

周産期乳牛の血乳症における病態と  
酸化ストレスに関する研究

2022年9月

岩手大学大学院  
獣医学研究科  
黒岩 朋子

# 目次

緒言	3
第Ⅰ章 周産期のホルスタイン種乳牛における血乳症の発生状況	7
1-1. 序論	7
1-2. 材料と方法	7
1) 試験 1: 血乳症の発生および治療状況	7
2) 試験 2: 血乳症の発生時期	8
3) 試験 3: 血乳症における乳汁中体細胞	9
1-3. 結果	11
1) 試験 1: 血乳症の発生および治療状況	11
2) 試験 2: 血乳症の発生時期	13
3) 試験 3: 血乳症における乳汁中体細胞	13
1-4. 考察	14
第Ⅱ章 ホルスタイン種乳牛における周産期の生理的血乳症における血液凝固能	16
2-1. 序論	16
2-2. 材料と方法	18
1) 試験 1: VK1 製剤投与による血乳症早期治療効果	18
2) 試験 2: 周産期乳牛の VK3 製剤の投与効果	19
2-3. 結果	23
1) VK1 製剤投与による血乳症早期治療効果	23
2) 周産期乳牛の VK3 製剤の投与効果	23
2-4. 考察	24

第 III 章	ホルスタイン種乳牛の周産期の血乳症発現における酸化ストレスの関係 .....	27
3-1.	序論 .....	27
3-2.	材料と方法 .....	28
1)	試験 1：分娩後 5 日目における酸化ストレスの比較 ...	28
2)	試験 2：周産期における酸化ストレスの推移と血乳症との関連 .....	32
3)	試験 3：周産期乳牛の酸化ストレスおよび生理的血乳症に対するトレハロースの給与効果 .....	34
3-3.	結果 .....	36
1)	分娩後 5 日目における酸化ストレスの比較 .....	36
2)	周産期における酸化ストレスの推移と血乳症との関連	36
3)	周産期乳牛の生理的血乳症に対するトレハロースの ..	37
	給与効果 .....	37
3-4.	考察 .....	37
	総括 .....	40
	謝辞 .....	44
	引用文献 .....	46
	図表 .....	59

## 緒言

近年，飼養管理技術が向上し，また検定事業の普及等により乳牛の改良が進んだことから，乳牛1頭あたりの年間平均乳量は飛躍的に増加している。農林水産省の統計によると，日本のホルスタイン種における一頭当たりの平均年間乳量は2020年には8800 kg台まで伸びた（Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 2022）。酪農家一戸あたりの飼養頭数も増加傾向にあり，百頭から数百頭を飼養する大規模農場も増加しつつある。しかし依然として，数頭から数十頭を飼育する小・中規模農家も多く，平均産乳量の増加に伴い乳牛1頭の価値は高まっている。

血乳症とは，乳汁中に赤血球が混入し，乳汁が赤味を帯びた状態である [Bradford, 2001]。乳牛においてしばしば観察されるが，ヤギやバッファローなど，乳牛以外の哺乳動物でも報告がある [Ayaz, 1999; Purohit, 2014]。血乳の程度は，ごく微量の血液が混入してわずかにピンク色を呈したのから，鮮血様のものまで様々である (Fig. 1) [Kikuchi et al., 2013; Frail, 2019]。いずれにしても，このような乳汁は異常乳として廃棄処分を与儀無くされる。血乳症の原因として乳房炎 [Venkatesan, 2017] やレプトスピラ感染症 [Saravanan and Palanival, 2018] が報告されている。また，乳房の打撲や乳頭の損傷 [George et al., 2008]，過搾乳も原因となる。その他にもビタミン K (VK) 欠乏 [Venkatesan, 2019] やビタミン C (VC) 欠乏 [Heidrich and Renk, 1967] も血乳の要因となり得る。明らかな原因が認められず，原因不詳の血乳

症もある [Frail et al., 2019; Venkatesan, 2019]。分娩後数日以内に発生し、感染や外傷を伴わない血乳は生理的なものと考えられており、通常 2 週間程度で自然に治癒する [Heidrich and Renk, 1967; Venkatesan et al., 2019]。しかしながら、1 か月以上続く症例も散見される。また、畜主が誤って血乳をバルク乳に混入させることにより、バルク乳を全廃棄した事例もある。さらには、集乳車のタンク乳が全廃棄となる事故もたびたび発生する。宮城県内の一酪農組合において、平成 18 年から 22 年までの 5 年間に発生した集乳車のタンク乳廃棄事故のおよそ 3 割が血乳によるものであったという報告もある [Kikuchi et al., 2013]。そのため、血乳症が酪農現場に与える損害は甚大である。それにも関わらず、血乳症に関する研究報告は少ない。我が国では 1966 年の獣医畜産新報に血乳症に関する記述があり、その中で 1 か月以上継続する難治性の血乳症も報告されている [高桑 et al., 1966]。しかし、今日に至るまで、その病態、発生機序、および治療法等に関して何ら研究は進展しておらず、治療法においては古くから現在に至るまで VK1 製剤やトラネキサム酸製剤などの止血剤の投与が慣例的に行われている。乳房炎や外傷を伴わない場合、血乳症が本牛の生命を脅かすことは無いが、それ故に血乳症の研究が進められてこなかったと考えられる。しかし、前述のとおり血乳症が酪農場および経営者に与える経済的・精神的負担は大きく、より効果的な治療法や予防法の確立が求められている。そのために、血乳症の病態および発生要因の解明が重要である。

乳牛の乳腺組織は周産期において様々なホルモンの影響を受けてダイナミックに変化する。乳房は腺房細胞がブドウの房状に乳腺小葉を構成し、この乳腺小葉はさらに多くの乳腺細胞の集合体からなっている。乳腺細胞のひとつひとつが乳合成・泌乳を行う最小単位である。この乳腺細胞の内壁には乳腺上皮細胞がドーム状に敷き詰められており、外壁の基底膜側表面には毛細血管が網目状に入り込んでいる [Yasugi et al., 1989]。乳腺毛細血管内皮細胞は薄い単層構造であり、乳腺上皮細胞の栄養や乳汁合成に必要な物質の交換を容易にしている [Prosser et al., 1996; Andres and Pjono, 2010]。さらに妊娠後期から泌乳初期にかけては、乳汁合成に必要な物質の輸送を効率化するため、毛細血管壁がより薄くなり、乳腺細胞と近接することがマウスにおいて報告されている [Matsumoto, 1992]。しかしながら、毛細血管内皮細胞の物質輸送は選択的であり、高分子物質の通過は制限されている [Bazzoni and Dejana, 2004]。さらに乳腺上皮細胞同士も密着結合によって強固に接着して血液乳関門を形成しており、血液成分や乳汁成分の相互の流出を制限している [Schneeberge and Lynch, 1992; Stelwagen et al., 1995]。したがって、乳汁中に赤血球が混入する場合には、血管内皮細胞および乳腺上皮細胞の両者に何らかの異常が生じていると推察される。この要因を明らかにすることが出来れば、これまで原因不明とされてきた生理的血乳症の病態を解明し、適切な治療法の開発にも寄与できると考えた。

近年、僅かではあるが、血乳症を発症した乳牛に対して新たな治療法を試みた論文が報告されている [Dhruba, 2020; Frail, 2018]。また、血乳症の発生に酸化ストレスが関与しているとの報告もある [Bani, 2020]。しかしながらこれらの報告で対象となった症例は分娩後日数が一定でなく、分娩後 2 週間以内に発生する生理的血乳症に関する報告は少ない。

そこで本研究の第 I 章では、血乳症の発生や治療状況を把握する目的で、電子カルテのデータを基に血乳症の発生および治療状況を解析した。さらに生理的血乳症の病態を把握する目的で、血乳症の発生する時期の調査および乳汁中に出現する体細胞の形態学的検査を実施した。第 II 章では、乳汁検査により血乳症と診断した乾乳期の乳牛に VK1 製剤を投与し、治療効果を評価した。また、乾乳後期に VK3 製剤を添加給与し、血乳症の予防効果を判定した。加えて分娩時の血液凝固時間（全血凝固時間）を測定し、血乳症と血液凝固能の関連を調査した。第 III 章では乳腺組織に傷害を与えている要因が酸化ストレスによるものと仮定して、牛の周産期である乾乳後期から分娩後約 1 か月までの乳牛を用いて血乳の発生状況と酸化ストレスの評価を行った。さらに乾乳期の乳牛に抗酸化物質を給与し、分娩後の酸化ストレスおよび血乳症の発生に対する効果を検証した。

# 第 I 章 周産期のホルスタイン種乳牛における血乳症の発生状況

## 1-1. 序論

血乳症は乳腺局所の毛細血管が何らかの要因により破綻し、赤血球が乳汁中に漏出した状態である [Bradford, 2001]。乳房浮腫や乳房炎、および乳房の外傷は血乳症を引き起こす主要な要因と考えられている [Venkatesan, 2019]。そのため、血乳症は泌乳期間全般を通して発生し得る [Heidrich and Renk, 1967]。分娩後 2 週間以内にみられる血乳症は特別な治療をしなくとも 1 週間程度で自然治癒することから、生理的血乳症と認識されている [Venkatesan, 2019]。生理的血乳症の発生率についての報告は見あたらないが、宮城県内では分娩牛の 1~2 割程度に血乳が認められる農場が多く、稀に 5 割以上に血乳が認められる農場もある。血乳症に関して複数の報告があるが [Bani, 2016, 2020; Fraile, 2019]、分娩後 2 週間以内の生理的血乳症のみを対象とした調査報告は少ない。特に、生理的血乳症の病態や発生状況を調査した報告は無い。そこで、本章では周産期のホルスタイン種乳牛における生理的血乳症の発生状況を調査する目的で、以下の 3 つの実験を行った。

## 1-2. 材料と方法

### 1) 試験 1: 血乳症の発生および治療状況

本試験における血乳の定義は、肉眼的に赤味を帯びたも



の，または遠心分離によって赤色沈殿物を認めたものとした。

#### 供試牛と抽出方法

平成 20 年 4 月から平成 22 年 3 月までの 2 年間に宮城県農業共済組合（県南，中央および県北）家畜診療センターおよび家畜診療研修所において，初診時に『血乳症』と診断された 246 例のカルテを調査し，血乳の発生状況および治療状況を分析した。抽出方法は，電子カルテシステム（NOSAI 宮城版）から，第一病名および第二病名に血乳症を指定して自動的に抽出されたデータを用いた。

#### 調査項目

抽出されたカルテから，血乳症と産次数との関連，治療開始時期および併発疾患と治療状況について調査した。

#### 2) 試験 2: 血乳症の発生時期

本試験における血乳の定義は，肉眼的に赤味を帯びたもの，または遠心分離によって赤色沈殿物を認めたものとした。

#### 供試牛

供試牛は，管内の酪農家で飼養されている臨床的に健康な乾乳期のホルスタイン種乳牛 13 頭を用いた。繋養方法および飼養管理方法は以下の条件であった。

繋養方式： 尻合わせのタイストール形式  
飼料： 1日に2回，乾物として6～8 kg  
給水： 上水道水，自由摂取  
搾乳回数： 1日2回

## 実験方法

試験方法は，分娩予定7日前と分娩後2日以内に分房毎に乳汁を採取し，検査に供した。乳汁はスピッツ管（滅菌Fスピッツ白FB2100，栄研化学株式会社，東京）に採取し，試験まで氷水中で保管した。採取した当日中に遠心分離（3500 rpm × 5分）を行って，赤色沈殿物の有無を判定した（Fig. 2）。尚，乳汁採取時に目視および California Mastitis Test（CMT）変法により乳房炎または乳房の外傷が無いことを確認した。

## 統計処理

統計処理には EZR version 1.40（Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan）の Fischer の正確性検定を用いた。分娩前に血乳が発生している例において，分娩後にも血乳が認められる確率を統計学的に解析した。

### 3) 試験 3: 血乳症における乳汁中体細胞

本試験における血乳症の定義は，遠心分離によって赤色沈殿物が認められ，且つ肉眼的にも乳汁が赤みを帯びるものとした。肉眼的には異常が認められず，遠心分離によって赤血

球の沈殿が認められる症例は潜在性の血乳症とし，正常乳との差が不明瞭である可能性を踏まえて本試験からは除外した。

#### 供試牛

管内酪農家で飼養されているホルスタイン種乳牛 10 頭を用いた。いずれも分娩後に血乳症を発症した 5 頭を血乳群，分娩後に血乳が認められなかった 5 頭を対照群とした。尚，対照群は臨床的に健康なものとし，血乳群は血乳以外に併発疾患を認めないものとした。乳汁採取時に CMT 変法および目視により，乳房炎や乳房の外傷がないことを確認した。

#### 採材

サンプルは分娩後 1 日～3 日に乳汁 10 mL をスピッツ管（滅菌 F スピッツ白 FB2100，栄研化学株式会社）に採取した。輸送中は氷水中に保管し，採取した当日に塗抹標本を作製した。

#### サンプルの処理方法

1 分間遠心（1500 回転/分）分離処理後，沈査をスライドガラスに塗抹し，ギムザ染色を行い，顕微鏡学的検査を実施した [Lindmark et al., 2006; Shah et al., 2017]。観察倍率は 1000 倍で，約 30～50 視野において赤血球以外の約 300 個の細胞について出現割合を算出した。

## 統計処理

得られた結果は、平均値 ± 標準誤差で表記した。各細胞の出現率の比較には EZR version 1.40 の Mann-Whitney U-test で、危険率 5% 未満を有意と判定した。

### 1-3. 結果

#### 1) 試験 1: 血乳症の発生および治療状況

##### 血乳症の発生と治療産次数との関連

調査した 246 症例の産次数は、初産から第 9 産であった。246 例中、初産牛が最も多く、産次数が小さいほど発生件数が多かった。(Table 1)。

##### 治療開始時期

Table 2 に疾病別の治療開始時期を示した。血乳症に対する治療開始時期は分娩後 7 日以内に集中していたが、分娩前に治療開始した症例や分娩後 1 か月を過ぎてから治療が行われた症例もあった。血乳症のみの症例 (n = 94) における治療回数は (平均 ± 標準偏差) 3.3 ± 2.2 回で、主にトラネキサム酸製剤およびビタミン K1 製剤が投与されていた (Table 3)。併発疾病が認められた 152 例中、乳房炎が 63 例 (41%) と最も多く、血乳に対する治療回数は 8.0 ± 4.1 回で (Table 3)、分娩前から治療が開始されている症例もあった (Table 2)。

