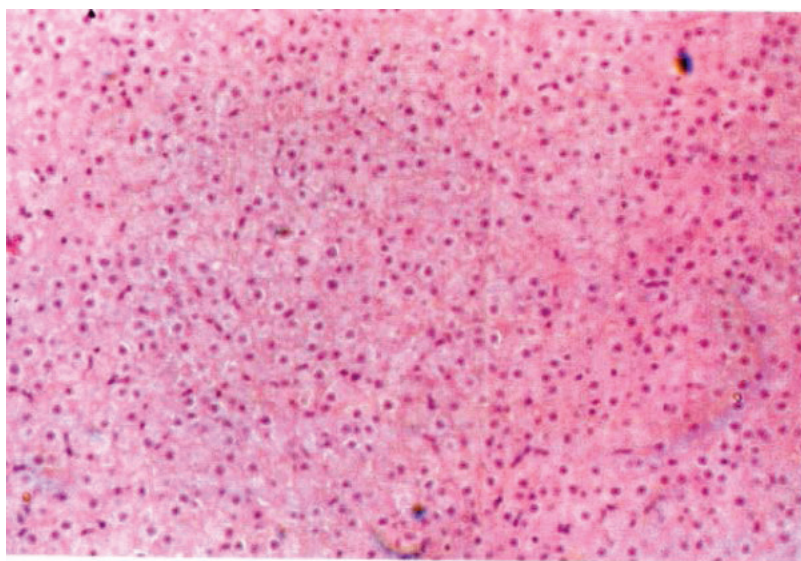


図5-2 治癒牛の肝細胞内の空胞化消失所見 (H-E染色 200倍)

## 2-4 MPG による脂肪肝の治療

脂肪肝牛 63 頭に肝臓機能賦活剤である MPG 5,000mg/100 ml/頭または 2,500mg/50 ml/頭を静脈内投与した。投与方法は 1 日 1 回 5 日間連用を基準とし、症状により適宜回数を加減した。

また、MPG の投与量により牛群を区分し、治療効果について検討をした。初診時より MPG の単独投与で治療した MPG 単用群 (n=34) と、他剤（糖類製剤、メチオニン製剤、胆汁酸製剤、肝機能改善薬、経口用プロピオン酸製剤）の投与で効果がなく、MPG に切り替えて治療した他剤無効群 (n=29) の 2 群に大別をした。さらに、MPG 単用群を初診時から 100ml を継続投与した 100ml 群 (n=30) と、初診時に 100ml を投与し 2 診時以降 50ml に切り替え治療をした 100+50ml 群 (n=4) の 2 群に分け、他剤無効群でも 100ml 群 (n=25) と 100+50ml 群 (n=4) に分けて検討をした。

## 2-5 脂肪肝の治療判定

食欲の回復、乳量の回復、元気の回復、起臥の改善、尿中ケトン体の消失、反芻の正常化、正常便の排泄など、臨床症状の改善が確認されたものを治癒と診断した。食欲回復の程度は家畜共済診療指針の基準により（全国農業共済協会、2002）、発症前の食欲を基準

として求めた。乳量は1日泌乳量で示した。一部の供試牛について肝生検を行い、脂肪変性の消失を確認した。予後良好群と予後不良群の判別は、MPG剤投与により得られた臨床症状の改善の度合いにより行った。

## 2-6 血液生化学検査

血液はMPGの投与開始時（初診時）と投与終了時に頸静脈より採取した。初診時および終診時に採取した113頭の血液についてGOT、グルタミン酸ピルビン酸転移酵素(GPT)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、 $\gamma$ -GTP、T-Bil、硫酸亜鉛試験(ZTT)、Glu、TG、血中尿素窒素(BUN)、NEFA、T-Cho、TPなど12項目の血液生化学性状を測定した。血液生化学性状の分析は江東微研（つくば市）に依頼した。

## 2-7 統計処理

上記の検査結果についてのデータ解析は東京大学大型電子計算機(HITAC M-280H)ライブラリーソフトSPSS, BMDPを利用して、各種統計処理を行った。



### 第3節 結 果

#### 3-1 MPG投与後の臨床症状の変化

MPGを投与した供試牛63頭のうち、49頭（77.8%）が治癒した。49頭の食欲は、初診時に著しく減退または廃絶していたが、MPG投与後に70～79%回復したものが2頭、80～89%回復4頭、90～99%回復2頭、100%回復41頭であったが、14頭は改善しなかった。乳量は、初診時 $14.54 \pm 10.04$  kgであったが、MPG投与後には $24.31 \pm 6.61$  kgと有意（ $P < 0.05$ ）に改善した。

MPG投与により軽度群では19頭中16頭（84.2%）が治癒し、中・重度群では44頭中33頭（75.0%）が治癒した。軽度群と比べ、中・重度群の治癒率にやや低い傾向を認めたが、治療効果に有意差は認めなかった。

#### 3-2 MPGの投与量と治療効果

MPG単用群の100 ml群では、6回までに7頭が、7～10回の投与で19頭が治癒したが、4頭は無効であったが、100+50 ml群では、投与10回までに4頭全頭が治癒した。他剤無効群の100 ml群では、6回以下で5頭が、7～10回で10頭が治癒（60.0%）したが、残り

10 頭は無効であった。100+50 ml群では8 回までに4 頭全頭(100%)が治癒した。また、肝脂肪沈着度による群別の治療効果は、軽度群で84.2% (16/19頭)、中・重度群で75.0% (33/44 頭)であり、MPG単用群と他剤無効群を集計した結果、MPG単用群で88.2% (30/34 頭)の治療効果を認め、他剤無効群でも65.5% (19/29頭)の治療効果を認めた。治癒判定までの治療回数は $9.46 \pm 6.76$  回、経過日数は $12.40 \pm 9.47$  日であった(表5-1)。



表5-1 MPG剤の投与法と効果

区 分	MPG 単 用 群		他剤無効群		計
	100 ml	100+50 ml	100 ml	100+50 ml	
	群	群	群	群	
	n=30	n=4	n=25	n=4	n=63
軽 度 群	9/11	1/1	4/5	2/2	16/19
	81.8%	100%	80.0%	100%	84.2%
中・重 度 群	17/19	3/3	11/20	2/2	33/44
	89.5%	100%	55.0%	100%	75.0%
有 効	26/30	4/4	15/25	4/4	49/63
	86.7%	100%	60.0%	100%	77.8%
	30/34 (88.2%)		19/29 (65.5%)		
無 効	4	0	10	0	14

注) 分母は供試頭数、分子は治癒頭数

### 3-3 肝脂肪沈着度別の血液生化学検査結果

初診時の血液生化学性状について軽度群（n=19）と中・重度群（n=44）に区分して対照群と比較したところ、前者では GOT（ $P<0.01$ ）、T-Bil（ $P<0.01$ ）、NEFA（ $P<0.05$ ）が有意に高く、中・重度群では、GOT（ $P<0.01$ ）、T-Bil（ $P<0.01$ ）、NEFA（ $P<0.01$ ）、ZTT（ $P<0.05$ ）が有意に高く、T-Cho（ $P<0.05$ ）、BUN（ $P<0.01$ ）が有意に低かった（表 5-2）。

脂肪肝牛の分娩前後におけるNEFAは、分娩前10日から分娩後25日までの間において平均1,500  $\mu\text{Eq/l}$ と正常値より非常に高い値を示した。

GOT値と肝臓脂肪沈着度との間に有意な相関はみられなかったが、肝脂肪沈着度が30%以上を示し、GOT値が100 IUを超えた個体の死廃用が多く認められた（図 5-3）。

表 5-2 対照群と脂肪肝群の血液生化学性状の比較

検査項目	対照群 (n=50)	脂肪肝群	
		軽度群 (n=19)	中・重度群 (n=44)
GOT (IU/l)	62.7±17.8	107.6±42.3**	130.1±89.4**
GPT (IU/l)	16.5±8.8	15.0±7.3	15.5±8.4
ALP (IU/l)	5.1±3.8	4.5±1.8	5.4±4.3
T-Bil (mg/dl)	0.2±0.1	0.8±0.6**	0.8±0.9**
ZTT (IU/l)	10.8±4.5	13.1±5.2	15.1±5.2*
γ-GTP (U/l)	27.2±18.0	25.5±10.8	33.4±34.5
TG (mg/dl)	20.6±20.9	18.1±8.9	20.4±15.9
Glu (mg/dl)	58.5±21.6	77.8±18.5	53.6±16.5
T-Cho(mg/dl)	175.2±139.7	122.6±73.3	102.2±54.7**
TP (g/dl)	7.5±0.4	8.1±1.3	7.8±0.9
NEFA(μEq/l)	469.5±1,277.0	992.3±458.8*	1,147.3±512.9**
BUN (mg/dl)	15.6±8.5	13.5±4.1	13.5±3.4**

\*:P<0.05

\*\*:P<0.01

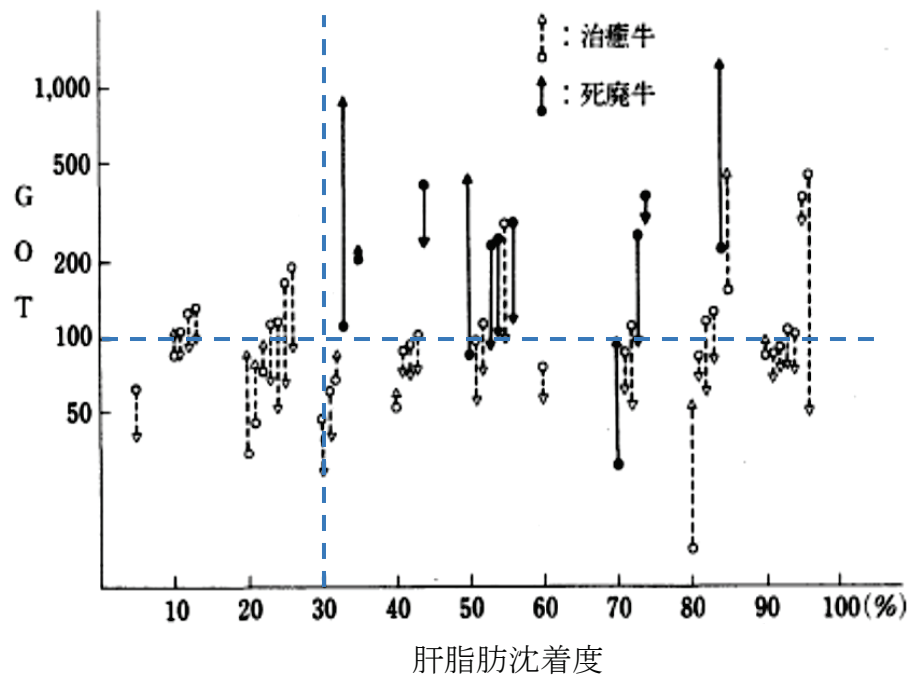


図5-3 脂肪肝牛における肝脂肪沈着度別にみたMPG投与前後の  
GOT値の変動と予後（縦軸は対数表示）

### 3-4 初診時と終診時の血液生化学検査結果の比較

初診時と終診時の血液生化学性状値を比較したところ、予後良好群においてはALP、T-Bil、TG、NEFA ( $P<0.01$ ) とBUN ( $P<0.05$ ) が低下した。また、予後不良群においてはT-Cho ( $P<0.01$ ) が低下し、GOT、GPT、 $\gamma$ -GTP ( $P<0.05$ ) は上昇した。

