

氏名(本籍)	はら だ ひで お (岡山県) 原 田 秀 夫 (岡山県)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙第267号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	牛の子宮頸管粘液の結晶形成現象による卵巢機能の判定 — とくに卵巢機能障害の診断治療に関する研究 —
論文審査委員	(主査) 教授 大 地 隆 温 (副査) 教授 芦 田 淨 美 教授 松 浦 健 一

### 論 文 内 容 の 要 旨

最近、家畜繁殖領域に、ラジオイムノアッセイ法 (RIA 法) やエンザイムイムノアッセイ法 (EIA 法) が導入されて、血液及び乳汁中のホルモンの定量が可能となり、生体内における性ホルモンの動態が解明されつつある。しかし、実際には多くのホルモンが相対的な関連において、その作用が微妙に発現することから、その評価には慎重を要する。また、ホルモンに対する反応性についてもかなりの個体差が認められる。こうしたことにより、臨床家の立場からは、現場で即応可能な卵巢機能の簡便かつ客観的な診断法の確立が望まれているところである。

子宮頸管粘液性状は、卵胞期・黄体期に伴う Estrogen(E)・Progesterone(P) の消長をよく反映するとされている。更に、正常性周期における結晶形成現象には、一定のパターンが存在し、卵巢周期の各時期特有の結晶像が観察される。一方、卵巢機能障害においてはなお不明な点が多い。

本研究では、発情期・非発情期だけでなく、P 優位から E 優位への移行期、及び E 優位から P 優位への移行期にも、両ホルモンの微妙な量的バランスの変動に従って結晶像が変化するので、これらについて詳細に検討した。その結果、頸管粘液の結晶形成現象が、卵巢機能の診断に充分利用できることを認めたので、その成績の概要について述べる。

#### 1. 標本作成時の条件

標本の作成に際しては、米粒大の粘液を約 2 cm の広さになるようにスライドグラスに塗抹し、35°C 以下で、10分以上風乾する。

#### 2. 未成熟牛での所見

外観的には卵巢が静止状態にあると思われた、6.5 カ月齢の未成熟牛における標本には、内分泌的な動きが僅かながらもおきていることが推察される、結晶像 (+) の所見が認められた。この結果から、極く微量の E や P の動きでも、結晶像には敏感に反映することが判明した。

#### 3. 成牛での所見

正常性周期を回帰している成牛では、外部徴候・卵巢所見・粘液性状の各所見がよく一致した動きを示している。特に今回の試験では、標本の中心部における羊歯状結晶が、単に (+) とか (卍) だけでなく、像の大きさや形・線の太さ・配列等にも差異があり、更に、顆粒状の細胞 (白血球) の出現・気泡の形成・像

の周辺部における雲状あるいは層状の縁の形成・粘液塊の有無などのE・Pのバランス上の変化に伴う特徴的な所見が現れることが確認された。

このことから著者は、正常成牛における粘液所見を、E・Pのバランスの違いによって6段階に分類し、これに未成熟牛で見られるE及びPが共に劣勢な時の所見を加えて、I～VII型迄の7段階の区分を作成した。そしてこれをE・Pレベル推定の尺度として応用することで、粘液所見から逆に卵巣のホルモン分泌機能を類推することを試みた。

#### 4. 実験的ホルモン異常牛の場合の所見

正常性周期を回帰している牛の黄体開花期にE<sub>2</sub>を投与して、人為的にE・Pのバランス失調をおこさせた結果、卵巣機能障害時と同様の粘液所見が得られた。これによって非生理的な卵巣の動態を裏づけることができた。

#### 5. 野外における卵巣機能障害牛の場合の所見

性周期が不明瞭で、診断が困難な牛の頸管粘液の結晶像を検査して、黄体期像又は発情期の結晶像のいずれでもない両者の混在像や、結晶像が出現しても紐状や羊歯状でなく、斑紋状や星状・ヒトデ様の非定形的結晶像が見られた場合には、卵巣機能障害と診断し得ることが判明した。

著者が作成した7段階の区分に、各種の卵巣機能障害をあてはめてみると、大略以下のとおりに分類できた。

I型：P優位の像。正常牛では異体開花期に認められる。結晶形成現象は(－)で、気泡の形成や粘液塊が認められた。病的には黄体遺残症や妊娠黄体と嚢胞が共存する場合に認められる。

