

原著論文

## 低受胎を示す搾乳牛への人工授精 24 時間後 子宮内注入のための 3 種の薬液の効果の比較

村田友香莉<sup>1)</sup>、椎名博美<sup>2)</sup>、石毛太一郎<sup>1)</sup>、小島敏之<sup>1)</sup>

所属機関：<sup>1)</sup> 鯉淵学園農業栄養専門学校、<sup>2)</sup> 有限会社瑞穂農場鯉淵分場  
所在地：鯉淵学園農業栄養専門学校（〒 319-0323）茨城県水戸市鯉淵町 5965  
電話番号 029-259-2811、Fax 番号 029-259-6965  
有限会社瑞穂農場鯉淵分場（〒 319-0323）茨城県水戸市鯉淵町 5936-80  
電話番号 029-239-3100、Fax 番号 029-239-3101  
連絡担当者：氏名：小島敏之  
E-mail アドレス：k1887523@kadai.jp  
to-kojima@mail.koibuchi.ac.jp  
携帯電話番号 090-9546-1961

### 【要 約】

分娩後に低受胎を示すホルスタイン種搾乳牛 47 頭に対し、初回の人工授精実施 24 時間後に 3 種類の薬液（0.5% ポビドンヨード液、液状キトサン製品およびポビドンヨード液と液状キトサン製品を各 0.5%、5% 濃度で含む混合液；以下、混合液）のいずれか 50ml を両子宮角内に注入して、1 年間の試験期間内での受胎成績を調査し、子宮内薬液注入の効果を検証するとともに、3 種類の薬液の効果と比較した。試験期間中に、供試牛の 51.1% にあたる 24 頭が受胎した。そのうち、13 頭は子宮内薬液注入を行った周期（0 周期）で受胎し、残りの 11 頭はその翌周期（1 周期）以降 4 周期目までに人工授精または胚移植により受胎した。0 周期で受胎した割合は、3 種類の薬液間で差はみられなかった（順に 23.5%、35.3% および 23.1%）。1 周期以降 4 周期目までの受胎率では、0 周期で混合液が注入された試験群（50.0%）が、他の薬液を注入された 2 つの試験群（0.5% ポビドンヨード液；23.1%、液状キトサン製品；27.3%）よりも受胎率は高かったが、有意差はみられなかった。結論として、低受胎牛対策として人工授精実施 24 時間後の子宮内薬液注入が有効な手段であることが示された。また、低受胎牛に対し実施した人工授精後 24 時間目に子宮内に本試験で用いた 3 種の薬液のうちいずれかを注入した場合、その周期のみならず翌周期以降 4 周期目までは薬液注入による受胎促進効果が持続する可能性が示唆された。

**キーワード：**キトサン、搾乳牛、人工授精後の子宮内薬液注入、ポビドンヨード液、低受胎牛

### 【緒論】

酪農家や肉牛繁殖農家におけるリピートブリーダー（低受胎牛）の存在は、人工授精実施に関わる労力・経費の負担増、子牛生産の減少

に由来する個体販売数減少・後継牛不足および分娩間隔の延長に起因する生涯乳量の減少、過肥などをもたらし、経営安定化を図る上での障害のひとつに数えられる。

人工授精された泌乳牛の受胎率に影響する要因としては下記が挙げられる。まず、泌乳牛の平均受精成功率は 76.2%（55.3～87.8%）であるとの報告がある [11]。次いで、不受胎の 20

受付：2019年 8 月 8 日

受理：2019年 9 月 13 日

～45%が受精障害（卵胞発育阻害と粗悪な卵母細胞を産む内分泌環境、および精子の質に影響する要因）と早期胚死滅（早期黄体機能の障害および子宮内膜の機能障害）に、8～17.5%は後期胚死滅／胎子損耗（後期胚／胎子に直接悪影響を及ぼすか、胎盤機能を損なう感染因子／非感染因子）に、それぞれ起因すると報告されている [3]。その他に、不適期授精、排卵遅延、および子宮環境の不良による不受胎も起る。しかし、受精障害と早期胚死滅に関しては正確な診断を下した上での最適な処置選択は生産現場では困難な場合が多い。低受胎牛では、正常な発情周期を持ち明瞭な発情を示し、臨床的にも異常が認められないことが多いため、場当たりの対策がとられる傾向にあるのではないかと推測される。