## 併発疾患と治療状況

乳房炎併発例のうち、細菌同定検査が実施されたのは19例（30.1%）で、その内訳は *Staphylococcus aureus* が6例、Coagulase negative staphylococci が3例、Streptococci および *Escherichia coli* がそれぞれ2例、*Pseudomonads aeruginosa* と *Arcanobacterium pyogenes* がそれぞれ1例、および培地に菌が確認されなかったものが4例であった。乳房炎罹患分房と血乳の分房の関係を調査したところ、乳房炎罹患分房を含む分房において血乳が認められた症例は36例（57.1%）、乳房炎非罹患分房のみに血乳が認められたものは6例（9.5%）であった。乳房炎併発例のうち57例（90.5%）に対してトラネキサム酸製剤またはビタミンK1製剤の投与が行われていた。このうち終診日までに血乳が完治したものは2例（3.5%）、完治しなかったものが44例（77.2%）、血乳の転帰不明が11例（19.3%）であった（Table 3）。その他、分娩日を中心に乳熱（40頭、26%）、ケトーシス（12頭、8%）、および第四胃変位（10頭、7%）が併発疾患として多く認められた。これらの症例の治療については、併発疾患に対するものが多く、トラネキサム酸製剤またはVK1製剤が併用された症例は53例（59.5%）であった。これらの薬剤併用例における投与回数は3.5 ± 2.6回であった。このうち終診日までに血乳が完治したものは2例（3.8%）、完治しなかったものは42例（79.2%）、血乳の転帰不明が9例（17.0%）であった（Table 3）。

## 2) 試験 2: 血乳症の発生時期

分娩予定 7 日前の乳汁の代表例を Fig. 2 に示した。正常な乳汁は淡黄白色を呈し、遠心分離後に赤血球の沈殿は認められなかった。一方、白色であっても遠心分離により赤色沈殿を認めるもの（潜在性血乳症）や、明らかな赤色を呈する乳汁（血乳症）も認められた（Fig. 2）。分娩前後における血乳（血乳症および潜在性血乳症）の判定結果を Table 4 に示した。分娩予定 7 日前の検査において 52 分房中 19 分房（36.5%）の乳汁に赤色沈殿物が認められ、血乳と判定された。このうち、分娩後の検査において血乳と判定された分房は 17 分房（89.5%）、赤色沈殿物を認めなかったものは 2 分房（10.5%）であった。一方、分娩予定 7 日前に血乳と判定されなかった 33 分房（63.5%）のうち、分娩後に血乳と判定されたのは 3 分房（9.1%）であった。Fischer の正確性検定により、分娩 7 日前に血乳と判定された分房は分娩後も血乳である確率が高かった（ $p < 0.01$ ）。

## 3) 試験 3: 血乳症における乳汁中体細胞

血乳の塗抹標本中には赤血球の他、ギムザ染色により紫色に染まる分葉核球やリンパ球等の白血球由来細胞、乳腺組織由来と思われる上皮細胞、複数の細胞の集塊、核や細胞質が変性・崩壊した細胞残屑が認められた（Fig. 3）。正常乳の塗抹標本と比較したところ同様な細胞が認められ、血乳に特異的な細胞は認められなかった。しかし血乳の塗

抹標本中には上皮細胞（血乳群：39.4 ± 5.1 vs. 対照群：14.8 ± 3.4,  $p < 0.01$ ）および細胞残屑（血乳群：24.7 ± 3.1 vs. 対照群：10.1 ± 3.6,  $p < 0.05$ ）の割合が有意に多く認められた（Fig. 4）。また，この調査で観察した血乳では，正常構造を保った赤血球が確認された。

#### 1-4. 考察

試験1において，血乳症は初産から9産目までのすべての産次で発生があり，産次数が少ない牛ほど発生が多かった。生理的血乳症は乳房浮腫に付随して発生しやすいと考えられており，また，初産牛では経産牛に比較して乳房浮腫が発生しやすいと考えられている [Bradford, 2001]。本試験において，産次数の少ない若い牛で血乳の発生件数が多かったことには，このような背景が関連しているのかもしれない。一方，血乳症を発症しても治療を依頼されない症例が存在することや，酪農場における乳牛の生産寿命が短くなっており，高産次牛が少ないことも要因のひとつと考えられる。これらのことから、生理的血乳症と産次数との関連は明らかではないが，全ての産次で発生する可能性があることが分かった。治療開始時期は分娩当日から分娩後2週間以内が最も多かったが，分娩前の発生も認められた。畜主が乳房および乳汁を意識的に見る機会は乾乳期に比べて泌乳開始後の方が圧倒的に多い。分娩後数日以内の血乳発見率が高いのはこのためであると考えられた。そこで試験2では分娩予定1週間前と分娩後1週間後に乳汁検査を行い，血乳の発生時期を調査

した。その結果，分娩後に確認された血乳症罹患分房の約 9 割は分娩予定 7 日前の時点で既に血乳または潜在性血乳であった。逆に，分娩前には血乳が認められず，分娩後に血乳を呈する症例も認められた。これら 2 つのタイプは発生機序が異なる可能性が考えられた。試験 1 において調査対象の 6 割に併発疾患が認められ，特に乳房炎併発が最も多かった。一方，乳房炎併発例であっても，乳房炎の罹患分房以外の分房が血乳である症例もあった。このことから乳房炎が必ずしも血乳を引き起こすとは限らず，血乳症にはその他の発生要因があると考えられた。また，乳房炎乳汁からの細菌分離結果において，特定の偏りは認められず，乳房炎起因菌と血乳症との関連は認められなかった。血乳の原因菌として大腸菌 [Venkatesan, 2017] が知られているが，その他の細菌が血乳症の重要な原因となったという報告は無い。Bani の報告においても血乳罹患分房から *Staphylococcus aureus* が分離されているが，血乳症の発症には関連が無いと考察している [Bani, 2016]。試験 3 において，血乳中には乳腺上皮細胞や細胞残屑が多く混入していたことから，血乳症発症牛では乳腺組織の血管破綻だけではなく，乳腺上皮にも何らかの傷害が発生している可能性が示唆された。



## 第 II 章 ホルスタイン種乳牛における周産期の生理的 血乳症における血液凝固能

### 2-1. 序論

第 I 章の調査により，血乳症には分娩前に発生している症例が多くあることが分かり，さらに何らかの要因による乳腺上皮の細胞傷害が発生している可能性が示唆された。しかしながら血乳症が発見されるのは分娩後であることが多く，発見時に止血凝固剤の投与を開始しても治癒率が低いことが明らかになった。

ビタミン K (VK) は脂溶性ビタミンの一つであり，血液凝固における重要な因子である [Dam and Schönheyder, 1936]。VK は植物由来の VK1 (Phylloquinone)，細菌由来の VK2 (Menaquinones : MK)，および化学合成による VK3 (Menadione) からなる。VK2 は側鎖の長さによって複数のサブファミリーを形成している。側鎖を形成するプレニル基の数に応じて MK-n のように表記される [Walther et al., 2013]。動物体内に最も高濃度に存在し，様々な生理活性を有するのは MK-4 と考えられている [Thijssen and Driittij-Reijnders, 1994]。動物がビタミン K 類を摂取した場合，体内で MK-4 に変換され機能を発揮する [Okano et al., 2008]。VK の機能は多岐にわたり，最近では，MK-4 が泌乳期乳牛において末梢血リンパ球の幼若化を促進することが報告された [Bai, 2019]。VK は反芻動物においては食物から摂取されるほか，腸内細菌やルーメン内細菌によって合成される。そ

のため、反芻動物において VK が欠乏することは稀であると  
考えられてきた。しかしながら近年、我々の調査によって周  
産期の乳牛において血清中 VK1 濃度および MK4 濃度が減少  
することが確認された（未発表）。第 I 章の調査結果より、  
周産期は血乳症の発生頻度が最も高かったが、これら VK の  
血中濃度の減少がその要因になっている可能性が考えられ  
た。妊娠後期において乳牛の体内の MK-4 を高めることが出  
来れば、血液凝固能を向上させ、血乳症を早期に治癒できる  
可能性、および血乳症の発症を予防できる可能性がある。

N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ（NAGase）は  
細胞のライソゾームに含まれる加水分解酵素であり、乳牛が  
乳房炎に罹患した際、好中球や乳腺上皮細胞が細菌を貪食し  
た際に NAGase が細菌を分解する効果を発揮することが知ら  
れている。ラクトフェリンも同じく抗菌活性を有する蛋白で  
あり、体細胞数に相関して増加することが報告されている  
（Ishii et al., 2006）。ラクトフェリンは抗菌活性の他に免疫  
調節作用も知られており、乾乳期の乳牛においては、直接ま  
たは間接的に形質細胞に作用し、免疫グロブリン G（IgG）  
の産生を促進する可能性が示唆されている（Komine et al.,  
2004）。Hovinen らは、NAGase 活性を乳房炎罹患牛で調査し  
たところ、潜在的乳房炎のマーカーとなりうることを示した  
[Hovinen et al., 2016]。また、Hagiwara らは乳汁中ラクト  
フェリン濃度が潜在性乳房炎罹患牛で高値を示すこと、およ  
び牛の年齢や乳房炎起因菌の種類によって影響を受けるこ  
とを報告した [Hagiwara et al., 2003]。しかし、これまでに

血乳症と上述した物質の関連についての報告は見あたらない。Baniらは血乳症罹患牛群が対照群と比較して、炎症誘発性サイトカインのひとつであるインターロイキン6（IL-6）が高値を示したと報告し、血乳症には何らかの免疫反応が関与していることを示唆している [Bani et al., 2020]。

そこで本章では、以下の2つの試験を実施した。血乳が認められた分娩前の乳牛に注射用VK1製剤を投与し、血乳症の早期治療効果を評価した。また、臨床的に健康な周産期の乳牛に対してVK3を飼料に添加給与し、分娩後3日目におけるVK1およびMK-4濃度、免疫関連物質として乳中IgG濃度、NAGase活性、ラクトフェリン濃度、血液凝固能の評価、および血乳症の発症予防効果を調査した。

## 2-2. 材料と方法

### 1) 試験1: VK1製剤投与による血乳症早期治療効果

本試験における血乳の定義は、遠心分離によって赤色の沈殿物を認めたものとした。

#### 供試牛

管内の3戸の酪農家で飼養されているホルスタイン種乳牛8頭を用いた。繋養方法および飼養管理方法は以下の条件であった。

繋養方式： タイストール形式

飼料： 1日に2回、乾物として6～8kg

給水： 上水道水、自由摂取

搾乳回数： 1日2回

試験牛は全て1分房以上の乳汁が血乳症と判定され、目視およびCMT変法により乳房炎の併発が疑われたもの、また食欲不振等の異常が認められたものは除外した。

### 実験方法

調査方法は、最終人工授精月日から予測された分娩予定日を基準として、分娩予定日の7日前に乳汁検査を実施した。分房毎に乳汁をスピッツ管(滅菌Fスピッツ白FB2100, 栄研化学株式会社)に採取し、遠心分離(3500rpm × 5分)にかけ、目視により赤血球の沈殿を認めた場合に血乳症と判定した。この方法により、分娩前に血乳症と判定された乳牛8頭を用いた。このうち試験群4頭には検査翌日から3日間、フィットナジオン(VK1注;日本全薬工業, 磐城; VK1として50mg/日/頭)を筋肉内投与した。残りの4頭は非投与対照とした。いずれも分娩後7日目に再度乳汁検査を実施し、赤血球の沈殿の有無を判定した。

### 2) 試験2: 周産期乳牛のVK3製剤の投与効果

本試験における血乳の定義は、遠心分離によって赤色の沈殿物を認めたものとした。

### 供試牛

宮城県内の4戸の農場で飼養されている臨床的に健康な周産期のホルスタイン・フリージアン種乳牛40頭を用い

た。繋養方法および飼養管理方法は以下の条件であった。

繋養方式： タイストール形式

飼料： 1日に2回，乾物として6～8 kg

給水： 上水道水，自由摂取

搾乳回数： 1日2回

40頭中，ランダムに選抜した21頭をVK3給与群とし，残りの19頭を対照群とした。各群のプロファイルはTable 5に示した。体重，産次およびbody condition score (BCS)に有意な差は無かった。

#### 実験方法

VK3給与群には，分娩予定の21日前から分娩後7日目まで，メナジオン亜硫酸水素ナトリウム（1%VK3含有，コーキン化学株式会社，大阪）を5g（VK3として50 mg/day/head）餌に振りかけるトップドレスで添加給与した [Bai et al, 2022]。残りの19頭は非給与の対照群とした。分娩後3日目に採血と採乳を行い，全血凝固時間，血漿中および乳汁中のVK1濃度，MK-4濃度，IgG濃度，ラクトフェリン，NAGase活性および血乳の有無を調査した。

#### 血液サンプルの採取

血液は頸静脈からヘパリン添加真空採血管（ベノジェクト II VP-H100K，テルモ株式会社，東京）および5 mLのプラスチック注射筒（テルモシリンジ SS-05SZ，テルモ株式会社）を用い採血を行った。血液採取後ヘパリン添加真空採血管は

アルミホイルで遮光した上，氷水中で保管し，2時間以内に遠心分離（3800 rpm × 10分）を行い，血漿を得た。得られた血漿はマイクロチューブ（遮光プラスチックマイクロチューブ T7100BK，アズワン，大阪）に分注して -80℃で冷凍保存した。プラスチック注射筒で採取した血液は全血凝固時間の測定に供した。