II型：P優位であるがEもわずかながら関与している時の像。正常牛では黄体退行開始期に認められる。結晶像は(＋)で、標本の大部分が黄体期相を呈し、一部に小型の非定形的結晶像を形成する。また結晶像の周辺には顆粒状の細胞(白血球)が出現してくる。病的には卵胞発育不全や持続性発情において認められる。

III型：PよりEがやや優位な時の像。正常牛では発情開始直前に認められる。結晶像は(++)で、広範囲に小型の羊歯状及び非定形的結晶像を形成し、像の周辺には雲状あるいは層状の縁が形成される。病的には持続性発情や黄体形成不全での発情時に認められる。

IV型：E優位の時の像。正常牛の発情期に認められる。結晶像は(+++)で、定形的結晶像が標本の周辺部迄密に配列する。発情前期は像の大きさがやや小型であるが、中後期には大型となる。病的には稀に発情型の卵胞嚢腫で認められる。

V型：やや弱いながらもEのみが作用している時の像。正常牛では排卵直後に認められる。結晶像は(+++)を表し、通常は像が発情期のものから急激に縮小退行していく。発情期における粘液中の水分含有量が多いものでは、像の配列が粗となり、吸湿した標本に酷似する。この様な所見は嚢腫様黄体が形成される時の発情時に認められる。

VI型：低レベルのE・Pが作用している時の像。正常牛では排卵後4～5日目に認められる。結晶像は(+)～(++)で、標本の中心部には、線の太い湾曲した非定形的結晶像が形成され、その周辺は黄体期相を表し、顆粒状の細胞も出現する。病的には卵胞嚢腫の治療過程や黄体嚢腫で認められる。

VII型：E・P共に劣勢な時に見られる像。結晶像は(－)～(＋)で、正常な成牛ではこの様なホルモンバ

ランスはなく、未成熟牛において認められる。病的には卵巢静止や無発情型卵胞嚢腫で認められる。

微弱発情型や発情型の卵胞嚢腫では、卵胞の機能レベルに準じて粘液組成が様々であるため、結晶像も多様化している。標本の全体像としては調和を欠き、各型が部分的に混在しているものも認められた。卵胞嚢腫の予後判定に粘液所見を応用するならば、標本に結晶像の退行が見られる様になると、順調な経過を辿っているものと判断され、これに引続きI型の所見が認められれば、完全に黄体化したものと判定することが可能であった。

以上の如く、卵巢機能障害牛の粘液所見から、その時点における卵巢のホルモン分泌機能を推察し、これに臨床所見及び直腸検査による卵巢所見を重複させ、その病勢判断を行って、合理的な治療処置を施したところ、非常に良好な治療効果を得ることができた。

#### 6. 発情時の結晶像と妊孕性

発情時の結晶像と妊孕性との関係では、正常牛はもちろん、各種卵巢機能障害牛の治療後のものでも、機能的黄体が先行した後の発情は、明瞭な外部徴候を表し、大型の定形的な羊歯状の結晶像が形成された。そしてこの時に授精したもので、排卵後7日目頃迄に一定レベルのP分泌可能な黄体が形成されたものでは、72% (64例中46例)の受胎率を示した。

#### 7. LH-RH-EA並びにAPG投与と粘液性状

ホルモン剤に対する反応性を有する機能的な卵胞が形成されている牛に、LH-RH-EA又はAPGを投与したところ、卵胞の発育が刺激促進されることと平行して、粘液性状の著明な好転が認められ、薬剤に対する卵巢の反応性を把握することが可能であった。

#### 8. 妊娠牛における粘液所見

妊娠牛の粘液所見には、妊娠牛のみの特異的な像は認められなかった。妊娠初期はI型を表しており、90日前後からは、標本の一部に太い非定形的結晶像の出現が認められたが、何れの妊娠月齢においても、標本の全体像としてはP優位の所見を表しており、早期妊娠診断の補助的検査の1つとしても、非常に有効であることが認められた。