近年、経産牛の低受胎の原因として、潜在性子宮内膜炎が関与しているという報告がある [10]。滲出性、潜在性にかかわらず子宮内膜炎罹患牛に対する処置は、子宮洗浄が診断にも治療にも有効だとされているが、準備や実施に時間がかかるなどの理由で臨床現場ではあまり実施されていない現状が報告されている（診断的子宫洗浄の実施率が 12.4%、子宮洗浄による治療の実施率が 22.8%） [9, 12]。したがって、子宮洗浄の代替処置として、より簡便にできる子宮内薬液注入の効果を検証し有効な薬液を選択しておくことが低受胎牛対策として必要と考え、本試験を計画した。

## 【材料と方法】

### 1. 供試牛

分娩後連続して平均  $7.9 \pm 2.2$  回 (5 回～14 回) 人工授精を行っても受胎に至っていないホルスタイン種搾乳牛 47 頭に対して、人工授精実施 24 時間後に薬液（下記 3 参照）50ml を両子宮角内に 1 回のみ注入して、受胎した頭数および受胎率を調査した。

### 2. 試験期間、試験場所および子宮内薬液注入の実施時間帯

平成 29 年 10 月 18 日～平成 30 年 9 月 27 日の約 1 年間における期間中の水曜日と木曜日、鯉淵学園農業栄養専門学校酪農場に隣接し、かつ同学園と教育連携している（有）瑞穂農場鯉

淵分場内のキャッチペンにて、午前 7 時および午後 0 時半からのそれぞれおよそ 1 時間の間に子宮内薬液注入作業を実施した。

### 3. 子宮内薬液注入に使用した薬液と器具器材

本試験に用いた子宮内注入用薬液は下記の 3 種であった。① 0.5% ポビドンヨード液（原液は動物用イソジン® 液 2%、Meiji Seika ファルマ株式会社、東京）：2% 原液を滅菌生理食塩水（生理食塩液「ヒカリ」500ml プラスチックボトル、光製薬株式会社、東京）で容量比 1：3 に希釈して、0.5% ポビドンヨード液を作製した。② いっちキトさん（キトサンと醸造酢の混合液状製品；明治飼糧株式会社、東京）：原液のまま使用した。③ 混合液：いっちキトさん 25ml と滅菌生理食塩水 350ml を混ぜ合わせた液に 2% ポビドンヨード液 125ml を加え、ポビドンヨードといっちキトさんをそれぞれ 0.5% 濃度、5% 濃度で含む混合液とした。0.5% ポビドンヨード液と混合液については、一度に 500ml を作製し、密閉・散光・室温で保存して、作製から 2 週間以内のものを使った [13]。いっちキトさんについては、使用の都度、原液ボトル（密閉・遮光・室温保存）から必要量を取り出して使用した。子宮内に注入する 3 種の薬液は、無作為に試験牛に割り振られた。

試験場所に携行した器具器材は、下記の通りであった。① 人工授精用注入器（ストロー注入器 A3-550 型、富士平工業株式会社、東京）、② 電子線滅菌済みシース管（横穴式、富士平工業株式会社）、③ 予め薬液 50ml を吸引した滅菌済み 50ml プラスチックシリンジ（テルモ株式会社、東京）、④ 膣鏡（富士平工業株式会社）、⑤ 塩化ベンザルコニウム（200 倍希釈）を浸み込ませた紙タオル（以下、オスバンタオル）、⑥ 消毒用アルコール綿花、⑦ 懐中電灯、⑧ 直腸検査用グローブ

### 4. 子宮内薬液注入の方法

子宮内薬液注入の方法は下記の通りであった。対象牛の直腸内の糞を除去して、オスバンタオルおよび消毒用アルコール綿花の順で外陰部と膣前庭を清浄にした。次いで、膣鏡（塩化ベンザルコニウムをぬるま湯で 200 倍希釈した液に予め浸漬しておく）を挿入直前にアルコー

ル綿花で清浄にした後、腔内に挿入し、懐中電灯の灯りで子宮外口を目視しながら、シース管を装填した注入器先端を腔粘膜に触れないように子宮外口に挿入し、その位置で保持した。その後、術者は直腸内に腕を挿入して子宮頸を保持しながら、注入器を子宮体部まで進めた。注入器の先端が子宮体に達した合図を受けて、助手はシース管先端をその位置に止めるように注入器を注意深く抜去し、次いでシース管を通じて薬液 50ml を 10 秒ほどかけて注入した。シース管内に残留した薬液を全て子宮内に入れるため、シリンジに少量の空気を吸引して残留した薬液を押し込んだ。最後に、シース管を抜き、両子宮角を軽くマッサージした。