#### 乳汁サンプルの採取

採乳は朝の搾乳時に行った。乳汁は分房ごとにスピッツ管（滅菌 F スピッツ 白 FB2100，栄研化学株式会社）に採取した。採取後はアルミホイルで遮光し，氷水中で保管した。乳汁の一部はマイクロチューブ（遮光プラスチックマイクロチューブ T7100BK，アズワン）に分注して -80℃で冷凍保管した。残りの乳汁は肉眼所見と遠心分離（3500 rpm × 5分）により，血乳症の判定を行った。肉眼的に白い乳汁であっても，遠心分離後に赤血球の沈殿を認めた場合には血乳症と判定した。尚，採材時に CMT 変法および目視により，乳房炎や乳房の外傷が疑われたものは除外した。乳汁中の各項目の検査については，4分房の乳汁を合乳として測定した。

#### 全血凝固時間の測定

プラスチック注射筒で採取した血液は直ちに 10 × 75 mm のガラス管 3 本（PYREX99445-10，Corning，NY，USA）に 1 mL ずつ分注し，Lee-White 法 [Radstits, 1980] に則り全血

凝固時間を測定した。

### 化学分析方法

血漿および乳中の VK1 濃度および MK-4 濃度はサンプルから抽出したのち，蛍光高速液体クロマトグラフィー（Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA）を用いて既存の方法 [Sultana et al., 2018] により測定した。乳汁中 IgG 濃度およびラクトフェリン濃度はそれぞれ市販測定キット（IgG: Bovine IgG ELISA Quantitation Set, Lactoferrin: Bovine Lactoferrin Quantitation ELISA Kit, Bethyl Laboratories, Montgomery, USA）を用いて ELISA 法により測定した。乳汁中の NAGase 活性は Obara らの方法 [Obara, 1984] により測定した。

### 統計処理

得られた結果は，平均値±標準誤差で記載した。統計解析には JMP 15.2.1（SAS Institute Inc., Cary, NC, USA）を用いた。両群の血乳症発生率の比較には，Fisher の正確検定を用いた。血液および乳中の各検査項目および全血凝固時間の比較については予め等分散性を確認するため F 検定を実施したのち，分散が等しい場合には Student の t-検定，分散が異なる場合には Welch の t-検定を行った。いずれも  $P < 0.05$  を有意差ありとした。

## 2-3. 結果

### 1) VK1 製剤投与による血乳症早期治療効果

VK1 投与群および対照群ともに全頭が分娩後 7 日目の検査において血乳と判定された (Table 6)。

### 2) 周産期乳牛の VK3 製剤の投与効果

分娩予定日は最終人工授精月日から予測した。実際の分娩日との差は給与群で -7 から 11 日, 対照群で -13 から 11 日であった。そのため, 給与群における VK3 給与日数は  $28.9 \pm 1.39$  日であった。

#### 血乳発生率

血乳症発生頭数は VK3 給与群 21 頭中 7 頭 (33%) に対して対照群 19 頭中 11 頭 (58%) であり, VK3 給与群で発生頻度が低い傾向 ( $p = 0.10$ ) が認められた (Fig. 5)。

#### VK1 および MK-4

血漿 VK1 濃度および乳中 VK1 濃度は VK3 の添加による差は認められなかった (Fig. 6)。一方, 血漿 MK-4 濃度および乳中 MK-4 濃度は VK3 の添加により有意に高値を示した (Fig. 6)。次に、血乳発症牛と非発症牛で比較したところ, 血漿または乳中の VK1 濃度および MK-4 濃度の何れにも有意な差は認められなかった (Table 7)。



## 免疫関連物質

乳中 IgG 濃度は VK3 給与群で有意に高値を示した (Fig. 7)。乳中 NAGase 活性は VK3 給与群で高い傾向が認められた (Fig. 7)。乳中ラクトフェリン濃度については VK3 の添加による効果は認められなかった (Fig. 7)。

## 全血凝固時間

全血凝固時間は VK3 給与群で長くなる傾向が認められた (Fig. 8)。各試験群において、さらに正常乳群と血乳群に分けて血液凝固時間の比較を行ったところ、血乳症の発症の有無による差は認められなかった (Fig. 9)。

## 2-4. 考察

第 I 章の調査により分娩後に発見された生理的血乳症に対して VK1 製剤を投与しても治療効果は低いことが明らかになった。そこで本章の試験 1 では分娩前に血乳症を摘発し、早期に VK1 製剤を投与する方法を試みた。しかしながら従来法と同様、良好な治療効果は得られなかった。

試験 2 では、周産期に VK3 を給与することによって、分娩後 3 日目の MK-4 が対照群に比較して有意に高値を示した。一方で VK1 濃度には差が認められなかったことから、この VK3 給与群の高レベルの MK-4 は飼料中の VK1 に由来するものではなく、VK3 から代謝されたものであると考えられた。VK の代表的な作用として血液凝固作用が知られている [Dam and Schönheyder, 1936; Radstits, 1980]

が、VK3 給与群の方で全血凝固時間が延長する傾向が認められた。Lee-white 法における正常な全血凝固時間は、3 分から 12 分 [Radstits, 1980] とされており、全て正常範囲内であったことから、臨床的に重要な意味はないかもしれない。しかしながら、より慎重な検討が求められる。一方、血乳症発症群と非発症群間の比較では、VK3 給与群と対照群のいずれにおいても全血凝固時間には差が認められなかった。これらのことから、生理的血乳症の病態は VK 欠乏もしくは血液凝固能の異常によるものではないと考えられた。この結果は、分娩後の生理的血乳症において VK1 製剤やトラネキサム酸製剤などの止血剤による治癒率が著しく低いという結果を裏付けている。VK は VK 依存性タンパク質の  $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸残基 (Gla) の付加に介在して骨代謝、細胞成長調節作用など、多様な機能を発揮することが報告されている [Sheare, 1995; Vermeer, 2012; Simes et al., 2019]。また、泌乳牛においてリンパ球の幼若化作用を高め免疫賦活作用を有することが報告されている [Bai et al., 2020]。このことからさらに、未知の機能がある可能性も示唆されている [Vermeer, 2012]。今回、VK3 給与群では乳中 IgG 濃度が有意に高値を示し、NAGase 活性が高い傾向が認められ、乳腺組織において免疫機能が高まっていることが推察された。乳牛において、初乳中の IgG 含量は分娩直後が最も高く、その後 7~14 日かけて常乳のレベルにまで漸減することが報告されている [Hodate et al., 1978]。分娩後 3 日目の乳汁中の IgG 濃度は、分娩

直後の初乳中の IgG 濃度を反映していると考えられる。NAGase 活性は乳房炎罹患時の他，分娩直後には正常な乳房においても体細胞の増加に伴って著しく上昇することが報告されている [Chagunda et al., 2006]。今回，CMT 変法により乳房炎罹患牛は除外されていたことから，IgG 濃度および NAGase 活性の高値は乳房炎に起因するものでは無いと考えられた。ラクトフェリンは VK3 給与群と対照群で差が認められなかった。しかし小峰らの報告によると，乳汁中ラクトフェリン濃度は乾乳後 1 週間目にピークに達し，分娩 3 週間前から漸減する [Komine et al., 2004]。乳汁中 IgG 濃度が高値を示した経緯は不明だが，MK-4 およびラクトフェリンとの関係について，詳細に検討する余地がある。一方，本実験では VK3 給与により血乳症の発生が少なくなる傾向がみられた。血液凝固時間に差が認められなかったことから，これには血液凝固作用以外の要因，例えば免疫機能が関係している可能性が考えられた。免疫物質の増加と血乳症の因果関係は不明だが，今後更なる調査の余地がある。

妊娠後期の VK3 給与は動物体内の MK4 レベルを高めることが確認された。一方で，VK3 給与が分娩後の血液凝固能に及ぼす有意な影響は無かった。また，分娩前に摘発した血乳症例に対して VK1 を投与しても良好な効果は得られなかった。これらの結果から，血乳症の原因は VK 欠乏に起因する止血凝固異常ではないと考えられた。

## 第 III 章 ホルスタイン種乳牛の周産期の血乳症発現における酸化ストレスの関係

### 3-1. 序論

第 I 章の試験により，血乳中に上皮細胞や細胞残屑が有意に多く認められたことから，血乳症発症牛においては，乳腺局所の血管だけでなく，乳腺上皮にもなんらかの障害が発生している可能性が示唆された。さらに，血乳症の発生時期の調査において，生理的血乳症には分娩予定 7 日前までに発生しているものと，分娩予定 7 日前以降に発生するものがあることが明らかになった。一般に，分娩後の泌乳開始に伴い乳腺組織の血管内圧が上昇することが生理的血乳症の原因 [Heidrich and Renk, 1967] と考えられているが，分娩前に発生する血乳症においては発生機序が異なる可能性がある。また VK1 製剤やトラネキサム酸製剤を用いた治療では治癒率が著しく低かった。第 II 章では分娩前の乾乳牛に対して注射用 VK1 製剤の静脈内注射，および VK3 製剤の飼料添加給与を行った。分娩前の VK1 投与では血乳症の治療効果は認められなかった。一方，VK3 製剤投与により活性型 VK である MK-4 の体内濃度は有意に高値を示したが，血乳症の予防効果は認められなかった。また，全血凝固時間の比較において有意な効果は認められなかった。以上の結果から，生理的血乳症の病態は単純な血管あるいは乳腺組織破綻性出血あるいは VK1 欠乏に起因する出血傾向ではないと考えられた。ヒトにおいて，周産期には酸化ストレスが亢進し，様々な疾

病の要因となることが報告されている [Gitto, 2002]。また，周産期の乳牛はストレスに暴露されやすく，免疫機能の低下により，感染症や代謝疾患を引き起こすと考えられている [Putman et al., 2018; Sordillo and Raphael, 2013; Zobel, 2015]。加えて最近，外傷や乳房炎を伴わない血乳症の発生に酸化ストレスが関連している可能性が報告された [Bani, 2020]。しかしながら Bani の報告においては分娩から血乳症発症までの経過日数が  $177 \pm 145$ （平均±標準偏差）とバラツキが大きかった。そこで，本章では分娩直後から分娩後 5 日以内に発見された生理的血乳症を対象を絞り，酸化ストレスと血乳症との関連を調査した。さらに，乾乳期の乳牛に抗酸化物質として知られているトレハロースを添加給与し [Aoki et al., 2010; 2013]、分娩後の酸化ストレスに及ぼす効果および生理的血乳症の予防効果を検討した。

### 3-2. 材料と方法

#### 1) 試験 1：分娩後 5 日目における酸化ストレスの比較

本試験における血乳の定義は，遠心分離によって赤色の沈殿物を認め，且つ肉眼的に赤みを帯びているものとした。さらに Fraile らの報告を基に，血乳を以下に示す 3 段階に分類した [Fraile et al., 2019]。

- 軽度　　： 乳汁が薄いピンク色を呈し，遠心分離により  
          赤血球がスポット状に沈殿
- 中等度　： 乳汁が濃いピンク色を呈し，遠心分離により  
          赤血球が薄い層状に沈殿

重度 : 乳汁が赤色を呈し, 遠心分離により赤血球が厚い層状に沈殿

#### 供試牛

管内酪農家で飼養されているホルスタイン種系乳牛 22 頭を用いた。繋養方法および飼養管理方法は以下の条件であった。

繋養方式 : タイストール形式

飼料 : 1日2回, 乾物として 6~8 kg

給水 : 上水道水, 自由摂取

搾乳回数 : 1日2回

乳房および乳汁の視診, および CMT 変法により, 乳房炎や乳房浮腫が認められない症例とした。また乳熱, ケトージス, 脂肪肝および第四胃変位などの周産期疾病も併発していなかった。分娩後 5 日以内に少なくとも 1 分房以上の乳汁に血乳が認められた 11 頭を血乳群とし, 同じく分娩後 5 日以内にすべての分房で異常が認められなかった 11 頭を対照群とした。両群間の体重 (血乳群 :  $658 \pm 12.1$  kg vs. 対照群 :  $658 \pm 13.9$  kg), BCS (血乳群 :  $3.36 \pm 0.05$  vs. 対照群 :  $3.41 \pm 0.06$ ), および産次 (血乳群 :  $255 \pm 0.28$  回 vs. 対照群 :  $2.45 \pm 0.28$  回) には有意な差は無かった。

## 実験方法

サンプリングは分娩後5日以内に実施した。血乳群においては、分娩後5日以内且つ、初めて血乳が確認された日に実施した。本試験では、重度の血乳症と判定されたものを血乳群とした。これらの血液サンプルについて、酸化ストレスの指標であるマロンジアルデヒド（MDA）、抗酸化酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ（GPx）およびスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）の酵素活性を測定した。加えて、抗酸化力を有するビタミンである Vitamin A（VA）、Vitamin C（VC）、Vitamin E（VE）の血中濃度を測定した。これらの検査項目は妊娠後期から泌乳初期における乳牛の酸化ストレス状態を評価する指標として確立されたものである [Abuelo et al., 2015; Abuero et al., 2019; Celi, 2011; Senoh et al., 2019; Thuchiya et al., 2020]。

## 血液サンプルの採取

血液は頸静脈からヘパリン添加真空採血管（テルモ株式会社）および凝固促進剤添加プレーン真空採血管（テルモ株式会社）を用いて採取した。採取後は氷水中で保管し、2時間以内に遠心分離（3800 rpm × 10分）を行い、上清を得た。得られた血漿および血清は分注して-80℃で冷凍保存した。

### MDA 濃度測定

MDA の血漿中濃度は，測定キット（Malondialdehyde Assay Kit : Northwest Life Science Specialties LLC, Vancouver, WA, USA）を用いて，Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 法により測定した。サンプル中の MDA をチオバルビツール酸 (TBA) と反応させて MDA-TBA<sub>2</sub> 付加体を形成させ，分光光度計で 532 nm の吸光度を測定することで，MDA を検出した。

### Gpx 酵素活性測定

Gpx 酵素活性は，測定キット（Glutathione peroxidase assay kit: Northwest Life Science Specialties LLC）を用いて測定した。Gpx が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を H<sub>2</sub>O に還元する際，還元型グルタチオン (GSH) が酸化型グルタチオン (GSSG) に酸化される。GSSG はグルタチオン還元酵素 (GR) の作用により再び GSH に還元される。このとき 340 nm に吸収を持つ  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) が酸化され，NADP<sup>+</sup> に変換される。分光光度計により 340 nm の吸光度の低下を測定することで，Gpx の酵素活性を検出した。