#### 9. 頸管粘液のpHについて

正常牛における発情期粘液のpHは、未経産牛が7.0~7.2を、経産牛は6.4~6.8を示した。黄体期には未経産牛が6.6~6.8を、経産牛は6.8~7.0を示した。

無発情型卵胞嚢腫、黄体嚢腫及び卵巢静止の初診時pHは6.8以上、持続性発情では6.8以下、発情型卵胞嚢腫では6.2~7.2の幅広い範囲に分散していた。また、子宮内膜炎で、膿が粘液中に混在するものは7.4以上の高いpH値を示した。頸管粘液のpHと結晶形成現象との間にはとくに関連性は認められなかった。

#### 10. 卵巢機能減退牛における血清中E<sub>2</sub>、P測定成績

卵巢機能減退牛における血清中のE<sub>2</sub>とPを、RIA法で測定したところ、E<sub>2</sub>値は10pg/ml以下で、Pも1ng/ml以下の低い値を示しているにもかかわらず、標本には黄体期像を示すものと結晶像を形成するものとがあった。この結果から、E及びPの標的部位での両ホルモンの作用発現の程度と、血清中のE・P濃度は、必ずしも一致しないことが判明した。

以上の結果から、子宮頸管粘液の諸性状、とくに結晶形成現象を詳細に解析し、卵巢の内分泌機能の状態を推察しようとする試みは、適切な方法であることが認められた。そしてこの粘液所見と直腸検査による卵

巢所見を照合することによって、形態的診断に加え、機能的にも診断が可能となり、治療方針確立に際して、黄体化か、あるいは卵胞形成の何れの方へ導く方が良いかの的確な指針にすることができる。また、処置後の卵巣の反応及び経過についても、正確にしかも早期に把握することができ、繁殖障害の診断・治療を正確かつ客観的に行うことが可能と考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

性ホルモンは上位、下位の各分泌器官の縦の支配系（フィードバック系も含む）及び発情ホルモンと黄体ホルモンとの間にみられるような拮抗、ときには協力作用等横の関係も含め複雑に交錯しているが適切な統御により一定のパターンを保ちながら推移している。しかし、その統御が乱れることも稀ではなく、臨床的には繁殖障害に結びつく結果となる。

血中のある一つの性ホルモン量を測定した場合、正常パターンで推移している個体については、繁殖機能的な裏づけはある程度可能と思われるが、統御が乱れているようなもの（卵巣機能障害など）では、特殊な場合を除き、個体差等も考慮に入れると、なおさらその価だけで、その生体の、いわゆる sexual status を説明するのは困難である。

しかし、各性ホルモンが相互に交錯し、混乱があったとしても最終的には終末標的個所において、どのような影響が現れているかにより、その時点でのホルモン支配の状況がほぼ推察できる。

すなわち、通常生殖器に必要な変化を生ぜしめるのは支配系の末端に位置する発情ホルモンと黄体ホルモンであり、両ホルモンの影響力（その個体々々における in vivo での優位性）をある指標によって判定できれば、関連して卵巣機能も推察できる。

本論文では以上のような考えの通りに、模索した結果、子宮頸管粘液の結晶像を詳細に解析することにより、表題のような問題をかなり解明できる成績が得られている。

牛の頸管粘液の塗抹乾燥標本が結晶像を形成すること、また、結晶そのものは食塩が主であることも以前から知られており、さらに結晶形成の有無、結晶像の形は発情ホルモンと黄体ホルモンの相対的な割合によって変化することは明らかで、前者は結晶像の形成、後者はそれに対して拮抗的に作用することが知られている。

今回の試験では、従来報告されている結晶像の分類様式にあてはまらない、いろいろな像が存在することを確認し、これらを臨床所見とも照合しながら7型（I～VII型）に分類し、これを尺度として臨床繁殖領域に応用し、興味ある結果を得ている。

### 実験の内容

#### I. 基準の設定

著者はまず正常性周期を示している牛の頸管粘液を経時的に観察し、性周期の各時期別正常像を確認し、I型からIV型（従来用いられていた結晶像の(一)～(卅)に相当)とし、この範ちゅうに入れるには抵抗のある像（卵巣機能の異常が推察される？）を3種に加え、これらをV、VI、VII型とした7種の基準を設定した。