## 5. 調査項目

### (1) 3種の薬液の比較

本調査では受胎とは、人工授精とその 24 時間後に子宮内薬液注入を実施した後、あるいはその翌周期以降に人工授精あるいは胚移植を実施した後 40 日前後の妊娠診断で受胎を確認し、次いで 60～80 日の妊娠診断で妊娠継続と判定されたものを指す。人工授精 24 時間後にそれぞれの子宮内薬液注入を受けた周期 (0 周期) での受胎 (以下、薬液注入後受胎) およびその翌周期 (1 周期)～5 周期目までの受胎 (以下、経過受胎; 発情が再帰した場合は、その都度、人工授精あるいは胚移植を行ったが、薬液注入は行わなかった) を確認し、3 種の薬液の効果を比較した。

## 6. 統計処理

3 群間の受胎率の有意差検定は、Tukey の

WSD (Wholly significant difference test) 法により有意差検定を行い、有意水準を  $P < 0.05$  とした。

### 【結果】

約 1 年間の試験期間中に、低受胎牛 47 頭に対して人工授精 24 時間後に子宮内薬液注入を行った結果、供試牛の 51.1% にあたる 24 頭で受胎した (表 1; 全体受胎率と表記した)。その内訳は、薬液注入後受胎 13 頭 (27.7%) および経過受胎 11 頭 (32.4%) であった (表 1)。薬液注入後受胎率において、3 種の薬液間に有意差はみられなかった (0.5% ポビドンヨード液、いっちキトさん、混合液の順に 23.5%, 35.3% および 23.1%、表 1)。経過受胎率では、0 周期で混合液が注入された群 (50.0%) が、他の薬液を注入された 2 つの試験群 (0.5% ポビドンヨード液; 23.1%、液状キトサン製品; 27.3%) よりも受胎率は高かったが、有意差はみられなかった (表 1)。薬液注入後受胎および経過受胎を合わせた全体受胎率は、3 種の薬液間に有意差はみられなかった (順に、41.2%、52.9% および 61.5%; 表 1)。

経過受胎した牛 11 頭の 1～5 周期の間における受胎した頭数の分布は、順に 3 頭、4 頭、2 頭、2 頭、0 頭であった (表 2)。

### 【考察】

ポビドンヨード液は市販の 2% 原液のまま使用すると細胞毒性が強いが、0.5% に希釈すると細胞毒性は弱まり、有効ヨウ素濃度が高くなり、殺菌効果が増強されると報告されている [4, 12]。秋田 (2014) は、潜在性子宮内膜炎に罹

表 1. 3 種の薬液の供試牛 47 頭に対する薬液注入後受胎率、経過受胎率および全体受胎率に及ぼす効果

薬液 \ 受胎の種類	薬液注入後受胎 %	経過受胎 %	全体受胎 %
0.5% ポビドンヨード液	23.5 (4/17) NS	23.1 (3/13) NS	41.2 (7/17) NS
いっちキトサン	35.3 (6/17) NS	27.3 (3/11) NS	52.9 (9/17) NS
混合液	23.1 (3/13) NS	50.0 (5/10) NS	61.5 (8/13) NS
計	27.7 (13/47)	32.4 (11/34)	51.1 (24/47)

- ・薬液注入後受胎の括弧内は、薬液注入後受胎頭数/子宮内薬液注入実施頭数を指す。
- ・経過受胎の括弧内は、経過受胎頭数/(子宮内薬液注入実施頭数-薬液注入後受胎頭数)を指す。
- ・全体受胎の括弧内は、(薬液注入後受胎頭数+経過受胎頭数)/子宮内薬液注入実施頭数を指す。
- ・NS は、同列の区間に有意差はみられないことを指す。



表2. 経過受胎した11頭の受胎した周期の内訳

経過受胎の状況		周 期				
頭数	受胎頭数	1 周期目	2 周期目	3 周期目	4 周期目	5 周期目
34	11 (32.4)	3 (1, 1, 1)	4 (1, 0, 3)	2 (1, 1, 0)	2 (0, 1, 1)	0 (0, 0, 0)

- ・受胎頭数の括弧内の数字は、受胎率を指す。
- ・受胎した周期の内訳における括弧内の数字は、順に 0.5% ポビドンヨード液、いっちキトさん、混合液の薬液注入により経過受胎した頭数をそれぞれ指す。