### SOD 酵素活性の評価

SOD 酵素活性は，測定キット (Superoxide dismutase assay activity : Northwest Life Science Specialties LLC) を用い Martin 法 (Martin et al, 1987) で測定した。本法は，スー



パーオキシサイドの消去活性を測定するもので、Martinらによって開発された、ヘマトキシリン（HTH2）の自動酸化抑制反応を応用したものである。酵素の共存下で、HTH2は自動酸化されて560 nmの吸収を生じる。この自動酸化はSODによって抑制されることから、560 nmにおける吸光度の抑制率をもとに、サンプル中のSOD活性量を算出した。

#### VA, VC, VE の測定

血漿VC濃度の測定は、イオンペア逆相高速液体クロマトグラフィー法を用いた。血清VAおよびVE濃度の測定は、逆相高速液体クロマトグラフィー法を用いた。

#### 統計解析

得られた結果は、平均値±標準誤差で記載した。各検査項目の2群間における平均値の差の解析には、EZ R version 1.40のStudentのt-検定を用いた。P < 0.05を有意と判定した。

#### 2) 試験 2: 周産期における酸化ストレスの推移と血乳症との関連

本試験における血乳の定義は、遠心分離によって赤色の沈殿物を認め、且つ肉眼的に赤みを帯びているものとした。さらに、試験1と同様の方法で血乳を3段階に分類した。

## 供試牛

管内酪農家で飼養されているホルスタイン種系乳牛 12 頭を用いた。繋養方法および飼養管理方法は以下の条件であった。

繋養方式： タイストール形式

飼料： 1日に2回，乾物として6～8 kg

給水： 上水道水，自由摂取

搾乳回数： 1日2回

試験期間中に乳房炎，乳房浮腫，およびその他の周産期疾患等が疑われた症例は除外した。血乳の定義は試験1と同様である。本試験では分娩後5日以内に血乳症が認められた牛6頭を血乳群，残りの6頭を対照群とした。両群間の体重（血乳群：700 ± 7.30 vs. 対照群：708 ± 9.80），BCS（血乳群：3.50 ± 0.06 vs. 対照群：3.46 ± 0.08），および産次（血乳群：233 ± 0.33 vs. 対照群：1.83 ± 0.40）には有意な差は無かった。血乳群6頭のうち4頭には血乳発症後にトラネキサム酸（2.5g/頭，Meiji Seika Pharma，東京）またはフィトナジオン（0.1 g/頭，日本全薬工業，郡山）の静脈内注射による治療が1日1回，2～3日間実施された。残りの2頭は薬剤による治療は行われなかった。いずれの症例も，血乳の発生後2週間以内に治癒した。

## 実験方法

最終人工授精月日から予測された分娩予定月日を基準として，分娩予定4週間前，2週間前，分娩日，分娩2週

間後および4週間後の5回にわたり採血を行った。試験1と同様の項目について測定を実施し、二元配置分散分析の手法を用いて各項目の推移と群間比較を行った。

#### 統計処理

得られた結果は、平均値±標準誤差で記載した。各項目の推移と群間比較にはEZ R version 1.40の二元配置分散分析を用いた。P < 0.05を有意差ありとした。

### 3) 試験3: 周産期乳牛の酸化ストレスおよび生理的血乳症に対するトレハロースの給与効果

本試験における血乳の定義は、遠心分離によって赤色沈殿物を認め、且つ肉眼的に赤みを帯びているものとした。

#### 供試牛

管内酪農家で飼養されているホルスタイン種系乳牛11頭を用いた。繋養方法および飼養管理方法は以下の条件であった。

繋養方式： タイストール形式

飼料： 1日に2回、乾物として6~8 kg

給水： 上水道水、自由摂取

搾乳回数： 1日2回

本試験では抗酸化物質であるトレハロースを給与した牛6頭をトレハロース給与群、残り5頭を対照群とした。各区のプロファイルはTable 8に示した。両群間の体重（対照

群：707 ± 76.67 vs.トレハロース給与群：696 ± 7.30), BCS (対照群：3.15 ± 0.13 vs.トレハロース給与群：3.21 ± 0.14)には有意な差は無かった。トレハロース給与群には分娩予定7日前から分娩後21日までトレハロース (トレハ<sup>®</sup>, 株式会社林原) 50 gを1日1回, 朝の給餌時にトッピングで給与した。

### 実験方法

分娩予定28日前, 分娩当日, および分娩後28日に計3回採血を行い, 血液の酸化ストレス度 Diacron-reactive oxygen metabolites test (dROMsテスト) および抗酸化力 (OXY吸着テスト)の測定を実施した。また分娩当日には乳汁を採取し, 血乳の有無を判定した。

### 血液サンプルの採取

血液は頸静脈から凝固促進剤添加プレーン真空採血管 (テルモ株式会社)に採取した。採取後は氷水中に保管し, 2時間以内に遠心分離 (3800 rpm×10分) を行い, 上清を得た。得られた血清は分注して-80℃で冷凍保管した。

### 乳汁サンプルの採取

乳汁は分房ごとにスピッツ管 (栄研化学株式会社)に採取した。1分房以上に血乳が認められた場合に血乳症と判定した。

## 化学分析方法

酸化ストレス度と抗酸化力の測定はフリーラジカル測定装置 (FREEcarpe diem, 株式会社ウイスマー, 東京) により行った。酸化度測定には dROMs テストを用いた ((Fiore et al, 2019))。抗酸化力の測定は総抗酸化バリア測定 (OXY 吸着テスト) を用いた [Abuelo et al, 2013]。分娩予定 28 日前の測定値を 100% とした変化率を算出し, 統計解析を行った。

## 統計解析

得られた結果は, 平均値 ± 標準誤差で示した。各項目の推移と群間比較は EZR version 1.40 の二元配置分散分析を用いた。P < 0.05 を有意差ありとした。

### 3-3. 結果

#### 1) 分娩後 5 日目における酸化ストレスの比較

血漿中 MDA 濃度は血乳群が対照群に比較して有意に高値を示した (Fig. 10)。一方, GPx, SOD, および各種ビタミン (A, C, E) の値に関しては両群間で有意な差は認められなかった。MDA/VE 比は血乳群が有意に高値を示した (Fig. 11)。尚, 血乳群においては血乳以外に顕著な臨床所見は認められなかった。

#### 2) 周産期における酸化ストレスの推移と血乳症との関連

本試験における血乳症はいずれも中等度であった。分娩

予定 4 週間前から分娩日にかけて，血清 VE 濃度は血乳群（150-200  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ）が対照群（290 - 310  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ）に比較して有意に低いレベルで推移した（Fig. 12）。またこの期間において，血乳群は MDA/vitaminE 比が対照群に比較して有意に高い値で推移した（血乳群：3.21 - 3.88 vs. 対照群：1.88 - 1.95）（Fig. 13）。血乳群では GPx 活性の増加（分娩 4 週前），SOD の低下（分娩 2 週間目），VA の低下（分娩日）がそれぞれ一時的に認められた（Fig. 12）。MDA および VC については試験期間を通して対照群との有意な差は認められなかった（Fig. 12）。

### 3) 周産期乳牛の生理的血乳症に対するトレハロースの 給与効果

生理的血乳症発生率は対照群において 5 頭中 3 頭中（60%）であったのに対し，トレハロース給与群では 6 頭中 1 頭（16.7%）であった。分娩 28 日前の測定値を 100 とした場合の OXY 吸着能変化率（%）は，分娩当日および分娩後 28 日において，いずれもトレハロース給与群が有意に高値を示した（Fig. 14）。d-ROMS テストにおいて，分娩当日の酸化ストレス度はトレハロース給与群が対照群に比較して有意に低値を示した（Fig. 14）。

#### 3-4. 考察

重度の血乳症の症例を用いた試験 1 では，血乳症と最初に判定された日は分娩後 2.14  $\pm$  0.48 日であり，過去の報

告と一致した [Blood and Radostits, 1989; Heidrich and Renk, 1967]。発症日の血漿 MDA 値は血乳群が対照群に比較して有意に高かった。一方, 中等度の血乳症の症例を用いた試験 2 では血漿 MDA 値には有意な差が無く, 血中 VE 値が分娩 4 週間前から分娩時まで, 血乳群において連続的に低値で推移した。これらの結果を総合すると, 血乳症のグレードに差が認められたものの, 分娩前 (試験 2) と分娩後 (試験 1) では MDA 濃度と VE 濃度の結果に大きな差異があった。しかしながら MDA/VE 比を算出して比較したところ, 分娩前期間 (試験 2) と発症時 (試験 1) まで共通して血乳群が対照群よりも有意に高値を示した。最近では, 抗酸化力に対する酸化物質の相対比を算出することで, 乳牛の周産期における酸化ストレス状態をより正確に表すことが出来ると報告されている [Abuelo et al., 2015; Abuero et al., 2019; Bani et al., 2020]。これらのことから, 周産期における MDA/VE 比の増加は, 分娩後の血乳症発症に関わる主要な因子であると考えられた。VE は強力な抗酸化力を有するビタミンであり, 周産期の乳牛において必須の栄養素である [Bani et al., 2020; Politis, 2012; Weiss et al., 1997]。特に周産期の乳牛においては乳房炎や代謝性疾患に対する宿主防御能を維持するために必要とされる推奨血中濃度について様々な報告がある [Abuelo et al., 2015; Bouwstra et al., 2010; Politism, 2012; Weiss et al., 1997]。妊娠や分娩に伴いエネルギー需要量が増大すると, 様々な組織で酸素消費量が増加する [Goff and

Horst, 1997]。したがって周産期に抗酸化力が低下していると、分娩によって負荷がかかった際に酸化物質の産生が促進され、脂質過酸化が進むと考えられた。試験3では、抗酸化力が低下し酸化ストレスが増大する乾乳後期に酸化物質であるトレハロースを添加給与し、酸化ストレスの軽減効果および血乳症予防効果を調査した。トレハロースはグルコース2分子が $\alpha, \alpha-1,1$ 結合した非還元性の2糖類であり、乳牛に給与することで体内および乳中の抗酸化活性が向上することが報告されている [Aoki et al., 2010; Aoki et al., 2013]。本試験において、トレハロース給与群では抗酸化力が対照群に比較して高い値で推移し、血乳発生頭数は少なかった。本調査では試験頭数が少ないため、これらの効果についてはさらに例数を重ねて検討する余地があるが、酸化物質給与により酸化ストレスを軽減し、血乳症を予防する可能性が示唆された。



## 総括

血乳症は乳汁中に赤血球が混入した状態である。このような乳汁は異物が混入した異常乳とみなされるため、ヒトの食用には適さず、廃棄処分を与儀無くされる。一方、乳房炎や打撲などの外傷を伴う症例を除いて、血乳症が発症牛の生命に重大な影響を与えることは無いため、血乳症に関する研究は実施されてこなかった。近年、1頭の乳牛の平均年間産乳量および1日の泌乳量は増加傾向にあり、乳汁廃棄が酪農家に与える経済損失は甚大である。しかしながら、生理的血乳症に関する調査報告は少なく、病態や発生状況については不明な点が多い。効果的な治療法および予防法を確立するためには、血乳症の病態を把握することが不可欠である。そこで、本研究では、ホルスタイン種乳牛における血乳症の発生状況を調査するとともに、周産期に発生する生理的血乳症と血液凝固系、および酸化ストレスとの関連を調査することとした。

第I章ではNOSAI宮城の電子カルテを用いて血乳症の発生状況および治療状況を調査し、生理的血乳症の発生時期を調査した。さらに乳汁塗抹標本の観察を行い、体細胞の種類と比率について正常乳と比較を行った。その結果、血乳症の発生は全泌乳期間の中で分娩後2週間以内が最も頻度が高く、乳房炎や外傷を伴わない生理的血乳症が最も多いことが明らかになった。この生理的血乳症は分娩前に発生するものと、分娩後に発生するものがあり、前者の

割合が 89.5% と多かった。血乳中には上皮系細胞や細胞残屑が多く混入していたことから、血乳症発症牛では乳腺組織の血管破綻だけではなく、乳腺上皮にも何らかの傷害が発生している可能性が示唆された。

第 II 章では分娩前に着目し、周産期の乳牛に VK1 または VK3 製剤を投与して血乳症の早期治療効果および発症予防効果を検討した。分娩前に摘発した血乳症発症牛に VK1 を投与した結果、分娩後にも血乳が認められ、治療効果は確認できなかった。VK3 の飼料添加給与は動物体内の MK-4 レベルを有意に増加させたが、全血凝固時間および血乳発症予防については有意な効果は見られなかった。また、血乳発症群と非発症群に分類して比較したところ、VK1 および MK-4 のいずれにも差は認められなかった。これらの結果から、乳牛の周産期に発生する生理的血乳症の原因は VK の不足に起因する止血凝固異常ではないことが確認された。これは第 I 章の調査において VK1 製剤やトラネキサム酸製剤を用いた治癒効果が著しく低かったという結果を裏付けるものである。また、これらの薬剤が有効でないことから、生理的血乳症の出血機転は血管壁の損傷による破綻性出血とは異なる可能性があり、止血剤による治療には検討の余地があると考えられた。一方、VK3 給与群では血乳症の発生率が低い傾向が認められた。VK3 給与群において乳汁中 IgG 濃度が有意に高く、また NAGase 活性が高い傾向が認められたことから、血乳症の発生に何らかの免疫学的機序が関