### 3-5 予後判定

供試牛63頭について予後判定から予後良好群と予後不良群の2群に区分し統計処理をした。分散比の大きい値ほど予後の診断に寄与する項目であることから、各血液成分の測定値および臨床所見について分散分析によって比較した結果、初診時の血液生化学所見ではZTT、GOT、TTT、終診時ではGOT、GPT、T-Bil、NEFA、T-Cho、ALPが予後診断上重要な項目であることが認められた(図5-4, 5-5)。これらの検査項目について予後良好群と予後不良群の2群の平均値の95%信頼区間を示した(図5-6)。これによると予後良好群で上昇傾向を示した項目はZTT、乳量であり、下降傾向を示した項目はT-Bil、ALP、NEFA、BUNであった。また、GOTについてはほとんど変化がみられなかった。予後不良群で上昇傾向を示した項目は、GOT、ALP、ZTT、BUNであり、T-Bilは下降傾向を示した。また、NEFA

についてはほとんど変化がみられなかった。

脂肪肝牛に対するチオプロニンの治療効果

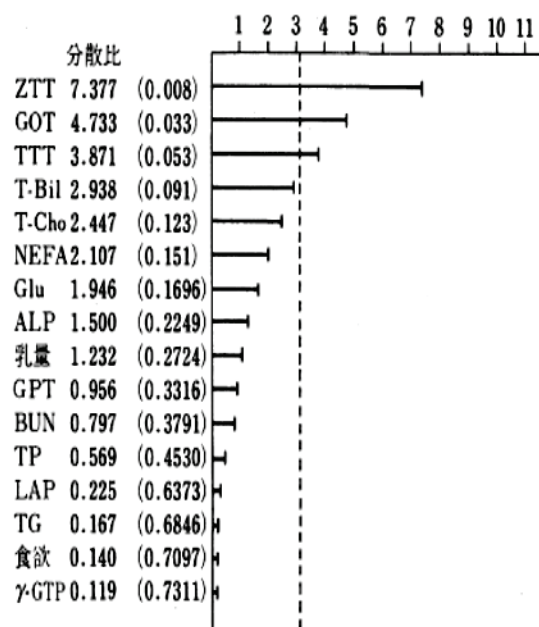


図5-4 初診時を予後の良否によって分析した分散比

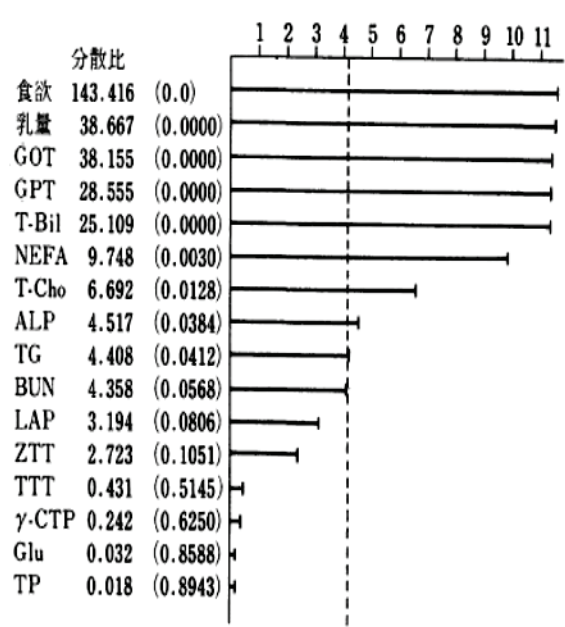


図5-5 終診時を予後の良否によって分析した分散比

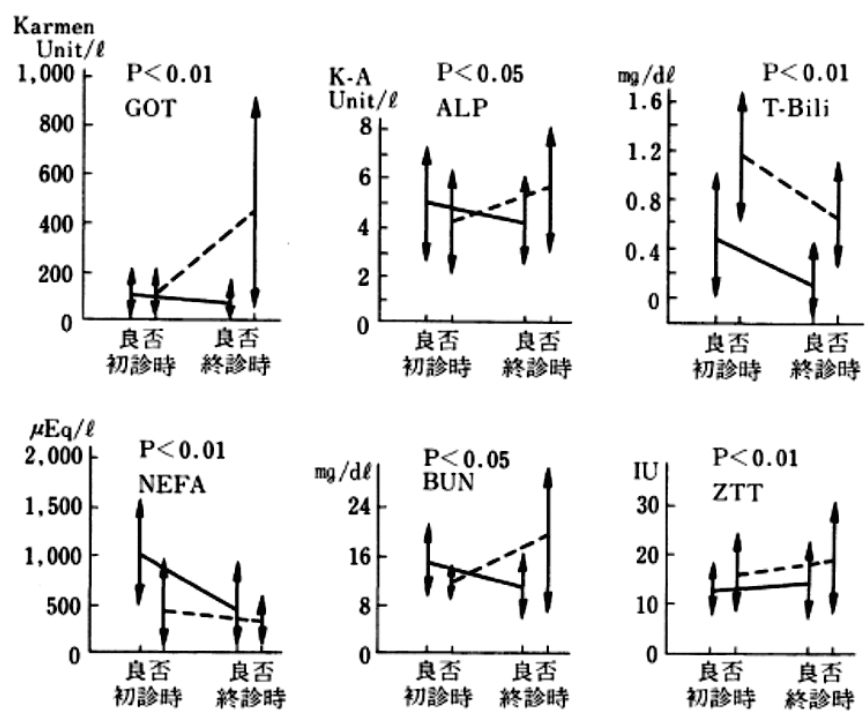


図5-6 予後の判定よりみた血液生化学性状の推移

母平均(95%信頼区間) (\*:  $P < 0.05$  \*\*:  $P < 0.01$ )

実線は予後良好群、破線は予後不良群

#### 第4節 考 察

ケトーシス牛の中で肝実質に 10%以上の肝脂肪沈着を認めた脂肪肝牛は 113 頭中 63 頭 (55.8%) であり、Morrow ら (1976) のケトーシスと脂肪肝合併率 38%より高率であった。その脂肪肝の主要臨床症状は Morrow ら (1976)、小岩ら (1982) が述べているのと同様であった。これら脂肪肝牛の分娩間隔は平均  $435.8 \pm 77.4$  日と長く、肝脂肪沈着度が 30%未満群の平均分娩間隔は  $426.3 \pm 70.7$  日、肝脂肪沈着度が 30%以上群の平均分娩間隔は  $435.8 \pm 96.7$  日であり、Reid ら (1979) の報告とほぼ同様であった。これら 63 頭の脂肪肝牛に対して合成 SH 化合物であり、糖、脂質、蛋白代謝を改善し、肝障害に対して肝臓庇護作用 (市田ら、1980)があるとされている MPG を 50 ml (2,500 mg) から 100 ml (5,000 mg) を単用で使用したところ、34 頭中 30 頭 (88.2%) で治療効果が認められた。また、他剤無効例に MPG を使用した群においても 29 頭中 19 頭 (65.5%) が治癒し、脂肪肝において MPG は高い治療効果を有することが判明した。MPG 投与回数と治癒率について検討したところ、MPG 投与 6 回以下での治癒率は 61.9%であったが、7 回以上での治癒率は 85.7%であった。原田ら (1986) は本研究と同様にケトーシスに対する



MPG の治療成績を報告している。それによると、MPG 単用群投与回数 6 回以内での治癒率は 95.8%、他剤無効例への投与でも 82.7% と高い治癒率を得ているが、脂肪肝ではケトーシスと比べ、投与開始から治癒までの投与回数と経過日数に多くを要することが伺えた。MPG の脂肪肝に対する治療効果は軽度群で 84.2%、中・重度群では 75%であり、有意な差異は見られなかったが、さらに症例を重ねて検討する必要がある。予後良好群では食欲、乳量ともに有意( $P<0.05$ )に回復し、肝脂肪沈着も消失した。

脂肪肝の新しい治療法として、Hippen ら (1999) はグルカゴン(10 mg/日)の 14 日間静脈内連続投与により、重度脂肪肝レベルを軽減する効果があるとしている。さらに、中度の脂肪肝牛に 15 mg グルカゴンを 8 時間毎に 14 日間投与した試験では、分娩後の高体温期間の減少や乳房炎発症率を減少させている (Bobe et al., 2007)。しかしながら、グルカゴンの効果については使用方法や薬価の問題等があることから、脂肪肝の新しい治療法としての確立には大きな課題が残されている。

MPG投与後の脂肪肝牛の血液生化学性状は、山下ら (1984) の報告と一致し、T-BilやALPが有意( $P<0.01$ )に低下し、肝機能の改善が

示唆された。TGも有意 ( $P<0.01$ ) に低下し、肝細胞に沈着していたTGの消失が示唆された。しかし、臨床症状の改善を認め、治癒判定をした予後良好群のGOT、GPTには有意な変動を認めなかった。島田 (1984) は分娩前後のNEFA濃度は正常牛でも一時的に1,000  $\mu\text{Eq/l}$ 以上に上昇すると述べている。本研究においても経時的にみたNEFA濃度は分娩前後で正常値の範囲をすべて上回っていた。これより、対象牛の脂肪動員は分娩前から病的に経過していたことが示唆された。BUNは佐藤ら (1983)の報告と同様、MPG投与後に下降した。以上のことから、MPGの投与により肝脂肪沈着が減少したことが肝機能を修復し、血液性状も改善したものと判断した。血液生化学性状値と予後の判定結果を検討する目的で分散分析を行ったところ、終診時のGOT、ALP、T-Bil、ZTT、BUNが高値で、食欲、乳量の回復が低値のものは予後不良であることが示唆された。