患しているホルスタイン種経産牛を対象に人工授精後の子宮内薬液注入を行った試験で、0.5% ポビドンヨード液が 2% ポビドンヨード液よりも高い受胎促進効果を持つことを報告している [1]。子宮内に注入されたポビドンヨード液が乳に移行する可能性は否定されている [6] ことから、搾乳牛に用いても食品安全上の問題はクリアされると考えられる。ヒトの産科領域でも、0.5% ポビドンヨード液が膣などの粘膜の洗浄および消毒に利用されている [2]。

いっちキトさんは、経口投与による牛の乳汁中体細胞数の低減および子牛の免疫能強化を目的として酪農場現場で汎用されている。また、小比類巻ら (2013) は、子宮内膜へのキトサンの組織活性作用および防御機構促進作用を期待して、人工授精前に液状キトサン製剤 (Meiji Seika ファルマ株式会社、東京) を子宮内注入することによってその有効性を報告している [7]。

本試験で用いた 3 種の子宮内注入用の薬液の比較において、「薬液注入後受胎」においては 3 種の薬液の間に差はみられなかったが、「経過受胎」において、有意差はみられなかったものの混合液が 0.5% ポビドンヨード液ならびにいっちキトさんより受胎率は高く、より効果が高いことがわかった。これは、混合液中のポビドンヨード液の殺菌効果およびキトサンの組織活性作用と防御機構促進作用の相乗効果によるものと推察される。経過受胎が、子宮内薬液注入の効果なのかどうかの正確な診断には、子宮内膜の生検等を試みる必要があると考えられたが、本試験のような大規模商業的酪農場での実施は困難であった。しかし、11 頭の受胎牛のうち薬液注入をして間もない 1 周期目 (受胎頭数:3 頭) および 2 周期目 (受胎頭数:4 頭) で受胎頭数の 63.6% を占めた (表 2) ことから、

経過受胎も子宮内薬液注入の効果であることが推察された。このことは、子宮内薬液注入の新たな利用方法を示唆するものではないかと考えられる。

子宮内薬液注入のタイミングを人工授精後 24 時間目に設定したのは、未經産牛を用いて交配後の子宮卵管接合部の結紮時期と受胎率の関連を調べた試験で、交配後 16 時間が経過すればほぼ 100% の精子が卵管に移送されることが示唆された成績 [14] を根拠にしている。また、子宮内薬液注入によって子宮内膜が刷新されることによって内因性 PGF<sub>2α</sub> が分泌され、形成初期の黄体を退行させる危険性も考えられたが、本試験の結果から判断する限り、人工授精後 24 時間目の子宮内薬液注入によって形成途上の黄体が退行することはないと推察される。これは、牛の形成初期 (発情周期の 6 日以前) の黄体には PGF<sub>2α</sub> の黄体退行作用は無効である [8] ことから類推される。

本試験で用いたポビドンヨード液の消毒作用の主体は、ポリビニールピロリドン・ヨウ素の複合体から除放されるヨウ素の酸化力であり、被反応物は微生物ばかりではなく生体細胞にも影響を及ぼすものの、複合体から除放されるため生体に対する障害は少ないと言われている [5]。一方、ポビドンヨード液には洗浄効果を上げるために各種の界面活性剤が添加されているが、界面活性剤の種類によって細胞毒性の強度が異なることが報告されている [5]。本試験で用いられたポビドンヨード液にはポリオキシエチレンノニルフェニールエーテルという界面活性剤が添加されており、高い細胞毒性が指摘されている [5]。しかし、DS ファーマアニマルヘルス (株) が 2016 年 8 月に販売を開始した動物用イソジン® 液には、上記の界面活性剤の代わりに日局グレードで医薬品に分類され

表3. 低受胎を示す搾乳牛への人工授精24時間後の子宮内薬液注入の推定経費節減効果

経費節減項目	1頭当たり節減される、あるいは増収が期待できる費用
人工授精経費	精液料金 3,000～5,000円/回
胚移植経費	胚料金 15,000～30,000円/回
経産牛飼養管理経費*	1,500円/日 → 31,500円/21日
初妊牛導入頭数経費(乳牛償却費)**	経産牛1頭当たり12,000円の利益

\* 分娩間隔449日、年間462kgの乳量減少、乳価100円とした場合の試算で、分娩間隔が短くなれば、表中の額より低下する。

\*\* 供用期間の延長(3.5産次から4.0産次に除籍産次が延びた場合)により、表中の額が増収となる。両者のデータは、乳用牛のベストパフォーマンス実現会議(2015)より

