

発情豚の子宮頸管部粘液への好中球遊走現象に
関する研究

紫野正雄

2000

発情豚の子宮頸管部粘液への
好中球遊走現象に関する研究

紫野 正雄

目 次

	ページ
緒 言	1
第 1 章 繁殖周期に伴う頸管粘液中の好中球数、 外部徴候の 変化	3
第 2 章 頸管粘液中の好中球数の外部徴候ならびに 排卵時期との関係	7
第 3 章 疑似発情を誘起した卵巢摘出豚における 頸管粘液中の好中球数および外部徴候の変化	17
第 4 章 自然発情および疑似発情の頸管部粘液組織の 形態学的変化	24
第 5 章 頸管粘液中の好中球の遊走におよぼす Indomethacinおよび顆粒球コロニー 形成刺激因子の効果	30
総括と結論	37
謝辞	40
参考文献	41
図表	

緒 言

発情期の豚の頸管粘液中には多数の好中球がみられる。このような現象は、他の家畜にはみられない [7,9,31,32,41,44,71,73-79,88,93,109,115]。一方、犬、猫、マウスおよびラットは上皮細胞が変化した多数の角化細胞が認められる [12,14,17,18,27,47,49-52,58,65,75,80,97,111,112]。しかし、これらは合目的な役割をもった現象とはいいがたく、退行性変化と考えられる。

一般に好中球の遊走がみられるのは炎症の場合である。発情期の頸管部に炎症らしい所見はみられないが、粘膜の充血、腫脹、粘液分泌の増加などは、発情にともなう特徴的变化で炎症時とは異なる。

筆者は、豚の頸管粘液中への好中球遊走について、その意義や機序を追求するとともにブタの繁殖機能を判定する上で、何らかの尺度として応用できないかどうか視野に入れながら実験的研究を行なった。

実験の順序として、第1に、繁殖周期に伴う頸管粘液中の好中球数の好中球数の変動を調べた。正常に発情を繰り返しているブタの発情、妊娠、分娩および授乳の全期間に渡って頸管粘液中の好中球数の特徴的变化がどこに有るかの確認を目的とした。

第2に、頸管粘液中の好中球数と外部徴候ならびに排卵時期との関係について検討した。発情時には外部徴候の変化にもとずいて頸管粘液中の好中球数との関係を明らかにし、卵巢では卵胞の成熟と排卵が起こっている。この過程のどのところに最も関係が深いのかをさらに内分泌学的検討を含めて詳細に解析した。

第3には、第2の結果から内分泌学的検討が主体になり、結果としてエストロゲンとプロゲステロンがその主要な因子であることがほぼ確定的と考えられる。そのことを確認するために卵巢摘出豚を用いて、エストロゲンとプロゲステロン投与試験を試み、血中エストロゲンとプロゲステロン濃度の変動と外部徴候および頸管粘液中の好中球数の関連について検討した。

第4として、頸管粘液中の好中球遊走と内分泌学的関連する因子としてエストロゲンとプロゲステロンを卵巢摘出豚に投与して疑似発情誘起と自然発情豚と頸管部粘膜組織の組織形態学変化を解析した。その時の粘膜上

皮細胞層の変化、粘膜下織細胞層、血管の変化、遊走細胞の侵出と変化の状況を比較し確認を行った。

第5は、頸管粘液中の好中球の遊走におよぼすIndomethacin (Ind以下略) および顆粒球コロニー形成刺激因子の効果について検討を行った。自然発情豚にIndを投与し、排卵抑制と内分泌学的影響と頸管粘液中の好中球数と外部徴候との関連を検討した。卵巢摘出豚にエストロゲンとInd投与による頸管粘液中の好中球数と外部徴候についての相互の反応について検討をした。つぎに、顆粒球コロニー形成刺激因子とエストロゲンの頸管粘液中の好中球数の増数効果についての影響を検討した。以上、一連の実験を、豚の発情期に生起する頸管粘液中の好中球数の増数現象の内分泌学、細胞組織学変化との関連性を確認して、その機序を解明することを目的とした。