## 第5節 小括

ケトーシス発症牛を対象として肝生検により肝実質に脂肪沈着を認めた63頭のホルスタイン搾乳牛に、チオプロニン (MPG) を投与し治療効果を検討した。MPG投与群63頭中49頭 (77.7%) で食欲、

乳量の回復、臨床症状の改善、終診時の肝生検により肝沈着脂肪の消失を認め脂肪肝の治癒を確認した。ケトーシスと脂肪肝を併発した牛群では、治癒までのMPG投与回数はケトーシスより多かった

また、血液生化学的所見では、臨床症状の改善した予後良好群で NEFA、GT、ALP、T-Bil ( $P<0.01$ )、BUN ( $P<0.05$ )の低下を認め、改善が認められなかった予後不良群ではGOT、GPT、 $\gamma$ -GTP ( $P<0.05$ )の上昇を認めた。

以上より、予後良好群における臨床症状の改善、肝機能の修復、血液性状の回復、肝沈着脂肪の消失は MPG によるものと考えられ、脂肪肝に対するチオプロニン投与の効果が認められた。また、チオプロニン投与後の GOT、ALP、T-Bil、ZTT、BUN が上昇し、初診時に比べ高値となったものや、GOT が 100IU 以上で肝脂肪沈着度が 30%以上を示した脂肪肝牛はほとんどが予後不良であり、死廃用に繋がることが判明した。しかし、初診時の GOT が 100IU 以上であっても、MPG の投与により GOT が低下した脂肪肝牛では、多くが治癒していることを認めた。

## 第 6 章

チオプロニンによる卵胞嚢腫牛の治療効果

## 第1節 序 言

牛卵胞嚢腫は視床下部・下垂体・性腺軸の異常による LH サージの欠如により発症するとされ、その素因として遺伝的素因、栄養障害、加齢、ストレスなどが挙げられている (Kesler & Garverick, 1982、Day, 1991、Garverick, 1997、Peter, 2004) が、下垂体の LH、視床下部の GnRH の存在が明らかにされていることから、LH サージ欠如の原因が下垂体の LH 不足や視床下部の GnRH 不足ではないことが判明している (Brown et al., 1986、Cook et al., 1991)。通常の排卵は成熟卵胞から分泌されるエストロジェン、中でもエストラジールの正のフィードバック作用によって LH サージが起こり排卵する。しかし、卵胞嚢腫の場合には、エストラジールの正のフィードバックによる LH サージが起こらないために排卵が成立せず嚢腫化する。その原因として視床下部エストロジェンレセプターの低下が挙げられている (Gümen et al., 2002、Gümen & Wiltbank, 2002、Kaneko et al., 2002)。Vanholder ら(2005)は卵胞嚢腫の存在時には基礎値を上回るプロジェステロン値がエストロジェンレセプターを抑制している可能性を報告しているが、プロジェステロン値が増加する理由については述べていない。

従来、卵胞嚢腫のホルモン治療法は、外因性LHとしてhCGや内因性LHを放出する合成GnRHが主に使われてきた。さらに、LHパルス頻度を抑制し、視床下部のエストロジェンレセプターを回復させる目的で外因性プロジェステロン製剤も使われている (Nanda et al., 1988、Calder et al., 1999)。従って、これまでの卵胞嚢腫の治療は発症機序に基づいた治療法ではなく、対症療法的治療法であった。

常包ら (1956) は、肝疾患が卵胞嚢腫の誘因になりうるとの仮説に基づき、肝疾患治療薬投与により卵胞嚢腫が治癒することを初めて報告した。この報告は肝疾患が卵胞嚢腫の引き金になるということを示唆するだけでなく、肝疾患を治療することで卵胞嚢腫が治癒するということを証明した点で評価されるが、その後この原理を追試した研究は見当たらない。種村ら (2016) は、ステロイドホルモンを抱合化する肝UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 活性値が卵胞嚢腫牛において正常牛の値より有意に低く、肝UGT活性値が低い程卵胞嚢腫と肝疾患の合併率が高くなることから、肝疾患と卵胞嚢腫発症の間に関連性のあることを報告している。また、種村ら (1986) は肝賦活剤であるチオプロニン (MPG) が脂肪肝に高い治療効果を示したと報告している。以上のことから肝賦活効果の高いMPG剤を

卵胞嚢腫牛に投与し、その治療効果を知る目的で本研究を行った。

## 第2節 材料および方法

### 2-1 供試牛

茨城県水戸市近郊および千葉県柏市近郊に飼養されているホルスタイン種系乳牛で、卵胞嚢腫と診断された53頭を供試した。卵胞嚢腫の診断は直腸検査法により行った。人工授精約30時間後に排卵確認を目的に直腸検査を行い、発情徴候の有無に関わらず卵胞が遺残していた個体や、分娩後60～90日の繁殖検診で卵胞嚢腫が疑われた個体を対象とした。これらについて7日間隔で2～3回の直腸検査を行い直径25 mm以上の卵胞が遺残し、黄体の存在を認めないものを卵胞嚢腫と診断した。また、卵胞嚢腫の発情徴候別区分では無発情型33頭(62.2%)、持続発情型15頭(28.3%)、思牡狂型5頭(9.4%)であった。

### 2-2 実験方法

供試薬は肝臓賦活剤であるチオプロニン (2-Mercaptopropinyl-glycine: MPG, 参天製薬、大阪) と、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG, あすか製薬、東京) を用いた。投与方法として、MPGにつ

いては5,000 mg/100 ml/頭を1日1回、5 日間静脈内投与し、hCGについては10,000 IUを1回筋肉内注射した。投与区分は、卵胞嚢腫診断時からMPG単独投与のMPG群（15頭）、およびhCG投与無効例にMPGを投与したhCG無効MPG群（16頭）、hCGとMPGを同時投与したhCG+MPG群（12頭）およびhCG治療無効例にMPGとhCGを同時投与したhCG無効hCG+MPG群（10頭）の4群に区分した。

治癒判定は治療後1週1回の直腸検査により最長で4週間追跡し、黄体化を認めたものを治癒と判定した。治療後に発情の回帰を認めた個体には人工授精を行い、授精後35～40日に妊娠鑑定を行った。

## 2-3 統計処理

統計処理は、統計解析ソフトのJMP®（SAS INS.Japan）を使用して、比率についてはカイ二乗検定を行った。

## 第3節 結 果

初診時にMPG剤単独投与のMPG群では15 頭中13 頭（86.7%）に黄体化を認め、その後に回帰した発情時に人工授精を実施した結果、13頭中9頭（69.2%）が受胎した。一方、初診のhCG治療で無効であった卵胞嚢腫牛にMPG剤を投与したhCG無効MPG群では、16頭中9



頭（56.3%）に黄体化を認め、9頭中6頭（66.7%）が受胎した。MPG群とhCG無効MPG群の全体の治癒率は31頭中22頭（71.0%）であった。初診の卵胞嚢腫牛にhCGとMPGを同時投与したhCG+MPG群では、12頭中7頭（58.3%）に黄体化を認め、7頭中4頭（57.1%）が受胎した。初診のhCG無効例にhCGとMPGを同時投与したhCG無効hCG+MPG群では、10頭中7頭（70%）に黄体化を認め、7頭中4頭（57.1%）受胎した。hCG+MPG群とhCG無効hCG+MPG群での治癒率は22頭中14頭（63.6%）であった（図6-1）。

治療効果の見られたMPG群（22頭）における黄体化は治療後1週6頭、2週11頭、3週3頭、4週2頭で認めた。hCG+MPG投与群（14頭）では治療後1週5頭、2週6頭、3週3頭であった（図6-2）。

MPG群での発情徴候別における治療成績は、無発情型で19頭中18頭（94.7%）、持続性発情型では9頭中4頭（44.4%）、思牡狂型3頭全て無効であった。hCG+MPG投与群における発情徴候別の治療成績は無発情型で14頭中10頭（71.4%）、持続発情型で6頭中3頭（50%）が治癒したが、思牡狂型の2頭は無効であった（図6-3）。

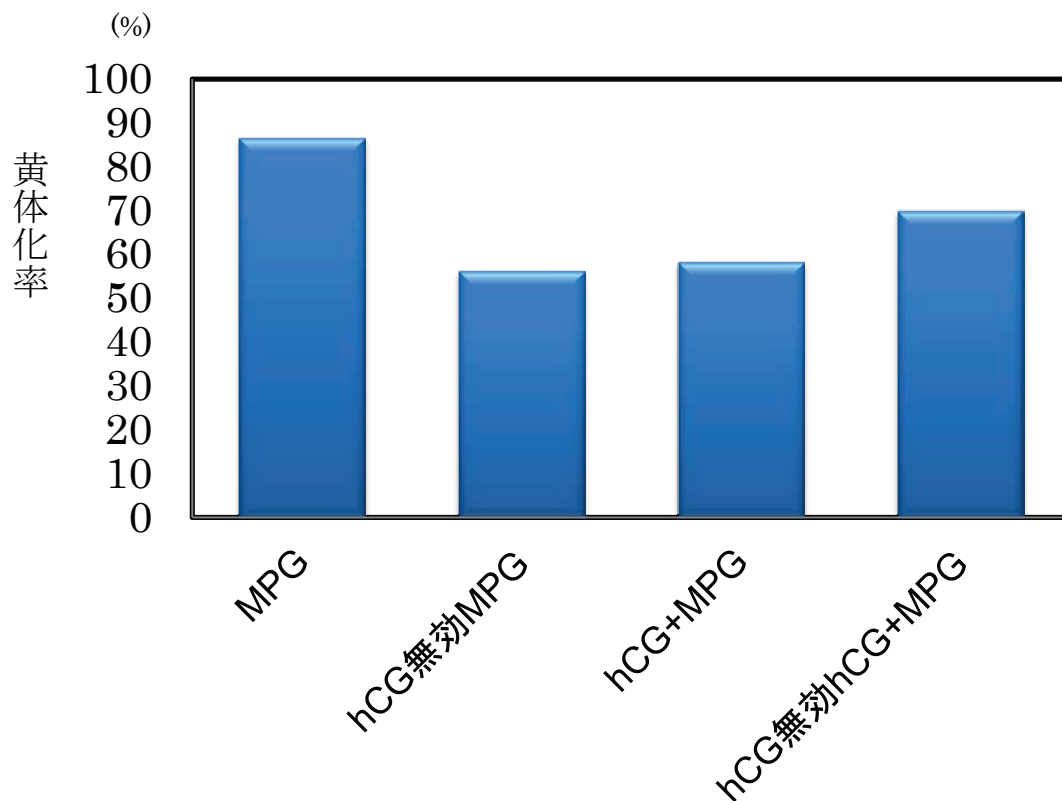


図6-1 卵胞嚢腫乳牛に対する各治療後の黄体化率 (%)