連している可能性が考えられた。しかしながら本調査では因果究明までは至らず，VK3の血乳症予防効果およびその機序については更なる調査が必要と考えられた。

第Ⅲ章では周産期に発生する生理的血乳症と酸化ストレスとの関連を調査した。分娩後5日以内の血乳発症牛と同じ時期の血乳非発症牛の酸化ストレス関連項目を調査したところ，酸化障害の指標であるMDAの血漿中濃度は血乳群において有意に高かった。一方，分娩前の血漿MDA値には有意差が無く，血中VE値が分娩4週間前から分娩時まで，血乳群において連続的に低値で推移した。そこでMDA/VE比を算出して比較したところ，分娩前と分娩後発症時の両方において共通して血乳群が対照群よりも高値を示した。周産期におけるMDA/VE比の増加は，分娩後の血乳症発症に関わる主要な因子であると考えられた。VEは強力な抗酸化物質であり，周産期の乳牛においてその重要性が報告されている [Bani et al., 2020; Politis, 2012; Weiss et al., 1997]。周産期には胎子の成長や分娩，泌乳開始に伴いエネルギー需要量が増大し，様々な組織で酸素消費量が増加する [Goff and Horst, 1997]。したがってこの時期に抗酸化力が低下していると，分娩によって負荷がかかった際に酸化物質の産生が促進され，脂質過酸化が進むと考えられる。過酸化脂質を含む活性酸素は細胞傷害性が高く [Zwart et al., 1999]，酸化ストレスの亢進によって乳腺組織に傷害をもたらす可能性がある。第Ⅰ章において血乳塗抹標本には上皮細胞および細胞残屑の割合

が多く、細胞傷害が発生している可能性が示唆されたが、これには酸化ストレスの亢進が関連しているかもしれない。第Ⅲ章の試験3では、乾乳後期に抗酸化物質を給与した牛群において抗酸化力が高値を示し、さらに血乳症の発生が少ないという結果が得られた。

以上、第Ⅰ章から第Ⅲ章までに行った調査により、周産期に発生する血乳症の病態および発生要因の一部が明らかになった。これまで分娩後に発見されることがほとんどであった生理的血乳症の多くは分娩前から発生しており、その発生には周産期の抗酸化力の低下、および酸化ストレスの亢進が関連している可能性が示唆された。また生理的血乳症において止血凝固能の異常はないことが明らかになった。これまで血乳症の治療としてVK1製剤やトラネキサム酸製剤といった止血凝固剤が一般的に用いられてきたが、外傷が原因ではない場合、これらの薬剤は有効ではないと考えられた。

本研究では、最も発生頻度の高い周産期の生理的血乳症に焦点を絞り、知見をまとめた。生理的血乳症の病態および発生要因にはまだ不明な点が多く、様々な視点からの研究の余地がある。しかしながら、本研究により新たな治療法および予防法の開発に繋がる結果が得られた。この成果は、多くの酪農家において血乳症による経済的損失を軽減し、生産性の向上および経営の安定化に貢献し得るものと考えられた。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり，研究の機会を与えて頂いた岩手大学共同獣医学科 佐藤 繁名誉教授に深謝致します。同一條 俊浩准教授には研究の遂行と論文執筆にあたり，終始懇切なご指導と励ましを頂きました。心より御礼申し上げます。

本論文作成にあたり御助言，御校閲を頂きました，岩手大学農学部共同獣医学科 佐藤 洋教授，高橋 透教授，木崎 景一郎教授，東京農工大学 渋谷 淳教授，田中 知己教授に深謝致します。論文執筆にあたり多大なるご指導を賜りました，前岩手大学教授 古濱 和久博士に心より感謝申し上げます。また，VK3のご提供とVKおよびMK-4の濃度測定にご協力頂きました，明治飼糧株式会社 大谷 喜永さん，東北大学大学院農学研究科 白川 仁教授，駒井 三千夫教授，渡邊 きみか先生，統計解析に関してご助言・ご指導を頂きました，明治飼糧株式会社 寺田 文典先生に厚く御礼申し上げます。さらに，血乳の研究に賛同し，終始親身にご助言・ご鞭撻を頂きました，小原 嘉昭先生に深く感謝致します。そして，大学院の通学に多大なるご協力を賜りました宮城県農業共済組合本所の皆様，研究計画から細部に至るまで懇切にご指導頂きました，家畜診療研修所所長 松田 敬一博士，血液検査全般にご協力頂きました佐藤 真由美さん，日々多忙を極める中，採材にご協力を頂きました，NOSAI宮城県北診療センターおよび各診療センターの皆様に心より御礼申し上げます。研

究に際し，貴重なサンプルを提供して頂いた，五十嵐 忠孝氏をはじめとする宮城県内の畜産農家の皆様に厚く御礼申し上げます。研究に限らず，大学院での学生生活をより充実させて頂きました岩手大学農学部共同獣医学科産業動物内科学研究室の皆様に深い感謝の意を表します。最後に，長きに渡り研究生活を支えてくれた家族に心から感謝の意を表します。

## 引用文献

Abuelo A, Hernández J, Benedito JL, Castillo C. (2013). Oxidative stress index (OSi) as a new tool to assess redox status in dairy cattle during the transition period. *Animal* 7(8): 1374-1378.

Abuelo A, Hernández J, Benedito JL and Castillo C. (2015). The importance of the oxidative status of dairy cattle in the periparturient period: revisiting antioxidant supplementation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 99: 1003-1016.

Abuelo A, Hernández J, Benedito JL and Castillo C. (2019). Redox biology in transition periods of dairy cattle: role in the health of periparturient and neonatal animals. *Antioxidants* 8: 20.

Andres AC and Djono V. (2010). The mammary gland vasculature revisited. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 15: 319-328.

Aoki N, Furukawa S, Sato K, Kurokawa Y, Kanda S, Takahashi Y, Mitsuzumi H, Itabashi H. (2010). Supplementation of the diet of dairy cows with trehalose results in milk with low lipid peroxide and high antioxidant

content. *J. Dairy Sci.* 93: 4189-4195.

Aoki N, Sato K, Kanda S, Mukai K, Obara Y, Itabashi H. (2013). Time course of changes in antioxidant activity of milk from dairy cows fed a trehalose-supplemented diet. *Anim. Sci. J.* 84(1): 42-47.

Ayaz M. (1999). Haemogalactia in goats and buffalo. *Pak. Vet. J.* 19: 161-162.

Bai H, Hiura H, Obara Y, Kawahara K and Takahashi M. (2020). Short communication: Menaquinone-4 (vitamin K2) induces proliferation responses in bovine peripheral blood mononuclear cells. *J. Dairy Sci.* 103: 7531-7534.

Bai H, Arai H, Ikuta K, Ishikawa S, Ohtani Y, Iwashita K and Obara Y. (2022). Effects of dietary vitamin K3 supplementation on vitamin K1 and K2 (menaquinone) dynamics in dairy cows. *Anim. Sci. J.* 93(1): e13680.

Bazzoni G and Dejana E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol. Rev.* 84: 869-901.

Bani IZ, Abutarbush SM, Al-Qudah K and Omoush F. (2020). Serum and milk concentrations of oxidant and anti-oxidant



markers in dairy cows affected with bloody milk. Pol. J. Vet. Sci. 23: 341-347.

Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N and Nardone A. (2005). Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. J. Dairy Sci. 88: 2017-2026.

Blood DC and Radostits OM. Blood in the Milk. 1989; pp. 551. In: Veterinary medicine, 7th ed. Bailliere Tindall, London, UK.

Bouwstra RJ, Nielen M, Stegeman JA, Dobbelaar P, Newbold JR, Jansen EHJM. and van Werven T. (2010). Vitamin E supplementation during the dry period in dairy cattle. Part I: Adverse effect on incidence of mastitis postpartum in a double-blind randomized field trial. J. Dairy Sci. 93: 5684-5695.

Bradford PS. Bloody milk. 2001; 1033-1034. In: Large animal internal medicine, 3rd ed. (Pamela LR, Ronald JE eds.) Mosby, UK.

Castillo C, Hernández J, Bravo A, López-Alonso M, Pereira V and Benedito JL. (2005). Oxidative status during late

pregnancy and early lactation in dairy cows. *Vet. J.* 169: 286-292.

Chagunda MGT, Larsen MB and K. L. Ingvarlsen. (2006). L-lactate dehydrogenase and N-acetyl- $\beta$ -d-glucosaminidase activities in bovine milk as indicators of non-specific mastitis. *J. Dairy Res.* 73: 431-440.

Castillo C, Hernández J, Valverde I, Pereira V, Sotillo J, López-Alonso M and Benedito JL. (2006). Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidants status (TAS) during lactation in dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 80: 133-139.

Celi P. (2011). Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 33: 233-240.

Dam H, Schönheyder F. (1936). The occurrence and chemical nature of vitamin K. *Biochem. J.* 30: 897-901.

Dhruba D, Nikitasha B, Champak D, Elone L, Kaushik PB, Ankita D, Dilip N, Chethan GE, Devajani D, Parimal R and Kalyan S. (2020). Diagnosis and clinical management of haemagalactia in a Holstein Friesian crossbred cow. *Pharma Innovations* 9(10): 195-197.

Fiore F, Spissu N, Sechi S, Cocco R. (2019). Evaluation of oxidative stress in dairy cows with left displacement of abomasum. *Animals* 9(11) : 966.

Fraile L, Arcas A, Jiménez LM, Mallo J and Armengol R. (2019). Treatment with metamsylate reduces haemolactia in lactating cows. *J. Dairy Res.* 86: 193-195.

George LW, Divers TJ, Ducharme N, Welcome FL. Diseases of the teats and udder. 2008; pp. 335. In: *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*, 2nd ed. (Divers TJ, Peek SF eds.) Elsevier, St. Louis, USA.

Gitto E, Reiter RJ, Karbownik M, Tan D, Gitto P, Barberi S and Barberi I. (2002). Causes of oxidative stress in the pre- and perinatal period. *Biol. Neonate* 81: 146-157.

Goff JP and Horst RL. (1997). Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80: 1260-1268.

Heidrich HJ and Renk W. (1967). *Diseases of the Mammary Glands of Domestic Animals*. W.B. Saunders, Co. Philadelphia, USA. pp:99-100.

Hagiwara S, Kawai K, Anri A and Nagahata H. (2003).  
Lactoferrin concentrations in milk from normal and  
subclinical mastitic cows. J. Vet. Med. Sci. 65(3): 319-323.

Hodate K, Johke T, Ohmori S, Irie T, Mori M and Ikeda T.  
Changes of the Concentration of the Milk Serum Proteins in  
Dairy Cows after Parturition. (1978). Jap. J. Zootech. Sci.  
49(8): 588-593.

Hovinen M, Simojoki H, Pösö R, Suolaniemi J, Kalmus P,  
Suojala L and Pyörälä S. (2016). N-acetyl- $\beta$ -D-  
glucosaminidase activity in cow milk as an indicator of  
mastitis. J. Dairy Res. 83(2): 219-227.

Johansson B, Persson WK, Jensen SK, Lindqvist H and  
Nadeau E. (2014). Status of vitamins E and A and  $\beta$ -carotene  
and health in organic dairy cows fed a diet without synthetic  
vitamins. J. Dairy Sci. 97: 1682-1692.

Kichen BJ, Kwee WS, Middleton G, Andrews J. (1984).  
Relationship between the level of N-acetyl- $\beta$ -D-  
glucosaminidase (NAGase) in bovine milk and the presence  
of mastitis pathogens. Dairy Res. 51: 11-16.

Kikuchi T, Ichijo T, Yoshida Y, Kohono M, Murayama I,

Takahashi C, Kimura Y and Satoh H. (2013). Bloody milk of the dairy cow: occurrence and somatic cell profiles in Miyagi Prefecture. *J. Large Anim. Clin.* 4: 154-159 (in Japanese).

Komine Y, Komine K, Kai K, Itagaki M, Uematsu M, Kifune A, Kobayashi J, Yamaguchi T, Kumagai K. (2004). Immunological Changes in Colostrogenesis in Bovine Mammary Gland During Dry Period and the Function of Lactoferrin (Lf). *Nihon Chikusan gakkaiho* 75(2): 205-212.

Lindmark-Mansson H, Brannin C, Alden G, Paulsson M. (2006). Relationship between somatic cell count, individual leucocyte populations and milk components in bovine udder quarter milk. *Int. Dairy J.* 16: 717-727.

Matsumoto M, Nishinakagawa H, Kurohmaru M, Hayashi Y and Otsuka J. (1992). Pregnancy and lactation affect the microvasculature of the mammary gland in mice. *J. Vet. Med. Sci.* 54: 937-943.

Martin JP, Dailey M and Sugarman E. (1987). Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 255(2): 329-336.

Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.(2022) The situation over livestock and dairy farming.  
[https://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/l\\_hosin/attach/pdf/index-58.pdf](https://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/l_hosin/attach/pdf/index-58.pdf)

Obara Y, Komatsu M. 1984. Relationship Between N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase Activity and Cell Count, Lactose, Chloride, or Lactoferrin in Cow Milk. J. Dairy Sci. 67(5): 1043-1046.

Okano T, Shimomura Y, Yamane M, Suhara Y, Kamao M, Sugiura M, Nakagawa K. (2008). Conversion of phylloquinon (Vitamin K1) into menaquinone-4 (Vitamin K2) in mice: two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice. J. Biol. Chem. 283: 11270-11279.

Politis, I. (2012). Reevaluation of vitamin E supplementation of dairy cows: bioavailability, animal health and milk quality. Animal 6: 1427-1434.

Prosser CG, Davis SR, Farr VC and Lacasse P. (1996). Regulation of blood flow in the mammary microvasculature. J. Dairy Sci. 79: 1184-1197.

Purohit GN. (2014). Mammary gland pathologies in the

parturient buffalo. *Asian Pacific J. Reprod.* 3: 322-336.

Putman AK, Brown JL, Gandy JC, Wisnieski L and Sordillo LM. (2018). Changes in biomarkers of nutrient metabolism, inflammation, and oxidative stress in dairy cows during the transition into the early dry period. *J. Dairy Sci.* 101: 9350-9359.

Radostits OM, Searcy GP and Mitchall KG. (1980). Moldy sweetclover poisoning in cattle. *Can. Vet. J.* 21: 155-158.

Richoux NLR, Boutinaud M, Martin P and Gagnaire V. (2014). Role of somatic cells on dairy processes and products: a review. *Dairy Sci. Technol.* 94: 517-53.

Schneeberge EE and Lynch RD. (1992). Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am. J. Physiol.* 262: 647-661.

Senoh T, Oikawa S, Nakada K, Tagami T and Iwasaki T. (2019). Increased serum malondialdehyde concentration in cows with subclinical ketosis. *J. Vet. Med. Sci.* 81: 817-820.