第1章 繁殖周期に伴う頸管粘液中の好中球数、 外部徴候の変化

頸管粘液中には少数の好中球が常時観察されるが、繁殖周期中の発情期には著しく増加する [32,41,48,71,77]。

このように、好中球が集中的に増加出現する現象は、炎症時以外は普通考えられない。そのため、発情期以外の時期に、なんらかの原因で生殖道に起炎的な感作が加わり、好中球が多数出現していることも考えられるので、本章では繁殖周期すなはち、発情期、妊娠期、分娩期、授乳期を通して、頸管粘液中の好中球数の変動および外部徴候について観察した。

実験材料

供試豚は、麻布大学動物繁殖学研究室のランドレース種と大ヨークシャー種の雑種2頭 (No.64, 65) で、3歳、4産、21日の発情周期を正しく反復しているものを選んだ。給飼は、日本配合飼料標準によった。

実験方法

繁殖周期の時期の区分

発情開始当日を0日とし、授精を行い、ついで妊娠、分娩、授乳期までを、表1のとおり1~8に区分した。発情後105日までは21日ごとに区切り、それ以後は供試豚の状況に応じ、適宜区分した。発情周期21日と分娩時、授乳期のおおの区分基点の前後3日の合計7日間を細胞数を集計して平均値として表示した。

1区分を21日間としたのは、豚の発情周期が21日であるので、区切りとして違和感のないこと、および妊娠しているのに豚や牛でまれにみられる、いわゆる妊娠発情が種付け後21日目に発来するので、このことを想定したためである。

外部徴候の観察

雄許容反応は種雄豚を乗駕さすか、両掌で背部を圧迫しても不動の姿勢を保つことで判定し、外陰部は充血、腫脹を観察した。

頸管粘液採取時期

全繁殖周期を通して毎日ほぼ午前8時と午後4時に採取したが、

集計処理を行うときは午前8時の値を採用した。

粘液採取法 [88,93]

直径1 cm、長さ40cmの塩化ビニール管を膣内に挿入し、その中を通して一定の大きさの綿棒を頸管部第2皺襞部粘膜に接着させ、時計回りに5回転させ、粘液を付着させた(図8)。

粘液中好中球算定法 [88,93]

粘液採取した綿棒をPBS液1mlを容れた小試験管に投入し、十分に攪拌洗浄した。こうしてできた細胞浮遊液を細胞数算定に供した。

細胞の算定は浮遊液50 μ l に白血球染色用チルク液250 μ l を加え、Thomaの計算板により実施した(図9)。

繁殖周期を通じて、連日の頸管粘液中の好中球数の推移をそのままグラフとして示した。加えて、発情日およびその日から数えて21日目ごとの前後の3日間、計7日間の、平均値±標準偏差を示した(表1)。

実験成績

外部徴候の変化は、雄許容反応、外陰部の充血、腫脹は発情期には著明であったが、妊娠中はすべて明瞭な発情期と同様な変化は認められなかった。しかし、妊娠末期になって充血、腫脹が強くみられ、これは分娩に備えての変化で、発情期とは異質のものである(図3~7)。

頸管粘液中の好中球数の推移を連日観察した結果、発情期および分娩直後に顕著な上昇が認められた(図1、2、10、13 および表1)。

発情期、No.64は最高278個 \times 60/ μ l、No.65は207 \times 60/ μ lであった(図10)。

分娩直後、No.64は245 \times 60/ μ l、No.65は870 \times 60/ μ lで極めて高い値がみられた(図13)。

つぎに、最初の発情およびその日から数えて21 \pm 3日目ごとの平均値を計算した。

発情期のNo.64の77.3 \times 60/ μ l、No.65の136.4 \times 60/ μ lが高かったが偏差値も大きかった(表1)。

分娩期では、No.64の平均49.1 \times 60/ μ l、No.65は239.3 \times 60/ μ lであるが、偏差値も大きかった(表1)。

No.64では、発情期と他周期の間に有意差は認められなかった。妊娠初期に対して、妊娠中~後期および妊娠後期はともに低値であった。授乳期に

対し、妊娠中期、妊娠中～後期および妊娠後期はともに低値であった（それぞれ、 $P < 0.05$ 、 0.01 、 0.03 ）。

No.65では、発情期は、妊娠初期から後期までの各期および授乳期に対して有意に高く（ $P < 0.01$ ）、また、妊娠初期は後期よりも高かった（ $P < 0.05$ ）。