MPG ; MPG単用 (15 頭)、hCG無効MPG (16 頭) ; hCG無効例にMPG投与  
 hCG+MPG(12 頭) ; hCGとMPGを同時投与、hCG無効hCG+MPG (10 頭) ;  
 hCG無効例にhCGとMPGを同時投与

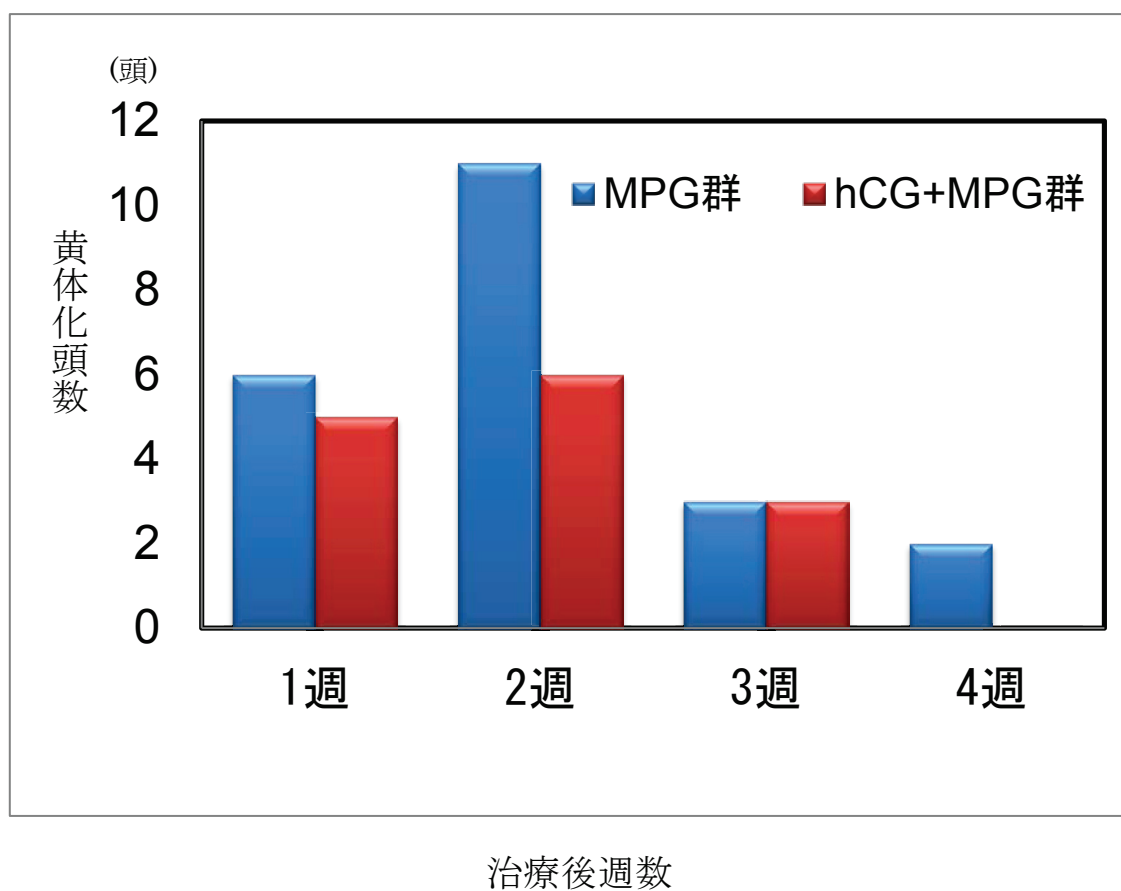


図6-2 卵胞嚢腫乳牛における各治療後の黄体化時期別の頭数

MPG群(22 頭) ; MPG単用とhCG無効例へMPG投与

hCG+MPG群 (14 頭) ; hCGとMPGを同時投与、hCG無効例にhCGとMPG同時投与

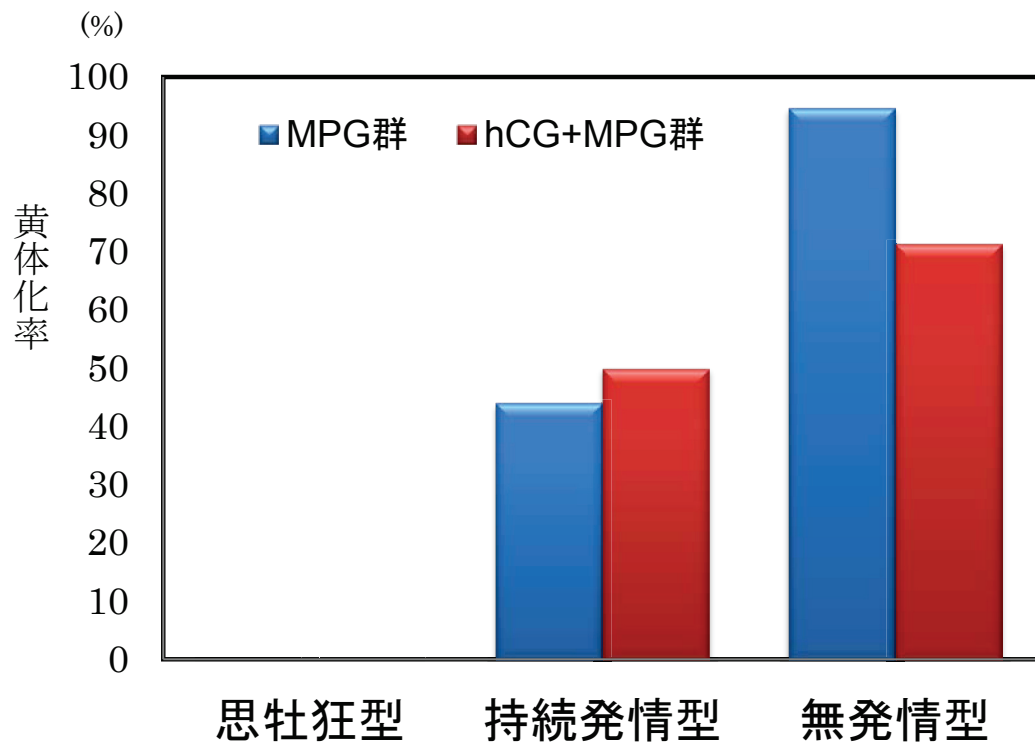


図6-3 発情徴候型別の卵胞嚢腫乳牛における各治療後の黄体化率

MPG群(31 頭) ; MPG単用とhCG無効例へMPG投与

hCG+MPG群 (22 頭) ; hCGとMPGを同時投与、hCG無効例にhCGとMPG同時投与

#### 第4節 考 察

卵胞嚢腫牛へのhCG投与後の治癒率は65～80% (Youngquist, 1986)、GnRHは72～85%程度であり (Dismore et al., 1987)、hCGとGnRHの治癒率は同レベルとされている (Peter, 2004)。hCGの多回投与はアンチホルモンが産生産生される可能性があるが、GnRHにはアンチホルモンの問題はない (Drost & Thacher, 1992)。卵胞嚢腫へのhCG投与では3週までに発情回帰することが多いとされ (Kahn, 2010)、GnRH投与でも4週までに多くは発情回帰する (Dinsmore et al., 1990)。プロジェステロン徐放剤 (9～14日留置) はLHパルスを抑制し、視床下部のエストロジェン感受性を回復させる作用があり、徐放剤を除去すると7 日以内に発情回帰、排卵し (Brito & Palmer, 2004)、その治癒率は約68%とされていることから (Kim et al., 2004)、hCGやGnRHの製剤と同レベルと思われる。このように卵胞嚢腫は内分泌疾患であることから、従来から専らホルモン製剤が卵胞嚢腫の治療に使われてきた。

常包ら (1956) は卵胞嚢腫の発症原因が肝疾患に由来するとの仮説を立て、肝賦活剤としてメチオニンやビタミンCを10 日間連続投与して6 頭中5 頭が7～28 日に正常発情が回帰したことを報告して

いる。この卵胞嚢腫の治療の理由として肝機能改善によるエストロゲン代謝の正常化を示唆している。卵胞嚢腫の70%は分娩後3 カ月以内に発症するとされ (Laporte et al., 1994)、この卵胞嚢腫多発時期は脂肪肝発症多発時期 (分娩後1～5 週間) と重なっている

(Geelen & Wensing, 2006)。著者らは、分娩後において中～重度の脂肪肝を呈した乳牛は卵胞嚢腫を含め様々な継発症を引き起こし、脂肪肝レベルに応じて当該乳期中の廃用率が高いことを報告している (Tanemura et al., 2016)。

MPGは肝賦活剤として、ヒト慢性肝炎 (市田ら、1980)、乳牛のケトーシス (原田ら、1986)、乳牛の脂肪肝 (種村ら、1986) など高い治療効果を認めている。本研究では卵胞嚢腫15 頭にMPG剤のみを投与したところ13 頭 (86.7%) に黄体化を認め、ホルモン剤による治療成績と同等の結果を得た。さらに初診時にhCG投与に無反応であった卵胞嚢腫16 頭にMPG剤を投与したところ9 頭 (56.3%) に黄体化を認めた。今回のMPG剤による卵胞嚢腫の治療効果は常包ら (1956) の結果と一致した。さらに、供試牛53 頭中26 頭 (49.1%) が初診時のhCG投与に無効であったが、この無効例に対しMPG単独投与では9 頭 (34.6%) に、hCGとMPGの同時投与では7 頭 (26.9%)