#### 2. 2.3の予備試験

生後6.5カ月齢の性的未成熟牛においても、弱い結晶像の出現する時期と結晶像が認められない時期があり、わずかな卵巣ホルモンの動きによっても敏感に反応することが確認された。

つぎに正常性周期を回帰している牛の黄体期に発情ホルモンを投与して人為的に両ホルモンの失調を起こさせると正常周期中には見られない像が出現した。このことから非生理的な卵巣の動きを結晶像から推察できるのではないかと考えられた。

また、臨床的にみて、卵巣機能減退のもの（3頭5例）で血清中の発情ホルモンも黄体ホルモンも共に低値（ $E_2 = < 10 \text{ pg/ml}$ , Progesterone =  $P = < 1 \text{ ng/ml}$ ）な場合でも、結晶像や非結晶像がみられることから、機能減退のものでも微妙なホルモン量の変化により、粘液結晶像に影響を与えることが推察された。

以上のように結晶像は卵巣のホルモン分泌にตอบสนองして敏感に変化することが確認された。

### 3. 卵巣機能障害牛と結晶像

経時的に観察した結果、臨床的に卵巣機能障害と診断されたものの頸管粘液結晶像を観察した。

I型（結晶形成なし）は黄体遺残症、II型は卵胞發育不全や持続性発情、III型は持続性発情や黄体形成不全、IV型は発情型卵胞嚢腫、V型は嚢腫様黄体が爾後に形成されたときの発情時の粘液、VI型は卵胞嚢腫の治療経過中や黄体嚢腫で認められた。VII型は卵巣静止や無発情型の卵胞嚢腫に認められた。

すなわち、外観的に正常な発情周期の認められないものの結晶像を解析することで、その時点での個体の卵巣機能を推測することが可能であり、さらに連続観察することで、その動きも知ることができた。正常性周期を回帰しているものでは各時期に応じてI～IV型が当然観察される。

### 4. 卵巣機能障害の治療と結晶像との関係

結晶像が発情ホルモンあるいは黄体ホルモンの優勢像、または両ホルモンとも低レベルの像等により、それぞれに対応した合理的な治療方針を立てることができる。

さらに、治療処置後、経時的に粘液像を観察することにより、卵巣機能の推移が把握でき、処置の効果をすることも可能である。

### 5. 結晶像と妊孕性

授精時の結晶像は典型的なIV型が望ましく、結晶形成はみられるもののIV型以外の像の場合での受胎率は極めて低い結果であった。また、妊娠中のものの粘液像はI型であり、早期妊娠鑑定にも応用できた。

### 6. その他の粘液所見について

関連して、粘液 pH と発情期の好中球の有無について観察したが、内膜炎等、生殖器に炎症のあるものは pH が高く、好中球が認められる成績を得ている。

以上のとおり、本論文は発情ホルモンや黄体ホルモンの影響で微妙に変化する頸管粘液の結晶像を詳細に解析し、その結果を踏まえ、従来の分類区分をも含めて新しく7種の型に分類した。そして、結晶像が極めて微量の発情ホルモンや黄体ホルモンの変動によっても変化することを自然材料や実験によって説明した。また経時的に各種卵巣疾患について頸管粘液の結晶像を観察し、それぞれ特有な像を形成すること、卵巣には形態的には変化が認められないようなときでも、粘液結晶像に微妙な変化が現れることも確認している。これらのことから卵巣機能を判定する一つの有力な目安ともなり、さらに、卵巣疾患を治療した場合、結晶像の動きを通して卵巣の反応を知ることができる。

一方、正常牛の場合も妊孕性の良いものは授精時の結晶像は必ずIV型であること、黄体期には完全なI型が好ましいことなど、野外における繁殖上のいろいろな問題と取り組む場合、比較的容易な術式であり、また極めて応用範囲が広く、実際に繁殖障害牛の治療等に应用した結果も良好な成績が得られている。

これらのことは、根拠のある判断によって迅速な処置が要求される野外臨床繁殖領域において大きく貢献する業績として高く評価される。

よって、獣医学博士の学位を授与するのにふさわしいものと判定した。