考 察

この実験の目的は、正常に発情を繰り返しているブタの発情、妊娠、分娩および授乳の全期間に渡って頸管粘液中の好中球数の特徴的变化がどこに有るかの確認を目的とした。

繁殖周期全般を通して連日観察の結果、発情期と分娩直後に好中球数の突発的な上昇がみられた（図10および13）。

この両時期は、共に血中エストロゲン濃度が高値にあることが報告されている [4,15,19,23,24,32,33,45,46,72,83,85,106,107]。好中球数の消長と血中エストロゲン濃度との間に関連性があることが推定される。なお、佐藤ら [73] の述べている最初の発情から数えて21日目ごとの発情予定日に相当する時期には、妊娠していても、血中E値の上昇と、粘液中好中球数の増加が認められるとの現象 [4,25] は、今回の供試豚では疑似発情様徴候がみられなかったので、確認のための実験はできなかった。

つぎに、繁殖周期の時期を区分した各期別の粘液中好中球数比較の結果、No.64では発情期とほかの周期との間には有意差は認められなかったが、発情時の高E値が短期間のうちに急低下したためと推定された。しかし、発情期には短期間とはいえ、好中球数が一過性に上昇している現象は明らかで、連日の観察が重要である。

No.65の発情期は分娩期を除くほかの各期に対し、有意に高かった（ $P < 0.01$ ）が、これは発情時の好中球数の絶対値が高かったことと、発情後スパイク状に好中球数が上下したためで、佐藤ら [73,105] のいう卵巣における小卵胞の発育があったのかもわからない。

分娩期は、No.64, 65とも一過性の好中球数の上昇が認められたが、その前の妊娠各期は概ね低値であった。

しかし、妊娠中期以降からエストロゲンとプロゲステロンの血中濃度が上昇す。妊娠初期の血中エストロゲン値は $2.5\text{pg}/\text{ml}$ 前後であるが、分娩が

近い時期では400pg/mlである。このときのプロゲステロン値は17~20ng/mlであるが、分娩直前には1ng/ml以下となる [1,2,4,16,34,70]。プロゲステロンの抑制がなくなり、エストロゲン効果の残存効果の残りで、それが好中球のラグタイムと考えられる。そして、プロゲステロンは粘液中への好中球出現に対して、エストロゲンと拮抗作用のあることが示唆された。

以上のことから、血中エストロゲン値の上昇が粘液中の好中球数の増加と強く関係することが明らかとなった。

なお、発情時や分娩時にみられる生殖道の充血、腫脹、組織の増殖等の所見は炎症時にもみられる変化であり、好中球出現機序を解明する場合、関連づけて考察することも必要と思われる。

第2章 頸管粘液中の好中球と外部徴候ならびに 排卵時期との関連

発情期の豚の頸管粘液中には極めて多数の好中球がみられる [22,77,79]。これらの所見は主として発情期におけるエストロゲン濃度が上昇する結果出現すると考えられる [23,24,33,34,72,85]。

筆者はこれらをたしかめるために発情期に起こる全身的（主に性腺ホルモンの動き）および局所的な諸変化（卵巢、外陰部徴候）を経時的に解析する必要があると考え、つぎのような実験計画を設定した。

すなわち、排卵現象を柱として中核に据え、その前後に起こる自然発情での発情期中の所見を重点的に取りあげた。

実験材料

供試豚は、ランドレース種と大ヨークシャー種との雑種6頭と、梅山系雑種1頭で、年齢は3, 4歳、産歴は4~6産、発情徴候は明瞭で、いずれも21日の正常発情周期を示しており、卵巢、外部徴候には臨床上、特に異常の認められない。