に黄体化を認め、双方で16 頭（61.5%）に黄体化を認めた。卵胞囊腫に於いて、ホルモン剤無効例が2、3 割程度存在する（Youngquist, 1986、 Dismore et al., 1987）と報告されているが、MPG剤投与がこれに対応する治療法として有用であることが示唆された。著者らはこれまでに、卵胞囊腫の発症に肝疾患（特に脂肪肝）が関与することを疫学的解析（Tanemura et al., 2016）、ステロイドホルモン肝抱合酵素活性値（Tanemura et al., 2017）、胆汁中の非法抱合型エストロゲン値の結果（投稿中、第5章）から論証してきた。仮に、卵胞囊腫の多くが肝疾患によるステロイドホルモン代謝異常に由来するという仮説が成り立つなら、肝賦活剤により卵胞囊腫が治療できたという結果は論理的に成立すると思われる。

本研究では卵胞囊腫牛にhCGとMPGを同時投与する試験も実施したが、MPG単独投与より若干治癒率は低かった。この原因としてMPGがhCGの代謝を促進した可能性もあるが、同時投与群に偶然含まれた無発情型の割合の差異も考えられる。少なくとも、卵胞囊腫牛へのhCGとMPG同時投与の相加・相乗効果はないことが示唆された。MPG剤投与から黄体化までの期間は概ね2週程度であり、黄体化から発情の回帰までの日数はホルモン剤使用時と同等と考えられ

た。

卵胞嚢腫の臨床症状は無発情型、持続発情型、思牡狂型の3群に分類され、80%は無発情型であり、残りが持続発情型と思牡狂型とされている(Youngquist, 1986)。本研究では無発情型33頭(62.2%)、持続発情型15頭(28.3%)、思牡狂型5頭(9.4%)であり、無発情型が若干少なかった。MPGによる卵胞嚢腫治癒率は無発情型で最も高く、次いで持続発情型は中程度の治癒率であったが、思牡狂型5頭は全て無効であった。エストロゲン分泌型の卵胞嚢腫の治癒率が低い理由は不明であるが、肝疾患を有する牛はエストロゲン代謝が停滞するために卵胞嚢腫の治癒が障害を受けたり、遅延する可能性が考えられる。

以上の結果から、卵胞嚢腫牛へのMPG剤投与は従来から使用されてきたホルモン製剤と同等の治療効果があり、ホルモン剤に効果のなかった症例にも効果を有することが証明された。

## 第5節 小 括

卵胞嚢腫初診牛にMPG剤を投与したところ15頭中13頭(86.7%)に黄体化が見られ、初診時hCG治療に無効であった卵胞嚢腫牛に



MPG剤を投与した場合でも16頭中9頭（56.3%）に黄体形成が認められた。さらに、卵胞嚢腫初診牛にhCGとMPGを同時投与したところ、12頭中7頭（58.3%）に黄体化が見られ、初診時のhCG無効例にhCGとMPGを同時投与した場合でも10頭中7頭（70%）に黄体化が認められた。治療効果の見られたMPG群（22頭）における黄体化は治療後1、2週で黄体形成が認められ、MPG+hCG投与群（14頭）でも同様であった。症状分類別の治療効果は無発情型で最も高く、持続発情型ではやや低く、思牡狂型では全例が無効であった。

以上の結果から卵胞嚢腫牛へのMPG剤投与は従来から使用されているホルモン製剤と同等の治療効果があり、ホルモン剤で効果のなかった症例にも有効であることが証明された。

## 第 7 章

### 総 括

本研究では、乳牛の卵胞嚢腫の発症時期と脂肪肝の発症時期が重複することが多いことに着目して、両疾患の密接な関連性とその治療法について研究を行った。即ち、乳牛の分娩後に発症した脂肪肝の肝脂肪沈着度とその後に発症した卵巣疾患の予後との関連、卵胞嚢腫発症牛における肝 UDP-グルクロン酸転移酵素活性と肝疾患との関連、牛脂肪肝レベルと胆汁中エストロゲン濃度との関連、脂肪肝牛における肝賦活剤・チオプロニンの治療効果、卵胞嚢腫牛におけるチオプロニンの治療効果について検討したので、以下に概要を述べる。

## 第2章 乳牛における脂肪肝の発症と予後に関する研究

本章では、臨床症状および尿中ケトン体により分娩後ケトosisと診断された乳牛 417 頭の中で脂肪肝と診断された 284 頭についてその治療成績、継発症および予後について検討した。脂肪肝の診断は、肝生検による病理組織学的検査により行い、肝臓実質に 10%以上の脂肪沈着を認めたものを脂肪肝と診断した。脂肪肝牛全てに肝賦活剤であるチオプロニンを 1 日 1 回、5 日連用を基準として投与した。脂肪肝牛 284 頭中 233 頭が最終的に治癒したが、その後 188 頭に各種継発症が認められた。肝脂肪沈着度と継発的卵巣疾患の発

症率および予後との間に高い相関を認めた。軽度群における繼発的  
卵巣疾患の発症率と廃用率は 20.2%と 25.0%であり、中度群では  
25.0 と 64.2%であった。また、重度群での発症率と廃用率はそれぞ  
れ 35.8 と 82.1%であり、軽度群や中度群より有意に高かった。この  
繼発的卵巣疾患における肝脂肪沈着度と繼発症発症率および廃用率  
の傾向は卵巣疾患以外の繼発症においても同様の傾向を認めた。

以上の結果から脂肪肝牛における繼発的卵巣疾患の発症率と廃用  
率は肝脂肪沈着度が増加するにつれて高くなり、特に 60%以上の脂  
肪沈着の重度群では廃用率の著しい増加を認めたが、他疾患でも同  
様の傾向が認められた。

### 第3章 卵胞囊腫牛の肝 UDP-グルクロン酸転移酵素活性と脂肪肝 との関係

本章では、生殖器疾患の中で廃用率の最も高い卵胞囊腫を対象と  
して、ステロイドホルモンを抱合代謝する肝 UDT-グルクロン酸転  
移酵素 (UGT) 活性値を測定し、脂肪肝との関連について検討した。  
肝 UGT 活性値の測定は放射性エストラジオール-17 $\beta$  を基質として  
測定した。卵胞囊腫牛 62 頭と正常発情周期牛 8 頭の肝 UGT 活性値

は  $2.19 \pm 0.15$  pM/min/mg protein と  $4.28 \pm 0.22$  pM/min/mg protein であり、卵胞嚢腫牛の値は正常発情周期牛の値より有意に低値であった ( $P < 0.01$ )。

卵胞嚢腫牛における肝疾患と肝 UGT 活性値との関連についても検討した。卵胞嚢腫牛 62 頭の肝臓病理組織検査を行ったところ、62 頭中 30 頭に肝疾患（脂肪肝および肝炎）が観察されたが、残り 32 頭に肝疾患は見られなかった。これらの肝 UGT 活性値は肝疾患群で  $1.57 \pm 0.12$  pM/min/mg protein、非肝疾患群で  $2.78 \pm 0.23$  pM/min/mg protein であり、正常発情周期牛に比べ有意に低値であった ( $P < 0.01$ )。一方、正常発情周期牛と同一ステージである分娩後 60～90 日に限定して検討したところ、肝疾患群と非肝疾患群の UGT 活性値はそれぞれ  $1.27 \pm 0.20$  と  $3.10 \pm 0.51$  pM/min/mg protein であり、正常発情周期群と肝疾患群との間に有意差を認めたが、非肝疾患群との間には有意差は見られなかった。

肝 UGT 活性値を低値群、中間値群、高値群の 3 群に区分して、肝疾患との関係性を検討したところ、肝 UGT 活性値の低値群 ( $2.0$  pM/min/mg protein 以下) では肝疾患が 78.1% 含まれたのに対し、中間群 ( $2.0 \sim 3.0$  pM/min/mg protein) では 22.2%、高値群 ( $3.0$

pM/min/mg protein 以上)では 8.3% であった。

これらの結果から、肝臓におけるエストラジオール-17 $\beta$ ・ UGT 活性の低下と肝疾患は乳牛の卵胞嚢腫発症に密接な関係を有することが示唆された。しかしながら、分娩後 60～90 日に限定した場合の非肝疾患群と正常発情周期群との間における肝 UGT 活性値には有意差はなく、非肝疾患の卵胞嚢腫発症には他の要因のあることが示唆された。

#### 第 4 章 脂肪肝牛における胆汁中ステロイドホルモンに関する研究

本章では、脂肪肝牛におけるステロイドホルモンの肝臓代謝機能を間接的に知る目的で脂肪肝牛と正常肝牛の胆汁中非抱合型エストロジェンおよびコルチゾールを測定、比較検討した。肝臓の理病組織検査により正常肝群 179 頭（肝脂肪沈着度 10% 未満）、軽度群 65 頭（肝脂肪沈着度 10% 以上 30% 未満）、中・重度群 44 頭（肝脂肪沈着度 30% 以上）の 3 群に区分した。乳牛の胆汁中エストロジェン 3 分画値を測定したところ、正常肝群、軽度脂肪肝群、中・重度群において何れもエストロンが最高値で、エストリオールが最低値であった。正常肝群、軽度群、中・重度群との比較において胆汁中エストロジェン 3 分画値は中・重度群で最も高く、正常肝群で

最も低く、両者の間に有意差が認められた ( $P<0.01$ )。胆汁中コルチゾール値は軽度群と正常肝群間では差異は見られなかったが、中・重度群の値は前者より有意に高かった ( $P<0.01$ )。以上のことから、脂肪肝レベルの上昇に伴い肝臓のステロイドホルモンの抱合代謝能が低下した結果、胆汁中のエストロジェンおよびコルチゾールの濃度が増加することが示唆された。