Shah A, Darzi M, Kamil S, Mir M, Maqbool R, Ali R, Kashani B, Wani H, Bashir A, Dar D and Qureshi S. (2017) Somatic

cell alteration in healthy and mastitic milk of sheep and goats. *J Entomol Zool Stud.* 5(6): 27-33.

Shearer MJ. (1995). Vitamin K. *Lancet* 345: 229-234.

Simes DC, Viegas CSB, Araújo N and Marreiros C. (2019). Vitamin K as a powerful micronutrient in aging and age-related diseases: Pros and cons from clinical studies. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 4150.

Sordillo LM and Raphael W. (2013). Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 29: 267-278.

Stelwagen K, Farr VC, Davis SR and Prosser CG. (1995). EGTA-induced disruption of epithelial cell tight junctions in the lactating caprine mammary gland. *Am. J. Physiol.* 269: 848-855.

Sultana H, Watanabe K, Rana MM, Takashima R, Ohashi A, Komai M, Shirakawa H. (2018). Effects of vitamin K<sub>2</sub> on the expression of genes involved in bile acid synthesis and glucose homeostasis in mice with humanized PXR. *Nutrients* 10: 982.



高桑一雄，及川岩見，湯浅勇男，北野功。(1966). 乳牛における血乳と乳房の損傷，浮腫，漏乳. 獣医畜産新報 12: 1329-1333.

Thijssen HH and Driittij-Reijnders MJ. (1994). Vitamin K distribution in rat tissues: dietary phylloquinone is a source of tissue menaquinone-4. Br. J. Nutr. 72: 415-425.

Tsuchiya Y, Kawahara N, Kim Y-H, Ichijo T and Sato S. (2020). Changes in oxidative stress parameters in healthy and diseased Holstein cows during the transition period in Yamagata Prefecture, Japan. J. Vet. Med. Sci. 82: 955-961.

Venkatesan M, Selvaraj P, Sivakumar M, Manickam R, Saravanan M, Veeraselvam M, Krishna Kumar S, Yogeshpriya S and Jayalakshmi K. (2017). Intramammary adrenaline in the management of hemolactia and coliform mastitis in a transition cow. J. Entomol. Zool. Stud. 5: 1882-1883.

Venkatesan M and Saravanan M. (2019). Haemolactia in transition cows: Mini review. Science Ocean. 2(3):25-27

Vermeer CV. (2012). Vitamin K: the effect on health beyond coagulation—an overview. Food Nutr. Res. 56: 5329.

Walther B, Karl JP, Booth SL and Boyaval P. (2013).

Menaquinones, bacteria, and the food supply: the relevance of dairy and fermented food products to vitamin K requirements. *Adv. Nutr.* 4: 463-473.

Weiss WP and Hogan JS. (2007). Effects of dietary vitamin C on neutrophil function and responses to intramammary infusion of lipopolysaccharide in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90: 731-739.

Weiss WP, Hogan JS, Todhunter DA and Smith KL. (1997). Effect of vitamin E supplementation in diets with a low concentration of selenium on mammary gland health of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80: 1728-1737.

Yasugi T, Kaido T and Uehara Y. (1989). Changes in density and architecture of microvessels of the rat mammary gland during pregnancy and lactation. *Arch. Histol. Cytol.* 52(2): 115-122.

Zobel G, Weary DM, Leslie KE and von Keyserlingk, MAG. (2015). Invited review: cessation of lactation: effects on animal welfare. *J. Dairy Sci.* 98: 8263-8277.

Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM and Vermeulen NPE. (1998). Biomarkers of free radical damage applications

in experimental animals and humans. Free Radic. Biol. Med.  
26: 202-226.

图 表



Fig. 1. Bloody milk secretion in a Holstein dairy cow after parturition.

A: Slight, B: Middle, C: Severe.

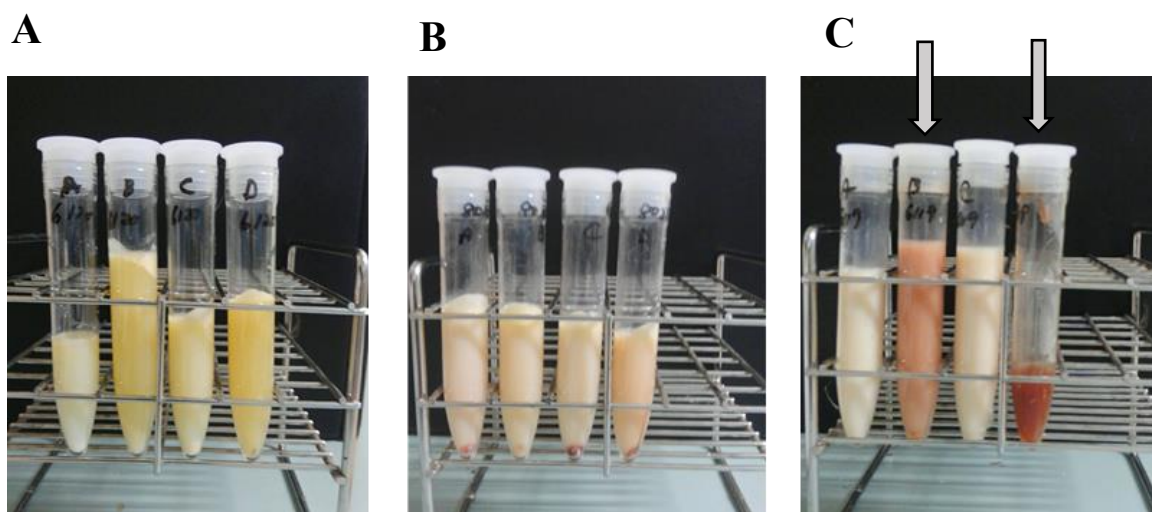


Fig. 2. Colostrum sampled from each four udders at 7 days prepartum.

A : Non-hemolactia, B:Whitish colostrum containing small amount of erythrocyte sediment after centrifugation, C (arrows): Reddish colostrum with middle amount of erythrocytes.

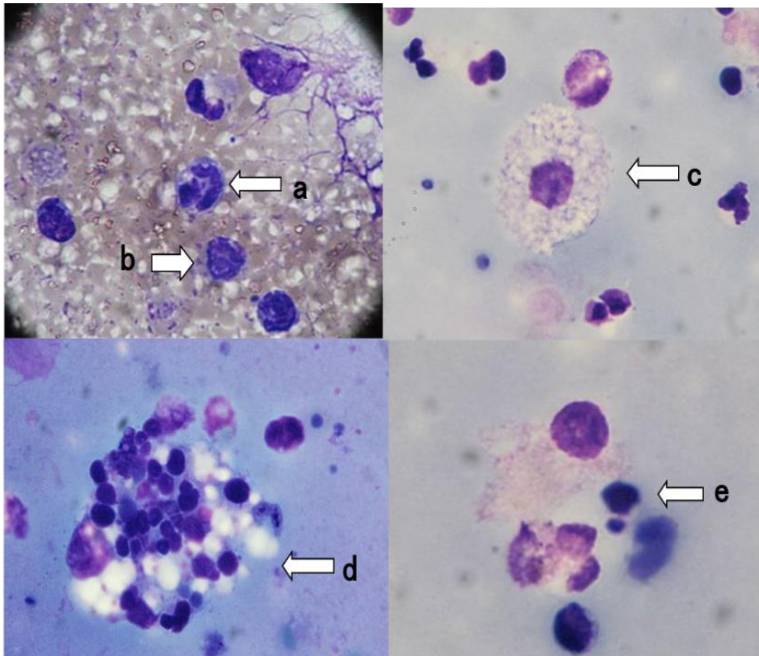


Fig. 3. Somatic cells in bloody milk.

a: Polymorphonuclear leukocyte, b: Lymphocyte,  
c: Epithelial cell, d: Cell agglomerate, e: Cell debris.  
(magnification X 1000).

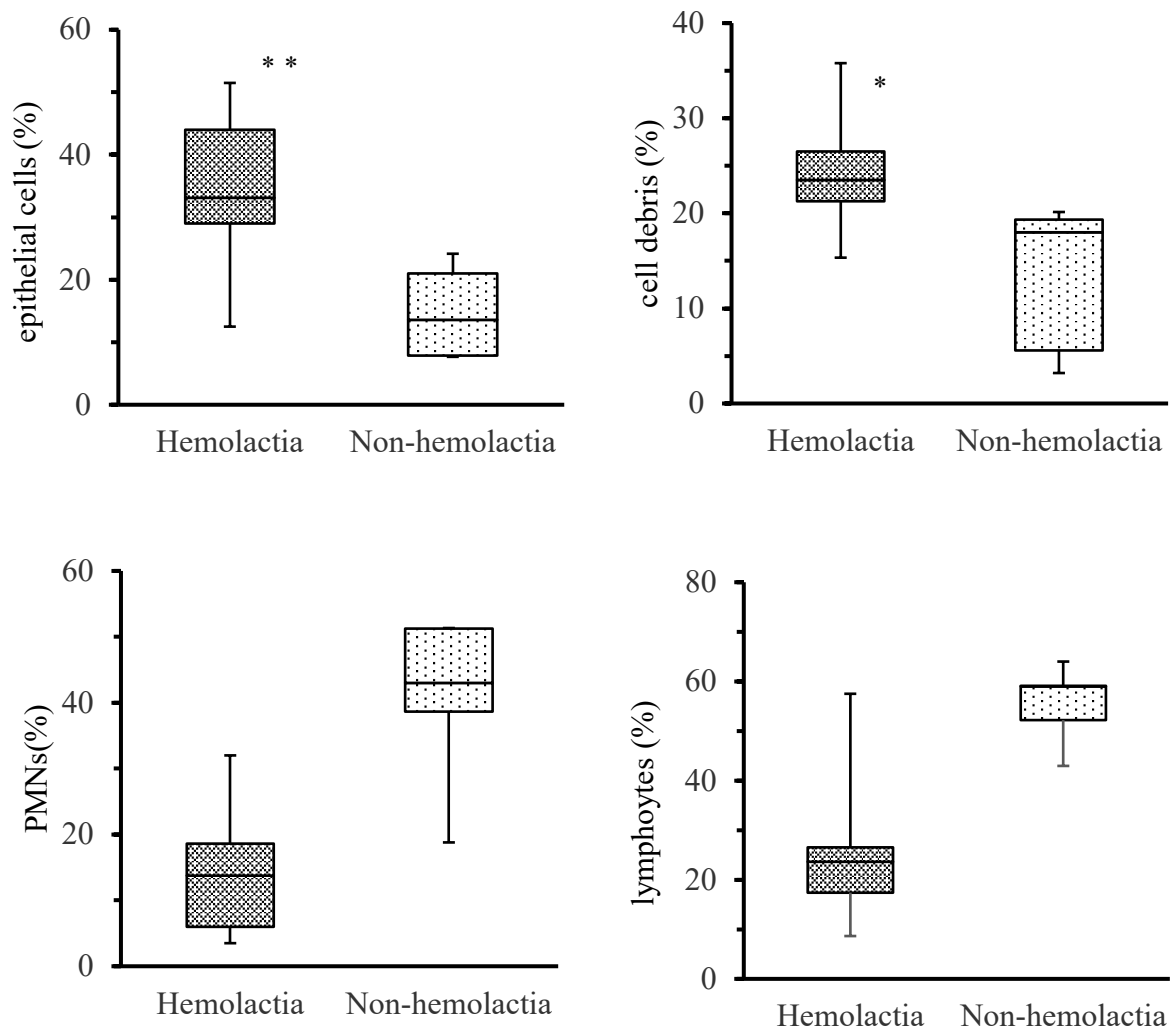


Fig. 4. Percentage of each cell type in hemolactia (n = 5) and Non-hemolactia (n = 5) secretion within 5 days after parturition.

PMNs: Polymorphonuclear leucocytes.

\*\* (p < 0.01), \* (p < 0.05) denote significant differences compared with non-hemolactia group.

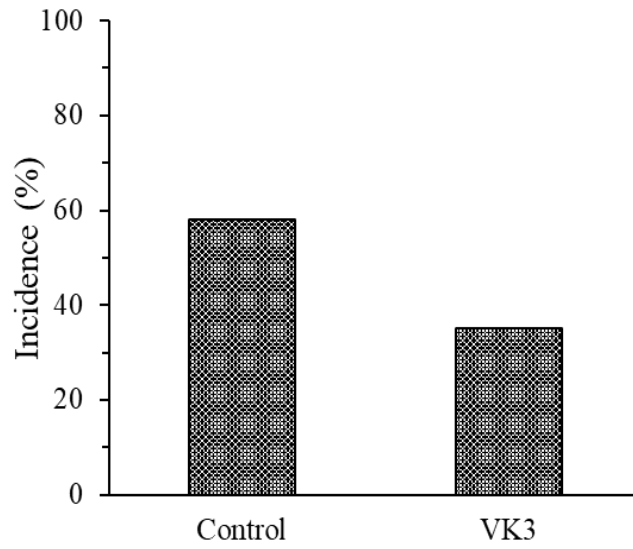


Fig. 5. Incidence of bloody milk in control group (n = 19) and VK3 supplemented group (n = 21) at 3 days postpartum.