実験方法

すべての供試豚は発情開始時を中心におおむね14日間、外部徴候の検査をし、頸管粘液は毎日午前、午後採取し、好中球数を算定した。

供試豚のうち、4頭 (No.64, 67, 96, 108) は2回ずつ発情期を中心に外部徴候の変化と頸管粘液中の好中球数を観察した。他の3頭 (No. 84, 85, 88) を選び、交配を行い、このことは受精後の細胞分割から排卵時間帯を推定ができるために実施した。また、受精卵（卵細胞あるいは胚）の確認を行うために試験的開腹手術と解剖を実施した。その時、卵巢の検査所見は卵胞および黄体の状況とその数および卵胞破裂状況、内分泌学的検査として血中estradiol-17 β （以下E₂と略）およびProgesteroneを測定した。

以下、各検査項目について、それぞれの方法を記述する。

外部徴候の観察

雄許容反応、外陰部の検査：第1章と同様

頸管粘液中の好中球数の検査：第1章と同様

排卵確認のための試験的開腹手術

交配時間および交配回数：開腹手術および解剖予定の3頭は発情開始（雄許容反応確認）直後に第1回目、そして第2回目は12から24時間後に交配を行った。

排卵および受精卵の回収のための試験的開腹手術

過去の報告 [13,33,34,36,66,105] によると排卵は発情開始から、 31 ± 5.5 時間の範囲とされ、これを参考にして開腹手術を行った。

No.84は、発情開始後51時間55分に1回のみ開腹、No.85は、38時間51分と48時間23分の2回を開腹し、53時間40分経過した時点で解剖した。No.88は、発情開始後27時間15分と37時間50分の2回を開腹した。

開腹手術にあたり、前麻酔処置として [92,110]、塩酸ケタミンを体重1kg当たり10mgの割合で臀部筋肉に注射した。鎮静後保定し、切開部位は臍部から後方へ10cm離れた部位から最後乳頭の1つ手前の乳頭部までの正中線とした。腹腔から子宮、卵巢を引き出し、卵巢の大きさ、卵胞の数と大きさ、排卵点、黄体数とその大きさ、形状を検査した。

採卵の方法

加熱処理した豚血清を1%の割に加えた0.85%生理食塩液を38℃に加熱し、卵管子宮部から注入し、卵管采部をビーカーへ誘導し、流出液とともに卵細胞、胚を収集した。

卵子の検査

ビーカーで受容した液中の卵子を集め、実体顕微鏡で数および分割状況を検査した。

血中E₂およびP濃度の測定

豚頸静脈から血液10mlに対し、ヘパリンナトリウム加10ml容量の滅菌採血管に血液を注加した後、速やかに5℃に冷却し、3000rpm、15分間冷却遠心した。分離した血漿は-20℃以下で保存した。測定方法は、検体血漿0.1mlを直接測定用ポリプロピレンチューブに入れる。その後37℃で1時間感作後に測定用ポリプロピレンチューブ壁に固定されたE₂、およびP抗体にヨウ化E₂、およびPの被検体を一定時間競合反応させ、チューブのγカウンター値をシンチレーションカウンターで測定した。同時に標準検量曲線を作成して、その検量曲線から被検体のE₂とP値を検出した [11,28,37,68]。

白血球数の算定は第1章と同様

実験成績

正常発情を繰り返しているブタの発情期を中心に各2回、供試豚4頭（延べ8頭）について、その概要を記述する。

これらの供試豚は発情期およびその前後の期間中、連日頸管粘液中の好中球数を検査し、また、外部徴候も併せて検査した。

No.64

1回目、粘液中好中球数は発情開始日の3日前にやや上昇し、いったん下降後、発情前日に $350 \times 60 / \mu\text{l}$ と急に上昇し、翌日再び急激に減少し、以後その値を持続した。

雄許容と充血は発情開始前から発情開始翌日までの3日間、腫脹は発情開始前を中心に7日間みられた（図14）。

2回目、粘液中好中球数は発情前日に $350 \times 60 / \mu\text{l}$ と最高値を示し、発情開始日はやや下降し、以後低値を持続した。この2回の発情回帰の変化は発情徴候と好中球数の変化が極めて安定していた。