## 第5章 脂肪肝牛におけるチオプロニンの治療効果と予後

本章ではケトーシス発症牛を対象として肝生検を実施し、肝実質に10%以上の脂肪沈着を認め脂肪肝と診断された63頭のホルスタイン乳牛に、肝賦活剤であるチオプロニン(MPG)を投与し、治療効果を検討した。これら63頭の脂肪肝牛に対して、MPG剤を1日1回50ml (2,500 mg) または100 ml (5,000 mg) を単用で使用したところ、34頭中30頭(88.2%)で治療効果が認められた。また、他剤無効例に対してMPG剤を使用した群においても29頭中19頭(65.5%)が治癒し、脂肪肝においてMPG剤は高い治療効果を有することが判明した。MPG投与群63頭中49頭(77.7%)で食欲、乳量の回復、臨床症状の改善、終診時の肝生検により肝沈着脂肪の消失を

認め脂肪肝の治癒を確認した。しかしながら、脂肪肝におけるMPG剤投与が6回以下の治癒率は61.9%であり、ケトーシス牛における治癒率95.8%に比較すると、脂肪肝はケトーシスよりMPG剤投与開始から治癒までの投与回数と経過日数を多く要することが伺えた。MPG剤の脂肪肝に対する治療効果は肝脂肪沈着度が30%未満群で治癒率84.2%、30%以上群では治癒率75%であり、有意な差異は認められず、さらに症例を重ねて検討する必要がある。

同時に検査した血液生化学的所見では、臨床症状の改善した牛群(予後良好群)において血清NEFA、GT、ALP、T-Bil ( $P<0.01$ )、BUN ( $P<0.05$ )の低下を認めた。一方、改善の認められなかった牛群(予後不良群)ではGOT、GPT、 $\gamma$ -GTP ( $P<0.05$ )の上昇を認めた。

また、チオプロニン投与後のGOT、ALP、T-Bil、ZTT、BUNが初診時に較べ上昇し高値となったものや、GOTが100IU以上で肝脂肪沈着度が30%以上を示した脂肪肝牛は予後不良であることが多く死廃に繋がることが判明した。

## 第6章 チオプロニンによる卵胞囊腫牛の治療効果

本章では卵胞囊腫牛に肝賦活剤のチオプロニン(MPG)を単独投与したものとhCG治療後に再発した卵胞囊腫牛にMPGを投与して、



その治療効果を検討した。卵胞嚢腫の診断は7日間隔で2～3回の直腸検査を行い、直径25 mm 以上の卵胞が遺残し、黄体の存在を認めない卵胞嚢腫牛53 頭を供試した。卵胞嚢腫の発情徴候別区分では無発情型33 頭(62.2%)、持続発情型15 頭(28.3%)、思牡狂型5 頭(9.4%)であった。

卵胞嚢腫初診牛にMPG剤を投与した15 頭中13 頭(86.7%)に黄体形成が見られ、初診時hCG治療に無効であった卵胞嚢腫牛にMPG剤を投与した場合でも16 頭中9 頭(56.3%)に黄体形成が認められた。さらに、卵胞嚢腫の初診時にhCGとMPGを同時投与したところ、12 頭中7 頭(58.3%)に黄体形成が見られ、初診時のhCG無効例にhCGとMPGを同時投与した場合でも10 頭中7 頭(70%)に黄体形成が認められた。治療効果の見られたMPG群 (22 頭) における黄体形成は治療後1～2 週間で殆どの例に認められ、hCG+MPG投与群(14頭) でも同様であった。卵胞嚢腫の発情徴候分類別の治療効果は無発情型で最も高く、持続発情型ではやや低く、思牡狂型では全例が無効であった。

以上の結果から卵胞嚢腫牛への肝賦活剤MPG剤投与は従来から使用されているホルモン剤であるhCGと同等の治療効果があり、

hCGに効果のなかった症例にも効果を有することが証明された。

本研究では、周産期疾患の基礎疾患となる牛脂肪肝が卵胞嚢腫発症の原因になる可能性および脂肪肝を治療することで卵胞嚢腫が治癒する可能性を検討した。分娩後のケトosis発症時に肝脂肪沈着度が高い個体程、卵巣疾患およびその他の疾患による305日以内の廃用率が高いことを認めた。卵胞嚢腫牛における肝UGT活性値は正常発情周期牛と比較して有意に低く、肝UGT活性値の低値群では肝疾患併発率が高いことを確認した。肝賦活作用のあるMPGは脂肪肝牛に対して高い治療効果を有することを認め、MPGが卵胞嚢腫に対しても従来のホルモン剤と同等の治療効果のあることを証明した。

本研究結果は、分娩後に多発する乳牛の卵胞嚢腫が脂肪肝と密接な関連性を有すること、脂肪肝に高い治療効果を有する肝賦活剤が卵胞嚢腫にも高い治療効果を有することを明らかにした点で、卵胞嚢腫の発症機序および治癒機転に関して新たな知見を与えるものと考えられる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご指導、ご助言を賜りました日本大学  
獣医臨床繁殖学研究室 津曲茂久教授、(故)武石昌敬前教授に衷心  
より御礼申し上げますと同時に、本論文のご高閲ならびにご助言を  
賜りました獣医病理学研究室 佐藤常男教授ならびに獣医産業動物  
臨床研究室 堀北哲也教授に心より御礼申し上げます。また、研究  
を進めるにあたり、多大なご助言、ご協力を戴きました獣医臨床繁  
殖学研究室 大滝忠利専任講師にも深く感謝申し上げます。さらに  
獣医臨床繁殖学研究室研究室員の先輩、並びに研究を手伝って頂き  
ました後輩に深謝いたします。最後になりましたが、診療を介し、  
採材、調査に快くご協力くださいました酪農家の方々にも厚く御礼  
申し上げます。

## 引用文献

1. Armstrong, D. G., Gong, J. G. and Webb, R. 2003. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: Physiological, cellular and molecular mechanisms. *Reprod. Suppl.* 61: 403-414.
2. Barr, R. W. and Sommers, S. C. 1957. Endocrine abnormalities accompanying hepatic cirrhosis and hepatoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 17:1017-1029.
3. Bartlett, P. C., Ngategize, P. K., Kaneene, J. B., Kirk, J. H., Anderson, S. M. and Mather, E. C. 1986. Cystic follicular disease in Michigan Holstein-Friesian cattle: Incidence, descriptive epidemiology and economic impact. *Prev. Vet. Med.* 4: 15-33.
4. Beam, S. W. 1995. Follicular development in postpartum cattle: effects of energy balance and dietary lipid. *Ph.D Dissertation, Cornell University*, p.124-136
5. Beam, S. W. and Butler, W. R. 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol. Reprod.* 56: 133-142.
6. Beam, S. W. and Butler, W. R. 1999. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54: 411-424.
7. Bobe, G., Young, J. W. and Beitz, D. C. 2004. Invited review: Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87: 3105-3124.
8. Bobe, G., Ametaj, B. N., Young, J. W., Anderson, L. L. and Beitz, D. C. 2007. Exogenous glucagon effects on health and reproductive performance of lactating dairy cows with mild fatty liver. *Anim. Reprod. Sci.* 102: 194-207.
9. Bosu, W. T. K. and Peter, A. T. 1987. Evidence for a role of intrauterine infections in the pathogenesis of cystic ovaries in

- postpartum dairy cows. *Theriogenology* 28:725–736.
10. Brito, L. F. C. and Palmer, C. W. 2004. Cystic ovarian disease in cattle. *Large Domest. Anim.* 30: 36-38.
  11. Brown, J. L., Schoenemann, H. M. and Reeves, J. J. 1986. Effect of treatment on LH and FSH receptors in chronic cystic-ovarian diseased dairy cows. *J. Anim. Sci.* 62: 1063-1071.
  12. Drackley, J. K. 1999. Biology of dairy during the transition period:the final frontier? *J. Dairy Sci.* 82: 2259-2273.
  13. Butler, W. R., Evertt, R. W. and Coppock, C. E. 1981. The relationship between energy balance, milk production and ovulation in postpartum Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 53: 742-748.
  14. Bulter, S. T., Pelton, S. H. and Bulter, W. R. 2004. Insulin increases 17 beta-estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reproduction* 127: 537-545.
  15. Bulter, S. T., Pelton, S. H. and Bulter, W. R. 2006. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. *J. Dairy Sci.* 89: 2938-2951.
  16. Calder, M. D., Salfen, B. E., Bao, B., Youngquist, R. S. and Garverick, H. A. 1999. Administration of progesterone to cows with ovarian follicular cysts results in a reduction in mean LH and LH pulse frequency and initiates ovulatory follicular growth. *J. Anim. Sci.* 77: 3037-42.
  17. Collins, R. A. and Reid, I. M. 1980. A correlated biochemical and stereological study of periparturient fatty liver in the dairy cow. *Res. Vet. Sci.* 28: 373-376.
  18. Cook, D. L., Parfet, J. R., Smith, C. A., Moss, G. E., Youngquist, R. S. and Garverick, H. A. 1991. Secretory patterns of LH and FSH during development and hypothalamic and hypophysial characteristics following development of steroid-induced ovarian follicular cysts in dairy cattle. *J. Reprod. Fertil.* 91: 19-28

19. Cook, D. L., Smith, C. A., Parfet, J. R., Youngquist, R. S., Brown, E. M. and Garverick, H. A. 1990. Fate and turnover rate of ovarian follicular cysts in dairy cattle. *J. Reprod. Fertil.* 90: 37-46.
20. Coppock, C. E., Noller, C. H., Wolfe, S. A., Callahan, C. J. and Baker, J. S. 1972. Effect of forage concentrate ratio in complete feeds fed ad libitum on feed intake prepartum and the occurrence of abomasal displacement in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 55: 783-789.
21. Day, N. 1991. The diagnosis, differentiation, and pathogenesis of cystic ovarian disease. *Vet. Med.*, July:753-760.
22. Dobson, H., Ribadu, A. Y., Noble, K. M., Tebble, J. E., Ward, W. R. 2000. Ultrasonography and hormone profiles of adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-induced persistent ovarian follicles (cysts) in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 120: 405–410.
23. Drost, M. and Thatcher, W. W. 1992. Application of gonadotropin releasing hormone as therapeutic agent in animal reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 28: 11-19.
24. Garverick, H. A. 1997. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80: 995-1004.
25. Garverick, H. A., Kesler, D. J., Cantley, T. C., Elmore, R. G., Youngquist, R. S. and Bierschwal, C. J. 1976. Hormone response of dairy cows with ovarian cysts after treatment with HCG or GnRH. *Theriogenology* 6: 413-425.
26. Geelen, M. J. and Wensing, T. 2006. Studies on hepatic lipidosis and coinciding health and fertility problems of high-producing dairy cows using the “Utrecht fatty liver model of dairy cows”. A Review. *Vet. Q.* 28: 90-104.
27. Gerloff, B. J., Herdt, T. H. and Emery, R. S. 1986. Relationship of hepatic lipidosis to health and performance in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188: 845-850.
28. Dinsmore, R. P., White, M. E., Guard, C. L., Jasko, D. J., Perdrietz, J. A., Powers, P. M. and Smith, M. C. 1987. A randomized double blind clinical trial of two GnRH analogs