ているラウロマクロゴール(ポリオキシエチレンラウリルアルコールエーテル)という界面活性剤が添加されているので、安全性はより高いと推察される。

各薬液50ml当たりの単価(8%消費税込み)は、0.5%ポビドンヨード液約45円、いちキットさん約189円、および混合液約54円であった。獣医師に薬液注入を依頼した場合、上記薬液代の他に1回当たり3,050円(8%消費税込み;ひので酪農業協同組合)の技術料がかかるが、自家注入を行えば薬液代のみで済ませることができる。

人工授精24時間後の子宮内薬液注入の経済的効果について検討を試みた(表3)。低受胎牛がもたらす経済的損失は、経産牛では分娩間隔延長、すなわち繁殖遅延に起因する。薬液注入によって受胎性が改善されることになれば、次回発情での人工授精あるいは胚移植の機会が減り、精液料金あるいは胚料金が節減できる(表3)。また、次回発情までの飼養管理費も節減できる(表3)。乳牛ベストパフォーマンス実現会議(2015)の提言では、淘汰数が減り平均供用期間が延長すると、乳牛償却費用が節減でき、初妊牛の導入頭数の減少につながる(表3)と解析されている。その他、分娩間隔が短くなると乳量減少量が小さく抑えられる(経産牛1頭当たり繁殖遅延による損失は710円/日);低受胎が原因で淘汰される頭数が減少し平均供用期間が延長すると、牛群内における乳量の高い産次の頭数割合が高まり生乳生産量の増加が見込まれる;および生産子牛数の増加により、和牛子牛や交雑種子牛の販売による収入増も期待できると解析されている。

本試験では、不受胎の原因が不明な低受胎牛に対する受胎促進対策として、人工授精を実施した24時間後の子宮内薬液注入が診断的治療の優先的選択手段となり得ることが示された。そして、現場で往々にしてある場当たりの対策を解消でき、牛に負担をかけず、かつ経済的な低受胎牛対策確立の一助になると期待される。さらに、本試験での人工授精実施24時間後に実施する子宮内薬液注入は、要指示医薬品(動物用のホルモン剤、抗菌剤など)を用いないため、人工授精師および人工授精師資格を有する農家自身でもできる低受胎牛対策となることが期待される。

結論として、低受胎牛に対して人工授精後24時間目に子宮内に薬液を注入する処置によって、その約半数を受胎させることができたことから、低受胎牛対策として人工授精実施24時間後の子宮内薬液注入が有効な手段であることが示された。特に、混合液を子宮内注入した場合、その周期のみならず、翌および翌々周期まで薬液注入による受胎促進効果が効率良く持続することが示唆された。

#### 【謝辞】

試験牛の提供などでご協力いただいた(有)瑞穂農場鯉淵分場の形山場長ならびに職員の皆様、終始サポートいただいた鯉淵学園農業栄養専門学校酪農場の職員の皆様および平成30年度畜産コース卒業生に謝意を表す。また、統計処理の方法をご教示いただいた吉田愛美氏、および界面活性剤に関する情報をご提供いただいたDSファーマアニマルヘルス(株)畜産事業部の渋川智生氏に御礼を申し上げる。