雄許容は発情開始日と翌日の2日間、充血は発情開始日を含めて4日間、腫脹は発情開始日を中心に7日間観察された。外部徴候の状況は、発情期の2回の変化については極めて似ていた（図14）。

No.67

1回目、粘液中好中球数は発情開始日に $450 \times 60 / \mu\text{l}$ と急上昇し、翌日下降、雄許容は発情開始日と翌日の2日間、充血および腫脹はそれぞれ発情開始日を含む6日間認められた（図15）。

2回目、粘液中好中球数は発情開始日のみ $450 \times 60 / \mu\text{l}$ と急上昇し、雄許容、充血、腫脹とも発情開始日をはさんで2から3日で終了した（図15）。この豚は、2回の発情期の外部徴候と好中球数の変動は極めて類似性が高い例であった。

No.96

1回目、粘液中好中球数は発情の4日前に1回、中程度の上昇が見られ一旦下降し、発情開始日に $1,400 \times 60 / \mu\text{l}$ と急上昇し、翌日にかけてやや減少し、2日目から3日目にかけて下降した。雄許容は発情日を含め2日間、

充血、腫脹は発情を中心に5日間認められた(図16)。

2回目、粘液中好中球数は発情開始翌日に $1.850 \times 60 / \mu\text{l}$ と上昇し、2から3日間持続した。雄許容、充血、腫脹も相応に認められた。2回の発情期の外部徴候変動は極めて似ていたが好中球数の変化は1日のずれであった。しかし、増数のピーク他の2頭より数倍であった(図16)。

No.108

1回目、粘液中好中球数は発情の4日前に1回、中程度の上昇がみられ一旦下降し、発情開始日から翌日にかけて $750 \times 60 / \mu\text{l}$ と急上昇し、2日目には下降した。雄許容反応は発情日を含め2日間、充血、腫脹は発情を中心に5日間認められた(図17)。

2回目、粘液中好中球数は発情開始翌日に $850 \times 60 / \mu\text{l}$ と最高値となり、2から3日間中程度の高値を維持した。雄許容反応、充血、腫脹と相応に認められた(図17)。2回の発情の変化は好中球数の出現は高く、そのピークは1峰性で発情開始後1日目に認められた。また、外部徴候については、発情開始前～後にかけてその反応性はきれいに一致していた。

以上について、4頭の豚の発情周期の発情日を中心として、2回各々についてその変化をみた。発情日の前2日、後1日位の間、特に頸管粘液中に多数の好中球が出現することが確認された。結果、頸管粘液中の好中球数は、外部徴候が顕著である発情開始日から発情開始日翌日に増数の変化が観察された。また、同一個体では、1回目と2回目の発情時に、同時に同程度の好中球数の増加をしましたもの(4頭中1頭)、異なる時間に異なった程度の増数ピークを示したもの(4頭中1頭)があることがわかった。後者の場合も、時間的ずれが24時間以内であった。

次に、頸管粘液中の好中球数の変動の関連性を検討するために卵巣と排卵時間そして卵細胞、分割胚の確認のための試験的開腹手術を行った。3頭については、1頭ずつ検査項目別の成績を中心に述べる。

No.84

交配は2回実施した。試験的開腹手術は発情開始後51時間55分経過した時点で実施した(表2)。

外部徴候は、すべての供試豚に認められた(図18)。

頸管粘液中の好中球数の変動

排卵時間帯およびその周辺での好中球数の変動は、排卵のほぼ0.5日前

(発情開始の0.5日後)には一過性の上昇、すなわち、 $1.040 \times 60 / \mu\text{l}$ がみられた。これと同程度のピークは発情開始前4日および2日にもみられ、さらに発情開始後1日目と発情開始後5～6日にもみられた(図18)。

発情開始前6日から2.5日の間の好中球数は、 $432 \pm 397 \times 60 / \mu\text{l}$ (平均値±標準偏差、以下省略)、発情開始前2日から発情開始後1.5日までの値は $491 \pm 298 \times 60 / \mu\text{l}$ 、発情開始後2日から8日目までは $579 \pm 358 \times 60 / \mu\text{l}$ であった。なお、表示はしなかったが、これら3者間に有意差は認められなかった(図18および19)。