- for the treatment of cystic ovaries in dairy cows. *Cornell Vet.* 77: 235-243.
29. Dinsmore, R. P., White, M. E. and English, P. B. 1990. An evaluation of simultaneous GnRH and cloprostenol treatment of dairy with cystic ovaries. *Can. Vet. J.* 31: 280-284.
  30. Glister, C., Tannetta, D. S., Groome, N. P. and Knight, P. G. 2001. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. *Biol. Reprod.* 65: 1020-1028.
  31. Gröhn, Y., Lindberg, L. A., Bruss, M. L. and Farrer, T. B. 1983. Fatty infiltration of liver in spontaneously ketotic dairy cows. *J. Dairy Sci.* 66: 2320-2328.
  32. Grummer, R. R. 2008. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *Vet. J.* 176:10-20.
  33. Grummer, R. R., Bertics, S. J., Lacount, D. W., Snow, J. E., Dentine, M. R. and Stauffacher, R. H. 1990. Estrogen induction of fatty liver in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 73: 1537-1543.
  34. Grummer, R. R., Mashek, D. G. and Hayirli, A. 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet. Clin. North Am. Food Anim.* 20: 447-470.
  35. Gümen, A., Sartori, R., Costa, F. M. J. and Wiltbank, M. C. 2002. A GnRH/LH surge without subsequent progesterone exposure can induce development of follicular cysts. *J. Dairy Sci.* 85: 43-50.
  36. Gümen, A. and Wiltbank, M. C. 2002. An alteration in the hypothalamic action of estradiol due to lack of progesterone exposure can cause follicular cysts in cattle. *Biol. Reprod.* 66: 1689- 1695.
  37. Hamilton, S. A., Garverick, H. A., Keisler, D. H., Xu, Z. Z., Loos, K., Youngquist, R. S. and Salfen, B. E. 1995. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. *Biol. Reprod.* 53:890-898.



38. 原田豊造, 森木一雅, 津曲茂久, 大場茂夫, 武石昌敬, 永井亨, 檜山公明, 石井徹宏, 奥田 勝, 小倉喜八郎, 大竹 修, 酒井健夫, 長尾壮七, 井上 勇. 1986. 乳牛のケトーシスに対するチオプロロニンの治療効果. *日獣会誌* 39: 345-352.
39. Herdt, T. H. 2000. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influence on the etiology of ketosis and fatty liver. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16: 215-230.
40. Higgins, R. J. and Anderson, W. S. 1983. Fat cow syndrome in a British dairy herd. *Vet. Rec.* 113: 461-463.
41. Hippen, A. R., She, P., Young, J. W., Beitz, D. C., Lindberg, G. L., Richardson, L. F. and Tucker, R. W. 1999. Alleviation of fatty liver in dairy cows with 14-day intravenous infusions of glucagon. *J. Dairy Sci.* 82: 1139-1152.
42. Holtenius, P. and Holtenius, K. 1996. New aspects of ketone bodies in energy metabolism of dairy cows: a review. *J. Vet. Med. Series A* 43: 579-587.
43. 本庄英雄. 1979. エストロゲン代謝と腸肝循環. *日本臨床*, 37: 1186-1192.
44. Huszenicza, G. Y., Kulcsár, M., Dieleman, S. J., Nikolic, J. A., Jánosi, S. Z., Kóródi, P., Bartzyk, J., Ribiczei-Szabó, P. and Rudas, P. 1998. Endocrine alterations and resumption of cyclic ovarian function in dairy cows affected by various forms of hyperketonaemia in early weeks of lactation. In: Wensing, T. (Ed.): *Production diseases in farm animals. Abstracts of 10th International Conference, 24-28 August*. Wageningen Press, Utrecht, The Netherlands, p. 239
45. 市田文弘, 瀧野辰郎, 鈴木 宏, 藤沢 例, 井上恭一, 平山千里, 海藤 勇, 平沢 堯, 亀田治 男, 井上十四郎, 佐藤源一郎, 小坂義種, 山本祐夫, 長島秀夫, 太田康幸, 岡田寿太郎. 1980. 慢性肝炎に対するチオプロロニンの治療効果について一二重盲検法による臨床試験. *肝胆膵*. 1: 127-149.



46. Ing, N. H. and Tornesi, M. B. 1997. Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biol. Reprod.* 56: 1205-1215.
47. Jorritsma, R., Jorritsma, H., Schukken, Y. H. and Wentink, G. H. 2000. Relationships between fatty liver and fertility and some periparturient diseases in commercial Dutch dairy herds. *Theriogenology* 54: 1065-1074.
48. Jorritsma, R., Jorritsma, H., Schukken, Y. H., Bartlett, P. C., Wensing, T. H. and Wentink, G. H. 2001. Prevalence and indicators of post partum fatty infiltration of the liver in nine commercial dairy herds in the Netherlands. *Livest. Prod. Sci.* 68: 53-60.
49. Katoh, N. 2000. Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 64: 293-307.
50. Kawashima, C., Fukihara, S., Maeda, M., Kaneko, E., Montoya, C. A., Matsui, M., Shimizu, T., Matsunaga, N., Kida, K., Miyake, Y., Schams, D. and Miyamoto, A. 2007. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction* 133: 155-163.
51. Kahn, C. M. 2010. Cystic ovary disease. In: Kan, C. M. and Line, S. (eds). *The Merck Veterinary Manual*. 10th ed. Whitehouse Station, NJ: Merk., p1243-1247.
52. Kaneko, H., Todoroki, J., Noguchi, J., Kikuchi, K., Mizoshita, K., Kubota, C. and Yamakuchi, H. 2002. Perturbation of estradiol-feedback control of luteinizing hormone secretion by immunoneutralization induces development of follicular cysts in cattle. *Biol. Reprod.* 67: 1840-1845.
53. Kengaku, K., Tanaka, T. and Kamomae, H. 2007. Changes in the peripheral concentrations of inhibin, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, progesterone and estradiol-17beta during turnover of cystic follicles in dairy

- cows with spontaneous follicular cysts. *J. Reprod. Dev.* 53: 987-993.
54. Kesler, D. J. and Garverick, H. A. 1982. Ovarian cysts in dairy cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 55: 1147-1159.
  55. Kim, S., Kengaku, K., Tanaka, T. and Kamomae, H. 2002. The therapeutic effect of a progesterone-releasing intravaginal device(PRID) with attached estradiol capusule on ovarian quiescence and cystic ovarian disease in postpartum. *J. Reprod. Dev.* 50: 341-348.
  56. Kimura, Y., Arai K., Minato, K. and Noro, A. 1993. Changes in milk, blood and rumen components at each lactation stage of dairy cows with high milk production. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 46: 385-391. (in Japanese with English summary)
  57. Kittok, R. J., Britt, J. H. and Edgerton, L. A. 1974. Serum steroids after gonadotropin treatment in cows with ovarian follicular cysts. *Am. J. Vet. Res.* 35: 1575-1576.
  58. Kobayashi, Y., Boyd, C. K., McCormack, B. L. and Lucy, M. C. 2002. Reduced insulin-like growth factor-I after acute feed restriction in lactating dairy cows is independent of changes in growth hormone receptor 1A mRNA. *J. Dairy Sci.* 85: 748-754.
  59. 小岩政照, 石見誠一, 高橋英世, 安田牧人, 野村武, 大江通, 梅尾一馬, 石橋泰, 北島哲也. 1982. 治療効果を基礎にしたケトosis牛の臨床学的ならびに臨床病理学的観察. *家畜診療* 225: 27-31.
  60. 小岩政照, 中垣大輔, 田口 清, 島田圭一, 山本康朗. 2006. 乳牛の脂肪肝. *臨床獣医* 24: 41-46.
  61. Laporte, H. M., Hogeveen, H., Schukken, Y. H. and Noordhuizen, J. P. T. M. 1994. Cystic ovarian disease in Dutch dairy cattle, I. Incidence, risk factors and consequences. *Livest. Product. Sci.* 38: 191-197.
  62. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Radall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

63. McCann., V. J. and Fulton, T. T. 1975. Cortisol metabolism in chronic liver disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 40: 1038-1044.
64. McCormack., J. 1978. Fat cow syndrome and its complications. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 73: 1057-1060.
65. Morrow, D. A. 1976. Fat cow syndrome. *J. Dairy Sci.* 59: 1625-1629.
66. Morrow , D. A., Hillman, D., Dade, A. W. and Kitchen, Y. 1976. Clinical investigation of a dairy herd with the fat cow syndrome. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 174: 161-167.
67. Nakagawa-Ueda, H. and Katoh, N. 2000. Reduction in serum lecithin:cholesterol acyltransferase activity prior to the occurrence of ketosis and milk fever in cows. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 1263-1267.
68. Nanda, A. S., Ward, W. R., Williams, P. C. and Dobson, H. 1988. Retrospective ananysis of the efficacy of different hormone treatments on cystic ovarian disease in cattle. *Vet. Rec.* 122: 155-158.
69. Norin, K. E., Persson, A. K., Saxerholt, H. and Midtvedt, T. 1991. Establishment of Lactobacillus and Bifidobacterium species in germfree mice and their influence on some microflora-associated characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1850-1852.
70. 農林水産省農林経済局編、2009. 農業災害補償制度家畜共済統計表, p. 640, 農林水産省経済局, 東京.
71. Ono, M., Ohtaki, T., Tanemura, K., Ishii, M., Watanabe, G., Taya, K. and Tsumagari, S. 2011. Effect of short-term fasting on hepatic steroid hormone metabolism in cows. *J. Vet. Med. Sci.* 73: 1145-1150.
72. Parkinson, T. 2009. Infertility and subfertility in the cow: structural and functional abnormalities, management deficiencies and non-specific infections. pp. 393-475. *In: Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 9tn ed. (Noakes, D. E.,