## 【引用文献】

- [1] 秋田真司. 2014. 乳牛の繁殖障害に対する 0.5% ポビドンヨードの子宮内注入の効果. 広島県獣医学雑誌. 29:21-24.
- [2] Haas, D. M., Morgan, S. and Contreras, K. 2013. Vaginal preparation with antiseptic solution before cesarean section for preventing postoperative infections. *Cochrane Database Syst. Rev.* 1:1-40.
- [3] Humblot, P. 2001. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology* 56: 1417-1433.
- [4] 岩沢篤郎, 中村良子. 2002. ポビドンヨード製剤の使用上の留意点. *Infection Control*. 11:18-24.
- [5] 岩沢篤郎, 中村良子. 2003. ポビドンヨード製剤の細胞毒性とモルモット創傷部に対する影響. *感染症誌*. 77:948-956.
- [6] Kaneene, J. B., Coe, P. H., Smith, J. H., Rapnicki, P., Smith, C. L., Gerloff, B. and Morrow, D. A. 1986. Drug residues in milk after intrauterine injection of oxytetracycline, lincomycin-spectinomycin, and povidone-iodide in cows with metritis. *Am. J. Vet. Res.* 47:1363-1365.
- [7] 小比類卷正幸, 向井真知子, 大塚浩通, 三浦弘, 川村清市. 2013. 液状キトサン製剤の子宮内注入が無発情牛の発情・排卵同期化後の受胎率に及ぼす影響. *日獣会誌*. 66:385-389.
- [8] 小島敏之 (監訳). 2014. 2.3.2 発情コントロールの方法. 牛の実践臨床繁殖学; CD 版. (2.3.2 Methods of oestrus control. "Compendium of animal reproduction 10th revised edition". 2009. Monica Ptaszynska, ed.). 株式会社インターベット. 東京. pp 38-59.
- [9] 大滝忠利. 2011. 炎症性子宮疾患の診断、治療、予防に関する全国アンケート. *日本家畜臨床感染症研究会誌*. 6:47-52.
- [10] Salasel, B., Mokhtari, A. and Taktaz, T. 2010. Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows. *Theriogenology*. 74:1271-1278.
- [11] Santos, J. E., Bartolome, J. A., Cerri, R. L., Juchem, S. O., Hernandez, O., Trigg, T. and Thatcher, W. W. 2004. Effect of a deslorelin implant in a timed artificial insemination protocol on follicle development, luteal function and reproductive performance of lactating dairy cows. *Theriogenology* 61:421-435.
- [12] 鈴木貴博. 2012. 子宮内細菌感染と子宮疾患治療. *家畜感染症学会誌*. 1:97-103.
- [13] 内田昌希, 浦山玲菜, 一色恭徳, 八巻努, 前野拓也, 上田秀雄, 近藤誠一, 夏目秀視. 2014. 希釈調整した 0.5% ポビドンヨード液の安定性および各種ポビドン製剤の比較. *医療医学*. 40:109-116.
- [14] Wilmut, I. and Hunter, R. H. 1984. Sperm transport into the oviducts of heifers mated early in oestrus. *Reprod. Nutr. Dev.* 24:461-468.

## Comparison of three kinds of non-anti-bacterial drugs for intrauterine infusion after artificial insemination on fertility of repeat breeder lactating cows

Yukari Murata<sup>1)</sup>、Hiromi Shiina<sup>2)</sup>、Taichiro Ishige<sup>1)</sup>、Toshiyuki Kojima<sup>1)</sup>

Affiliation:

<sup>1)</sup> KOIBUCHI College of Agriculture and Nutrition

<sup>2)</sup> Koibuchi dairy farm, MIZUHO FARM Co. Ltd.,

Location:

KOIBUCHI College of Agriculture and Nutrition

5965 Koibuchi, Mito city, Ibaraki 319-0323, Japan

Tel 029-259-2811, Fax 029-259-6965

Koibuchi dairy farm, MIZUHO FARM Co. Ltd.,

5936-80, Koibuchi, Mito city, Ibaraki 319-0323, Japan

Tel 029-239-3100, Fax 029-239-3101

Correspondence:

Name: Toshiyuki Kojima

E-mail address: k1887523@kadai.jp

to-kojima@mail.koibuchi.ac.jp

Mobile phone: 090-9546-1961

### [Abstract]

The present study was performed to examine the effects of three kinds of non-antibiotic drugs (0.5% povidone iodine, chitosan-fermented vinegar preparation, and the mixed formulation of 0.5% povidone iodine and 5% chitosan-fermented vinegar) for post insemination-intrauterine infusion to 47 repeat breeder Holstein lactating cows in a commercial large-scale dairy farm on their subsequent fertilities. Fifty ml of the chosen drug (three treatment groups) was infused to both uteri of the cows at 24h after artificial insemination (AI). No significant difference was observed between the three drugs in the conception rate during the actual cycle of intrauterine infusion. Although significant differences were not seen between the mixed formulation and the other two drugs in the conception rate in the following cycles, the mixed formulation showed numerically higher effectiveness. Of all 47 repeat breeder cows receiving intrauterine infusion, 13 cows (27.7%) conceived in the same cycle of the intrauterine infusion, whereas 11 cows (32.4%) conceived in the following cycles. Consequently, it is concluded that post AI intrauterine infusion of the drugs is an efficient fertility-promoting protocol for the repeat breeder lactating cows due to almost half of the cows conceiving. Also, the results suggest that the beneficial effect of intrauterine infusion of the mixed formulation could have a persistent effectiveness during the following cycles.

**Keywords:** chitosan, lactating cows, post AI intrauterine infusion, povidone iodide, repeat breeder