卵巣所見

右卵巣には直径0.8cmの黄体4個、0.7cmのもの3個が認められた。左卵巣には直径0.8cmの黄体4個、0.7cmのもの2個が認められた。黄体はいずれも表面を鮮血色の血液凝固膜で覆われており、形成初期のものである。なお、卵胞は両卵巣に直径約0.5cmのものが20個ずつ認められた(表2)。

頸管粘液中の好中球数と血中白血球数との間に特に相関は認められなかった。

卵細胞の回収

卵管灌流の結果、左卵管から4細胞期胚と3個、3細胞期胚が2個、合計5個の細胞期卵が認められたが、右卵管からは発見できなかった(表2)。

血中E₂およびP濃度の変動

血中E₂濃度は、発情開始4日前、10.8 pg/ml、3日前、15.0 pg/mlと上昇し始めたが、発情開始前1日目から低下し、5.0 pg/mlの値が持続した(図19)。

血中P濃度は、発情開始前から発情開始日を通して低値で発情開始前1日目に1.0ng/mlでさらに発情開始日当日は3.0ng/mlと次第に上昇する傾向が認められた(図19)。

頸管粘液中の好中球数と血中E₂濃度と間に関連性が認められた。

No.85

交配は1回実施した。1回目の試験的開腹手術は発情開始後38時間51分、2回目は48時間23分に行い、解剖は発情開始後53時間40分に実施した(表3)。

外部徴候は、すべての供試豚に認められた(図20)。

頸管粘液中の好中球数の変動

好中球は発情期を含めて、それより前1週間にわたって採取した。その間、細胞数は1、2日間隔で3回のピークがあり、最後のピークは発情中に出現し、細胞数は $5.095 \times 60 / \mu\text{l}$ で最も高く、発情1週間前の細胞数を100として比べると9.86倍となり、増数ピークが排卵時間帯と一致した(図20)。

頸管粘液中の好中球数は、発情開始前5日から2.5日の間で $401 \pm 374 \times 60 / \mu\text{l}$ 、発情開始前2日から発情開始後1.5日の間では $1.388 \pm 1.850 \times 60 / \mu\text{l}$ であった。しかし、両者間に有意差は認められなかった。

頸管粘液中の好中球数と血中白血球数との間には、相関はみられなかった。

卵巣所見

第1回目手術時、右卵巣に直径1.0cmの卵胞が9個、左卵巣は直径1.0cmの卵胞5個が認められた(表3)。卵巣の状態から排卵はまだ行われていないと判定された。

第2回目の手術は第1回目の手術より各卵胞の増大がみられた。その後、許容開始から53時間40分後に解剖し、右卵巣に0.8cmの黄体が8個、左卵巣に0.6cmの黄体が5個存在し、鮮血色血液凝固義膜で覆われ、黄体形成初期と判定された。卵胞は右卵巣に0.6cmのもの1個が認められた。(表3)。

卵細胞の回収

すべて2細胞胚で右卵管から6個、左卵管から2個回収された。受精卵が2細胞胚に分化するまでの時間は、14~19時間とされているので、ここでは中間の16時間を採用すると、排卵時間帯は発情開始から26時間経過時と推定とした(表3)。

血中E₂およびP濃度の変動

血中E₂濃度は、発情の3日前から上昇し、発情開始前1日目に最高24.7pg/mlとなり、発情開始日には5.0pg/mlまで下降し、排卵時間帯前まで同値を持続した。

血中P濃度は、発情開始後1日目に0.5ng/mlから僅かである1.0ng/mlから1.3ng/mlとわずかに上昇した程度であった(図21)。

頸管粘液中の好中球数と血中E₂濃度との関係は低かった。

No. 88

交配は2回実施した。1回目の試験的開腹手術は発情開始後27時間15分、2回目のそれは37時間50分後に行った(表4)。外部徴候は、すべての

供試豚に認められた（図22）。

頸管粘液中の好中球数の変動

好中球は発情期の数日前から若干の増減を示しながら徐々に上昇し、発情開始後1.5日目に好中球数 $1755 \times 60 / \mu\text{l}$ と最高ピークとなった。この値は発情期数日前を100とすると、細胞増加率は16.3倍に相当するが、発情開始後2日目には減少した（図22）。