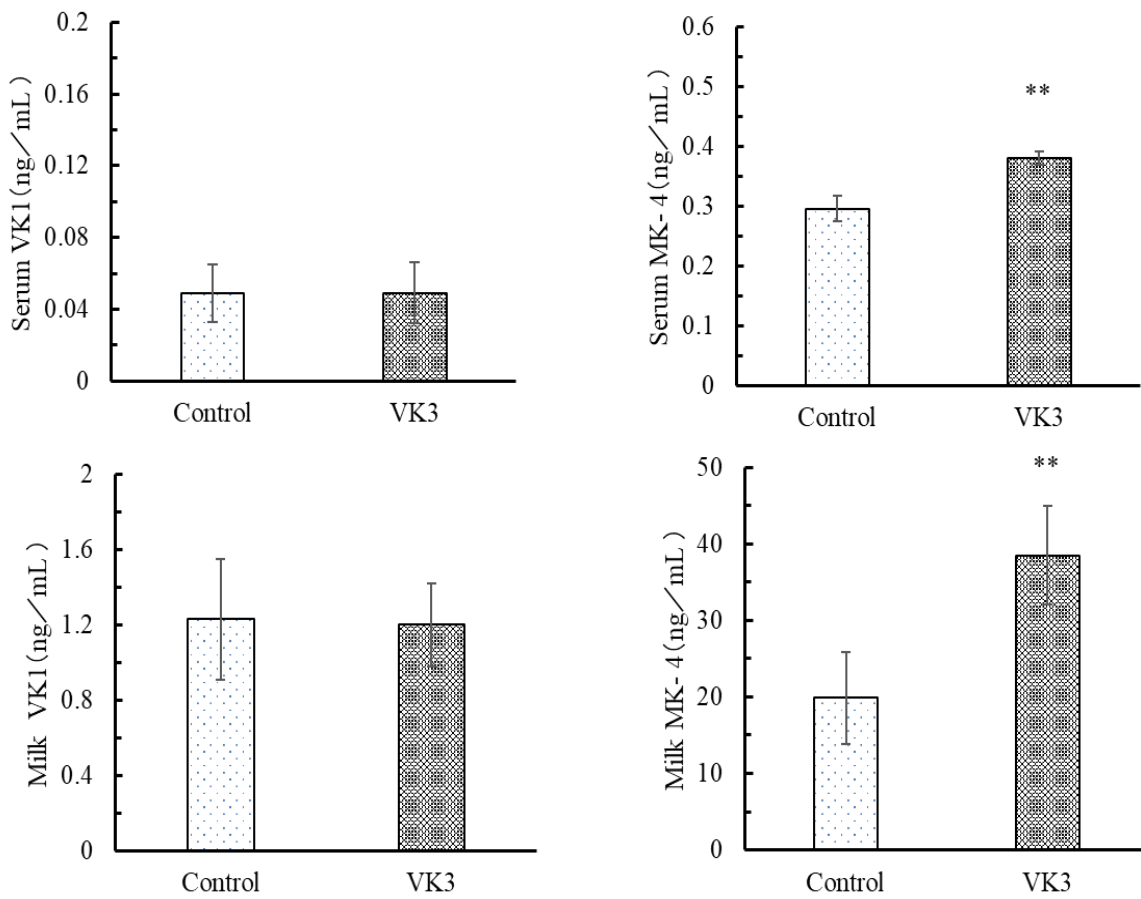


Fig. 6. Serum and milk vitamin K1 (VK1) and menaquinone 4 (MK-4) in control group (n = 19) and VK3 supplemented group (n=21) at 3 days postpartum. Control: control group, VK3: VK3 supplemented group. \*\* (P<0.01) denotes significant difference compared with control group.

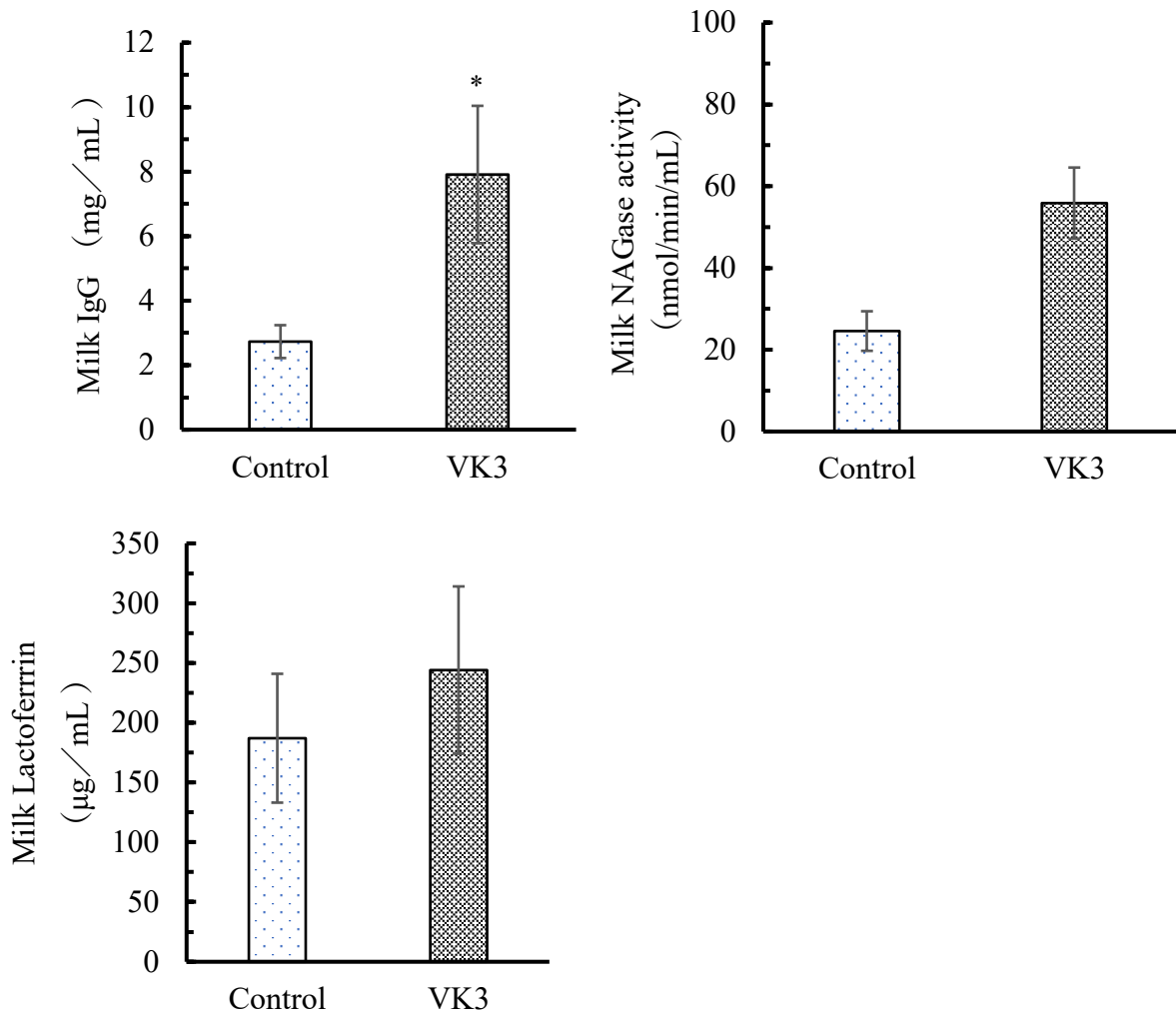


Fig. 7. Milk IgG and lactoferrin levels, and milk NAGase activity in control group (n = 19) and VK3 supplemented group (n = 21) at 3 days postpartum.

Control: control group, VK3: VK3 supplemented group, NAGase: N-acetyl-β-D-glucosaminidase, IgG: Immunoglobulin G.

\* (P<0.05) denotes significant difference compared with control group.

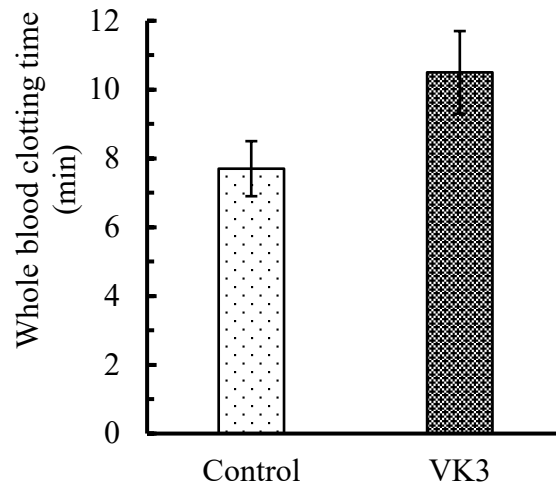


Fig. 8. Whole blood clotting time in control group (n = 19) and VK3 supplemented group (n = 21) at 3 days postpartum.

Control: Control group, VK3: VK3 supplemented group.

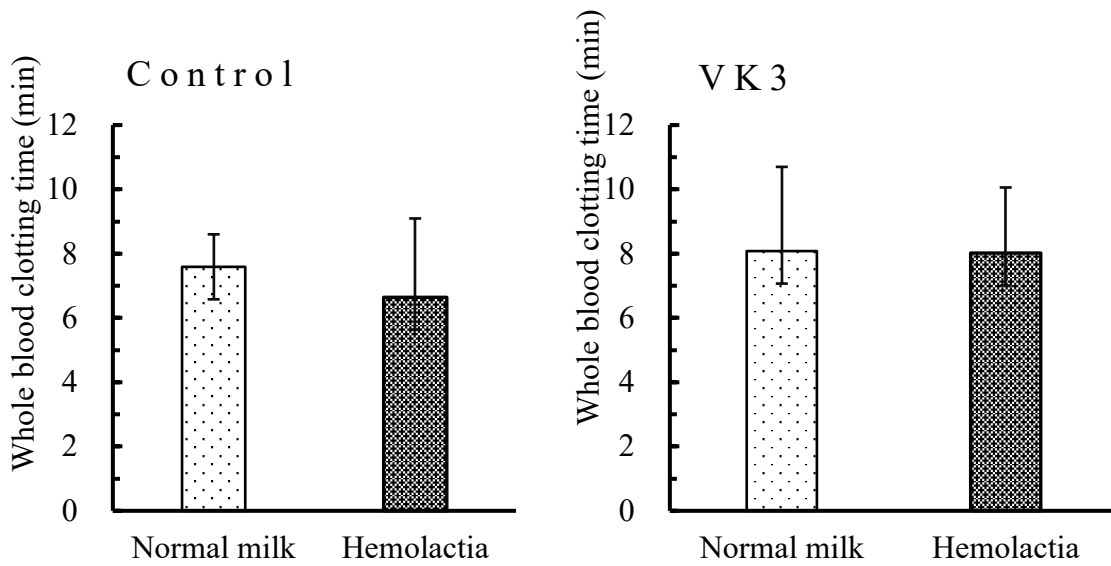


Fig. 9. Whole blood clotting time in control group (n = 19) and VK3 supplemented group (n = 21) at 3 days postpartum. Control: Control group, VK3: VK3 supplemented group. Normal milk: Cows with normal milk, Hemolactia: Cows with hemolactia.

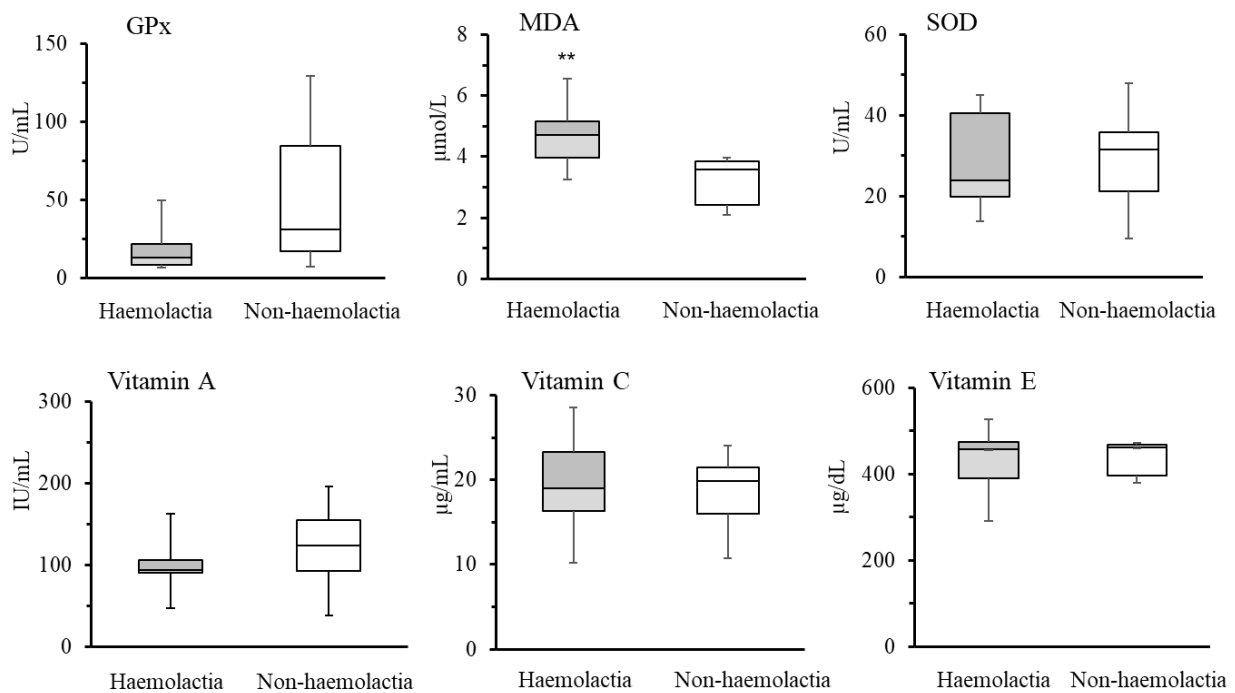


Fig. 10. Changes in plasma or serum indices of oxidative stress in dairy cows with hemolactia (gray closed column) or non-hemolactia (open column) after calving.

Upper and lower bars represent maximum and minimum values, respectively. The horizontal bar through the box including quartiles represents the median. Hemolactia in cows used was graded as severely tinged with blood. Plasma and serum indices were measured from the parturition day to 5 days postpartum when hemolactia was firstly identified in colostrum.

\*\* ( $P < 0.01$ ) denotes significant difference compared with non-hemolactia group ( $n = 11$ ). GPx: glutathione peroxidase; MDA: malondialdehyde; SOD: superoxide dismutase.