- Parkinson, T. J. and England, G. C. W. eds.), Elsevier, Amsterdam.
73. Patton, J., Kenny, D. A., McNamara, S., Mee, J. F., O'Mara, F. P., Diskin, M. G. and Murphy, J. J. 2007. Relationships among milk production, energy balance, plasma analytes, and reproduction in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 90: 649-658.
74. Peter, A. T. 2004. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 39: 1-7
75. Radcliff, R. P., McCormack, B. L., Keisler, D. H., Crooker, B. A. and Lucy, M. C. 2006. Partial feed restriction decrease growth hormone receptor 1A mRNA expression in postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89: 611-619.
76. Rao, G. S., Haueter, G., Rao, M. L. and Breuer, H. 1977. Steroid glucuronyltransferases of rat liver. *Biochem. J.* 162: 545-556.
77. Reid, I. M. 1980. Incidence and severity of fatty liver in dairy cows. *Vet. Rec.* 107: 281-284.
78. Reid, I. M., Dew, S. M., Collins, R. A., Ducker, M. J., Bloomfield, G. A. and Morant, S. V. 1983. The relationship between fatty liver and fertility in dairy cows: a farm investigation. *J. Agr. Sci.* 101: 499-502.
79. Reid, I. M. and Roberts, C. J. 1982. Fatty liver in dairy cows. *In Practice* 4: 164-169.
80. Reid, I. M. and Roberts, C. J. 1983. Subclinical fatty liver in dairy cows. Current research and future prospects. *Irish Vet. J.* 37: 104-110.
81. Reid, I. M., Roberts, C. J. and Manston, R. 1979a. Fatty liver and infertility in high-yielding dairy cows. *Vet. Rec.* 104: 75-76.
82. Reid, I. M., Roberts, C. J. and Manston, R. 1979b. Reduced fertility associated with fatty liver in high-yielding dairy cows.

- Vet. Sci. Commun.* 3: 231-236.
83. Roberts, S. J. 1986. Infertility in the cow. p. 495-512. In: Veterinary Obstetrics and Genital Disease (Theriogenology) 3rd ed., Edwards Brothers Inc., Michigan.
84. Roberts, C. J., Reid, I. M., Rowlands, G. J. and Patterson, A. 1981. A fat mobilization syndrome in dairy cows in early lactation. *Vet. Rec.* 108: 7-9.
85. Rowlands, G. J., Little, W., and Kitchenham, B. A. 1977. Relationships between blood composition and fertility in dairy –a field study. *J. Dairy Res.* 44: 1-7.
86. Rowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Proteine measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
87. Rukkwamsuk, T., Kruip, T. A. M. and Wensing, T. 1999. Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *Vet. Q.* 21: 71-77.
88. Sakaguchi, M. 2011. Practical aspects of the fertility of dairy cattle. *J. Reprod. Dev.* 57: 17-33.
89. Sakaguchi, M., Sasamoto, Y., Suzuki, T., Takahashi, Y. and Yamada, Y. 2006. Fate of cystic ovarian follicles and the subsequent fertility of early postpartum dairy cows. *Vet. Rec.* 159: 197-201.
90. Sato, S., Ono, H., Uematu, M., Hatakeyama, N. and Tunoda, M. 2003. Blood components of periparturient diseased cows during dry periods. *Jpn. J. Large Anim. Clin.* 26: 21-26. (in Japanese with English summary)
91. 佐藤輝夫, 白川潤, 藤田光男, 落合久, 町田了. 1983. 家畜診療 245: 25-29.
92. Seguin, B. E., Convey, E. M. and Oxender, W. D. 1976. Effect of gonadotropin-releasing hormone and human chorionic gonadotropin on cows with ovarian follicular cysts. *Am. J. Vet. Res.* 37: 153-157.

93. 島田保昭. 1984. 肝機能不全とその影響. *獣医界* 125: 50-57.
94. Silvia, W. J., Hatler, T. B., Nugent, A. M. and Laranja da Fonseca, L. F. 2002. Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23:167-177.
95. Simerly, R. B., Carr, A. M., Zee, M. C. and Lorang, D. 1996. Ovarian steroid regulation of estrogen and progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the anteroventral periventricular nucleus of the rat. *J. Neuroendocrinol.* 8: 45-56.
96. Sovani, S., Heuer, C., Straalen, W. M. and van Noordhuizen, J. P. T. M. 2000. Disease in high producing dairy cows following post parturient negative energy balance. *Proceeding Soc. Vet. Epid. Prev. Med, Annual Conference*, Edinburgh. p.137-150
97. Spicer, L. J., Alpizar, E. and Echternkamp, S. E. 1993. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor in vitro. *J. Anim. Sci.* 71: 1232-1241.
98. Staples, C. R., Thatcher, W. W. and Clark, J. H. 1990. Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum period of high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 73: 938-948.
99. Stobel, D. P. and Moberg, G. P. 1982. Effect of adrenocorticotropin and cortisol on luteinizing hormone surge and estrous behavior of cows. *J. Dairy Sci.*, 65: 1016-1024.
100. 武石昌敬, 永井亨, 八反田盛近, 原田豊造, 常包正. 1976. 乳牛の卵胞嚢腫に関する研究. -5- 症状別による胆汁中のエストロゲン排泄. *獣畜新報* 658 : 279-281.
101. Tamura, T., Seimiya, Y., Takahashi, M. and Murakami, R. 2003. Hepatic encephalopathy associated with severe fatty liver in a post-parturient cow. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 56: 587-591. (in Japanese with English summary)



102. 種村高一, 大場茂夫, 平井定, 西山篤, 津曲茂久, 武石昌敬.  
1986. 脂肪肝牛に対するチオプロニンの治療効果. *日獣会誌* 39:  
749-756.
103. Tanemura, K., Ohtaki, T., Ono, M. and Tsumagari, S. 2016.  
Development of ovarian diseases in dairy cows with a history of  
fatty liver, and their prognosis. *J. Vet. Med. Sci.* 78: 755-760.
104. Tanemura, K., Ohtaki, T., Kuwahara, Y. and Tsumagari, S.  
2017. Association between liver failure and hepatic  
UDP-glucosyltransferase activity in dairy cows with follicular  
cysts. *J. Vet. Med. Sci.*, doi:10.1292/jvms. 15-0674.
105. Tsumagari, S., Kamata, K., Takagi, K., Tanemura, A, Yosai,  
A., Takeishi, M. 1993. Aromatase activity and oestrogen  
concentrations in bovine cotyledons and caruncles during  
gestation and parturition, *J. Reprod. Fertil.* 98: 631-636.
106. 常包正, 中川英夫, 古川岩雄, 石坂謙一, 吉田信行. 1956. 牛  
の繁殖障害と肝機能について I. 牛の卵巣囊腫の治療. *日獣会誌*  
9: 210-214.
107. Vanholder, T., Leroy, J. L., Dewulf, J., Duchateau, L., Coryn,  
M., de Kruif, A. and Opsomer, G. 2005. Hormonal and  
metabolic profiles of high-yielding dairy cows prior to ovarian  
cyst formation or first ovulation post partum. *Reprod. Domest.  
Anim.* 40: 460-467.
108. Vanholder, T., Opsomer, G. and de Kruif, A. 2006. Aetiology  
and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a  
review. *Reprod. Nutr. Dev.* 46: 105-119.
109. Veenhuizen, J. J., Drackley, J. K., Richard, M. J.,  
Sanderson, T. P., Miller, L. D. and Young, J. W. 1991. Metabolic  
changes in blood and liver during development and early  
treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows. *J.  
Dairy Sci.* 74: 4238-4253.
110. Wada, Y., Muto, M. and Matsuura, K. 1995. Prognosis of  
cows with displaced abomasum and fatty infiltration of the  
liver. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 48: 387-390. (in Japanese with  
English summary)

111. Watson, E. D. and Williams L. A. 1987. Influence of liver fat on post-partum hormone profiles in dairy cows. *Anim. Prod.* 45: 9-14.
112. White, H. M. 2015. The role of TCA cycle anaplerosis in ketosis and fatty liver in periparturient dairy cows. *Animals* 5: 793-802.
113. Wiltbank, M., Lopez, H., Sartori, R., Sangsritavong, S. and Gümen, A. 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 65: 17-29.
114. Xu, J., Kulkarni, S. R., Li, L. and Slitt, A. L. 2012. UDP-glucuronosyltransferase expression in mouse liver is increased in obesity- and fasting-induced steatosis. *Drug Metab. Dispos.* 40: 259-266.
115. 山下厚, 甲山譲児, 久保保. 1984. 乳牛に対するチオプロニン製剤の投与による血液成分等の観察. *家畜診療* 247: 37-40.
116. Yoshioka, K. and Iwamura, S. 1996. Ultrasonic observations on the turnover of ovarian follicular cysts and associated changes of plasma LH, FSH, progesterone and oestradiol-17beta in cows. *Res. Vet. Sci.* 61: 240-244.
117. You, L., 2004, Steroid hormone biotransformation and xenobiotic induction of hepatic steroid metabolizing enzymes. *Chem. Biol. Interact.* 147: 233-246.
118. Youngquist, R. S. 1986. Cystic follicular degeneration in the cow. In: Morrow D (editor). *Current therapy in Theriogenology*. 2nd ed., 1986, Philadelphia, WB Saunders Co. p 243-246
119. 全国農業共済協会編 2002. *家畜共済の診療指針 I* p73, 全国農業共済協会, 東京.
120. Zulu, V. C., Nakao, T. and Sawamukai, Y. 2002. Insulin-like growth factor- I as a possible hormonal mediator of nutritional regulation of reproduction in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 64: 657-665.
121. Zulu, V. C., Sawamukai, Y., Nakada, K., Kida, K. and Moriyoshi, M. 2002. Relationship among insulin-like growth



- factor-I, blood metabolites and post partum ovarian function in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 64: 879-885.
122. Zumoff, B., Bradlow, H. L., Gallagher, T. F. and Hellman, L. 1967. Cortisol metabolism in cirrhosis. *J. Clin. Invest.* 46: 1735-1743.