発情開始前5.5日から2日までの好中球数の集計結果は $256 \pm 160 \times 60 / \mu\text{l}$ 、発情開始前1.5日から発情開始後1.5日の間では $671 \pm 160 \times 60 / \mu\text{l}$ 、発情開始後3日から6日目の間では $501 \pm 181 \times 60 / \mu\text{l}$ となり、各々の間には有意差が認められた（ $P < 0.01$ ）（図22）。

卵巢所見

1回目試験的開腹手術では、右卵巢に直径1.0cmの卵胞が5個、左卵巢には1.0cmのもの4個、0.8cmのもの3個があり、排卵は認められなかった。

2回目の試験的開腹手術では、右卵巢に、直径1.0cm、0.6cm、0.5cmの卵胞がそれぞれ3、3、1個あり、黄体は9個認められた。左卵巢は1.0cm卵胞が5個、黄体9個が認められた。卵胞は頂点部の卵胞膜が極めて菲薄で、排卵直前の所見が見られ、退行黄体が認められた（表4）。

卵細胞の回収

右卵管から1個確認されたが、受精卵かどうか判定できなかった（表4）。

血中E₂およびP濃度の変動

血中E₂濃度は発情開始直後に最高値を示したが、ほかの2頭（No84,85）に比べて低値であった。血中P濃度は発情開始後1日目に 1.0ng/ml と僅かに上昇傾向がみられた（図23）。

頸管粘液中の好中球数と血中E₂濃度との関係は、（ $r = -0.582$ ）であった（図19）。

No.84、85、86の排卵時間帯と頸管粘液中の好中球数との関係を示した（図24）。排卵時間帯の前かその時間帯にほぼその変動が一致していた。さらに、これら3頭の血中steroid hormone濃度と排卵時間帯を示した（図25）。血中E₂濃度は、排卵時間帯に先行して1日から2日前に上昇した。血中P濃度は、発情開始前1日目および発情開始当日から徐々に低値ながら僅かに上昇変化に転じた（図24および25）。

考 察

供試豚4頭（延べ8頭）を用いて、発情周期を各2回、発情期を中心に発情開始前4日から7日目から発情開始後5日から7日目までの間を調べた。この供試豚は、発情期およびその前後の期間中、連日頸管粘液中の好中球数を測定し、外部徴候も併せて検査した。以上を総合すると、発情日を中心として、その前2日、後1日位の間、特に頸管粘液中に多数の好中球が出現することが確認された。結果、頸管粘液中の好中球数は、外部徴候が顕著となる発情開始日から発情開始日翌日に起こり、増数の観察される時間は1日から1日半以内であった。また、同一個体では、1回目と2回目の発情時に、同時間に同程度の好中球数の増加をしましたもの（4頭中1頭）、異なる時間に異なった程度増数ピークを示したもの（4頭中1頭）があることがわかった。また、外部徴候のうち雄許容反応、充血そしいて腫脹が頸管粘液中の好中球数の増数ピークとよく一致していた。このことは卵巣活動、すなはち卵胞からのエストロゲンの分泌ピークが発情開始前にきていることが示唆された。

今回、この4頭は、発情周期が規則的に回帰していたために頸管粘液中の好中球数の変動がきれいな増数ピークをしめした。このことは、内分泌的変動が安定し、さらに頸管粘液中の好中球数の増数的変動と従来報告のあるエストロゲン変動 [23-25, 33] とのずれが2から3日間あることが予測された。また、好中球の遊走現象の増数ピークとのずれが2から3日間のラグタイムのあることが示唆された。

次に、頸管粘液中の好中球数の変動の関連性を検討するために卵巣と排卵時間そして卵細胞、分割胚の確認のための試験的開腹手術を行った。3頭については、1頭ずつ検査項目別の成績を中心に述べる。