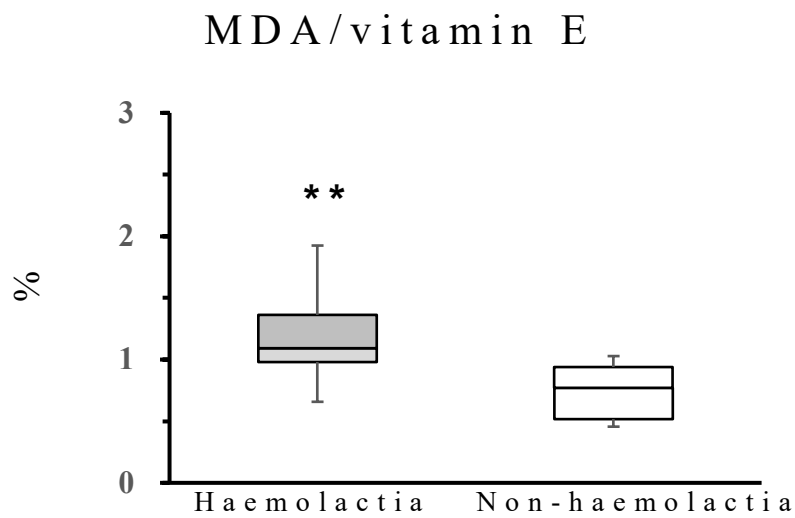


Fig. 11. Changes in MDA/vitamin E of dairy cows with haemolactia (closed box) or non-haemolactia (open box) after calving.

Upper and lower bars represent maximum and minimum concentrations, respectively. The horizontal bar through the box including quartiles represents the median.

\*\* ( $P < 0.01$ ) denotes significant difference compared with non-hemolactia group ( $n = 11$ ).

MDA: malondialdehyde; MDA/vitamin E: (plasma MDA concentration/serum vitamin E concentration)  $\times 100$ .

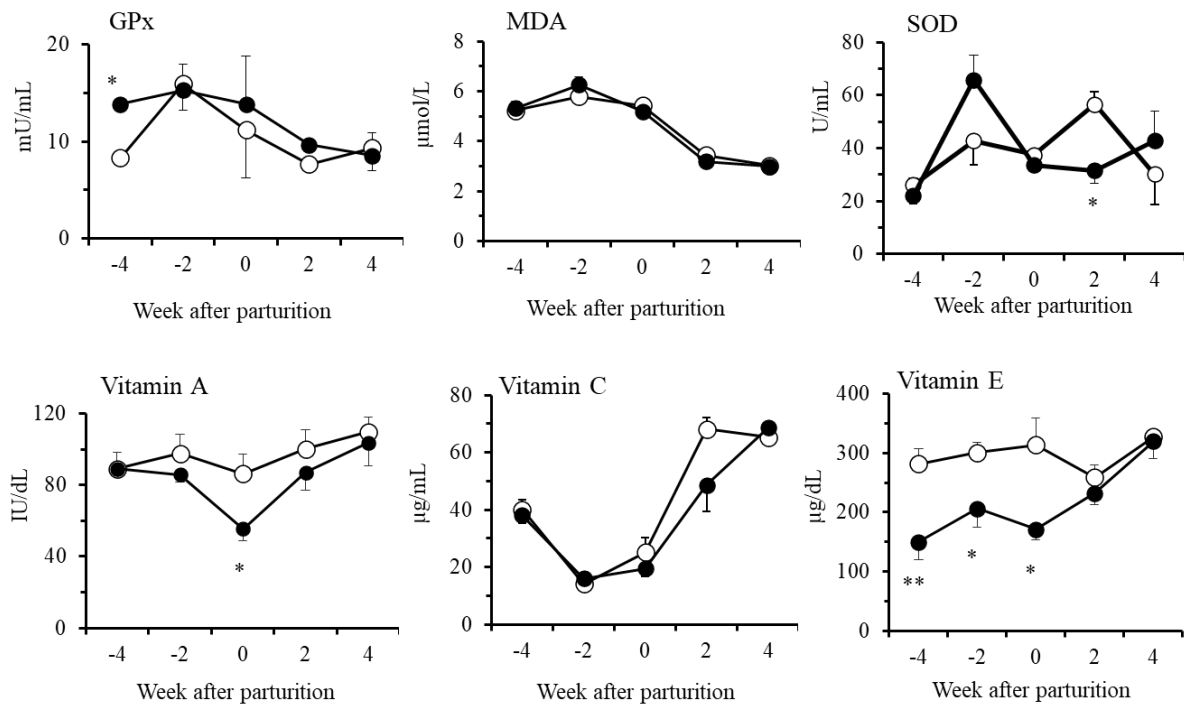


Fig. 12. Changes in plasma or serum indices of oxidative stress in dairy cows with hemolactia (closed circles) or non-hemolactia (open circles) during the peripartum period.

\*\* ( $P < 0.01$ ), \* ( $P < 0.05$ ) denotes significant difference compared with non-hemolactia group ( $n = 6$ ). GPx: glutathione peroxidase; MDA: malondialdehyde; SOD: superoxide dismutase. Hemolactia in cows used was graded as moderately tinged with blood.

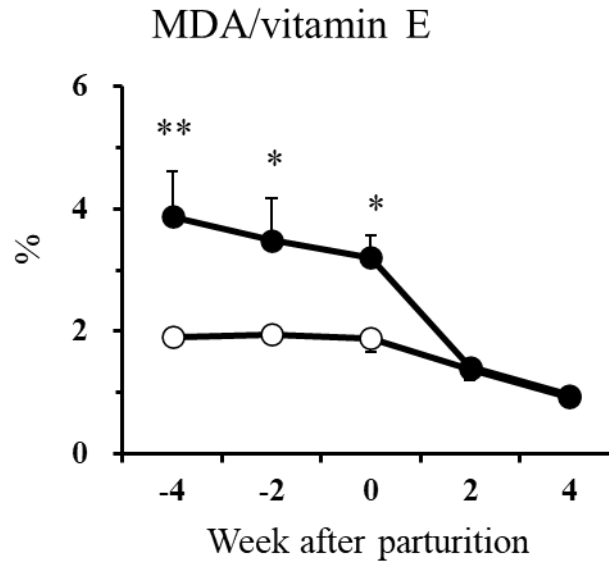


Fig. 13. Changes in MDA/vitamin E of dairy cows with haemolactia (closed circles) or non-haemolactia (open circles) during the peripartum period. The values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \*\* ( $P < 0.01$ ), \* ( $P < 0.05$ ) denotes significant difference compared with non-hemolactia group ( $n = 6$ ). MDA: malondialdehyde; MDA/vitamin E: (plasma MDA concentration/serum vitamin E concentration)  $\times 100$ .



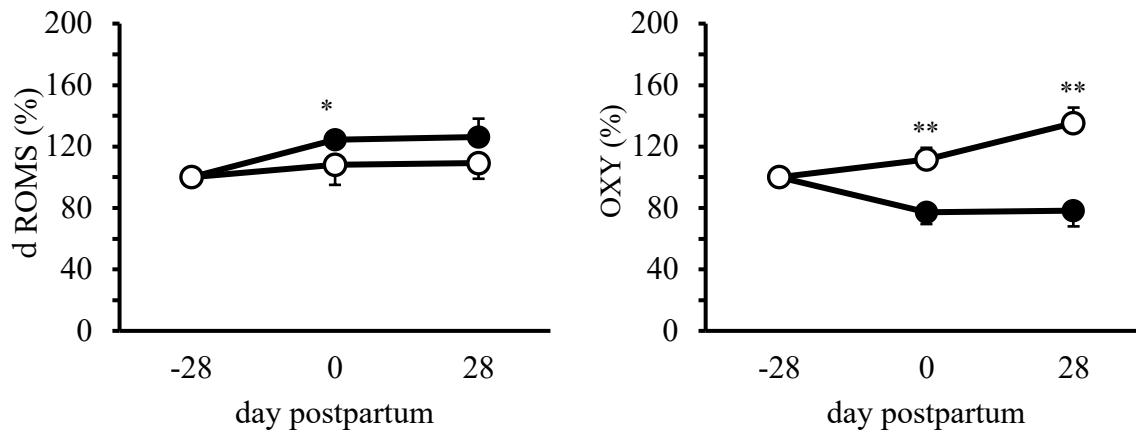


Fig. 14. Changes in serum indices of oxidative stress in dairy cows of control (closed circles) or Trehalose supplemented (open circles) groups during the peripartum period.

The values are expressed as the mean  $\pm$  SEM.

\*\* ( $P < 0.01$ ), \* ( $P < 0.05$ ) denotes significant differences compared with control group. OXY: OXY absorbent test, dROMs: Diacron-reactive oxygen metabolites. Data is shown by the increasing ratio compared to the measured value of the day -28.

Table 1. Number and percentages (%) of cows with hemolactia in each parity

<b>Parity (times)</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
1	70	28.5
2	40	16.3
3	36	14.6
4	36	14.6
5	32	13.0
6	17	6.9
7	10	4.1
8	3	1.2
9	2	0.8
Total	246	100.0

Table 2. Start of treatment and complication diseases of hemolactia

Start of treatment	Uncomplication	Complication Diseases									
		Mastitis	Peripartum diseases				Gastrointestinal diseases			Others <sup>c</sup>	
			Milk fever	Ketosis	Hypocalcemia <sup>*</sup>	Others <sup>a</sup>	DA <sup>**</sup>	AI <sup>***</sup>	Others <sup>b</sup>		
Prepartum	1	4	0	1	0	1	3	0	0	0	
Day of calving	4	8	25	1	2	1	0	1	1	0	
1-7 days postpartum	53	41	15	6	2	8	3	2	2	4	
8-14 days postpartum	12	3	0	1	0	1	3	0	0	0	
15-21 days postpartum	3	0	0	2	0	1	1	0	0	0	
22-28 days postpartum	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
>29 days postpartum	17	7	0	1	0	0	0	1	0	0	
合計	94	63	40	12	4	12	10	4	3	4	

a: Puerperal fever (n=3), Udder edema (n=2), Pregnancy toxemia (n=2), Downer syndrome (n=2), Fat liver (n=1), Retained placenta (n=1) and Dystocia (n=1).

b: Hepatitis (n=2) and Gastroenteritis (n=1).

c: Pneumonia (n=1), Dislocation (n=1), Phlegmone (n=1) and Teat injury (n=1).

\*: Diagnosed by low serum concentration of Ca without astasia, \*\*: Displacement of Abomasum, \*\*\*: Abomasal impaction.

Table 3. Times of treatment and healing rates of hemolactia with each complication

<b>Complication</b>	<b>n</b>	<b>Tims of treatment <sup>※2</sup></b>	<b>Healing rate (%)</b>
Uncomplication	94	3.3 ± 2.2	4.8
Mastitis	57	8.0 ± 4.1	3.5
Othes <sup>※1</sup>	53	3.5 ± 2.6	3.8

※ 1: Peripartum diseases, gastrointestinal diseases and others

※ 2: Treated with tranexamic acid or vitamin K1

Table 4. The number of udders determined as Hemolactia and non-Hemolactia at pre and post calving.

<b>Prepartum</b>			
	Hemolactia	non-Hemolactia	total
<b>Postpartum</b>			
Hemolactia	17	3	20
non-Hemolactia	2	30	32
total	19	33	52

Table 5. Parity, body weight (BW), body condition score (BCS) in the control and vitamin K3 (VK3) supplemented cow at 3 weeks prepartum.

Group	n	Parity	BW	BCS
Control	19	2.00 ± 0.25	650 ± 6.87	2.93 ± 0.08
VK3 supplemented <sup>1)</sup>	21	1.94 ± 0.31	640 ± 6.83	2.98 ± 0.04
p-value		NS	NS	NS

Values are means ± SEM.

<sup>1)</sup> VK3 was fed for 28.9 ± 1.4 days.

Table 6. Detection of red sediment after centrifugation at pre and postpartum in VK1 treated group (n=4) and Control group (n=4).

Cows	Group	parity	BCS	red sediment	
				Prepartum	Postpartum
a	VK1	1	3.25	+	+
b	VK1	3	3.25	+	+
c	VK1	4	3.50	+	+
d	VK1	1	3.25	+	+
e	Cont.	2	2.75	+	+
f	Cont.	2	3.00	+	+
g	Cont.	1	3.50	+	+
h	Cont.	4	3.25	+	+

VK1: VK1 treated group, Cont.: Control group,  
 +; existence of red sediment.

Table 7. Comparison of VK1 and MK-4 in serum and milk, and whole blood clotting time between normal milk group and hemolactia group.

	Control group		VK3 supplemented group		Significancy		
	Normal milk	Hemolactia	Normal milk	Hemolactia	VK3	Occurrence	Interaction
<b>n</b>	8	11	14	7			
<b>Serum</b>							
VK1 (ng/ml)	0.07 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.02	-	-	-
MK-4 (ng/ml)	0.29 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.38 ± 0.03	**	-	-
<b>Milk</b>							
VK1 (ng/ml)	1.07 ± 0.40	1.34 ± 0.34	0.79 ± 0.32	1.55 ± 0.43	-	-	-
MK-4 (ng/ml)	15.80 ± 9.33	22.86 ± 7.80	28.99 ± 7.44	48.05 ± 10.07	*	-	-
<b>Whole blood clotting time (min)</b>	9.1 ± 1.5	6.6 ± 1.3	9.3 ± 1.4	11.7 ± 1.8	+	-	-

Values are mean ± SEM



Table 8. Parity, body weight (BW), body condition score (BCS) in the control and Trehalose supplemented cow at 4 weeks prepartum, and peripartum diseases detected around parturition.

		Parity	BW	BCS	Peripartum Diseases
Control	No.1	1	680	3.25	Udder edema
	No.2	1	700	3.25	-
	No.3	1	720	3	Udder edema
	No.4	2	700	2.75	-
	No.5	3	750	3	-
	No.6	6	700	3.25	-
	No.7	4	720	2.5	-
	No.8	2	720	4	Hemolactia, Ketosis, Mas <sup>*</sup>
	No.9	1	680	3.5	Hemolactia, DA <sup>**</sup>
	No.10	3	700	3	Hemolactia, Hypocalcemia <sup>***</sup>
Trehalose	No.1	1	720	3	-
	No.2	1	680	3.75	-
	No.3	1	690	3.5	-
	No.4	1	690	3.75	-
	No.5	3	700	2.75	-
	No.6	4	710	2.75	-
	No.7	3	660	3.25	Milk fever, Mas
	No.8	3	720	3	Hemolactia, Mas

<sup>\*</sup>: Mastitis, <sup>\*\*</sup>: Displacement of Abomasum, <sup>\*\*\*</sup>: Diagnosed by low serum concentration of Ca without astasia.