発情徴候は、血中E₂濃度の上昇によって起こる。E₂濃度は一般に卵胞顆粒層細胞から分泌されるが、排卵、黄体形成ともに、分泌が減少する。これらの変化を追及するには、この時期に形態的にも機能的にももっとも顕著な変化がみられる卵巣での排卵現象を中心として、これと連動する外部徴候の変化を合わせ検討した。

今回、筆者は、正確に排卵現象を観察するため、直腸検査のかわりに試験的開腹手術によって、卵巣、卵管を観察し、卵胞や黄体の所見から排卵の有無を直接確認した。さらに卵管から卵細胞を回収し、受精卵の細胞胚

分割を調べ、発情中に起こる内分泌学的変化、頸管粘液中の好中球数について時間的な変動について検討した。

その結果、E₂の血中濃度が上昇し始めるのは、排卵前3、4日頃からである [23,24,33,72,85]。関連して、血中E₂濃度の変動と発情時の外部徴候との関係について、2、3の検討結果を示すと、血中E₂濃度の上昇に続き、外陰部充血、腫脹、その他の外部徴候も顕著に強く発現する (図18, 20および22)。

一方、頸管粘液中の好中球数は、上述の外部徴候の発現と同調して増加することが確認され、血中E₂濃度と密接な関連性のあることが示唆された。また、頸管粘液中の好中球数が多数進出しているときの血中白血球の動態は例数が3例のため、はっきりした結論は無理であるが、増加傾向があるようでもあった (図19, 21および23)。

佐藤ら [73,74,75,77,79] は発情時に頸管粘膜上皮細胞間隙を、変形しながら表層面へ移動しつつある好中球を走査型電顕でとらえている。

Branscheedら [9] は発情期には頸管粘膜上皮の表層面が疎となり、下層から移動してくる好中球をはじめ、その他の遊走細胞の通過が容易となること、腔上皮でも同様の傾向がみられると述べている。

しかし、E₂が頸管に作用した結果、2次的にどのような変化が局所に誘発されるかは、好中球の遊走機序を解明することが重要と考えられる。

ラットで卵巣内肥満細胞が発情前期に増加して、発情期から発情後期にかけて脱顆粒を起こすが、この際に放出されたヒスタミンの作用として、血管透過性亢進や細胞内浮腫が生じるとの報告もみられる [21,55,56,81,]。

また、E₂により、腔部上皮細胞内および組織中にグリコーゲン、脂質、ヒスタミンなどの含有量が増加するとの報告もみられる [9]。

近時、妊娠中および分娩時、頸管部の熟化に関する所見で、間質の浮腫、毛細血管の拡張、組織の増殖、白血球浸潤、コラーゲン線維の解離が起こることが報告されている [57]。

Uchiyamaら [103] は頸管組織を培養し、特に妊娠末期の組織中には好中球遊走活性のある物質の存在を認めている。

一般に好中球の遊走は自己に対する防衛的目的が主と思われるが、交配時での微生物、あるいは、死滅精子の処理は合目的性の発現とも考えられる。また、頸管粘液中の好中球出現を炎症反応と関連させて、生理的炎症反応と

呼称しているが、共通項が存在するかもわからない [9] 。

いずれにしても、今回の試験で、排卵時刻の確認した根拠は、No.84は、4細胞胚までえの胚の分化する時間が約24時間とされているので、開腹した時刻から24時間さかのぼった時点が排卵のはじまりで、その時間は発情開始から約28時間とした。また、No.85は、排卵時間は発情開始から38時間で、No.88は、発情開始から37時間となった。今回の実験から、排卵時間帯は発情開始後26～38時間であることが確認できた [34,66,105]。また、頸管粘液中の好中球数の変動ピークが排卵時間帯より前に、また同時時間帯に重なったことで、仮に発情開始時刻を見落としたときでも、頸管粘液中の好中球の状態を観察することで交配適期を判定する一つの指針の根拠となることも確認できた (図24)。

Beckerら [8] もミニ豚の頸管粘液中の好中球を観察することで、同様の結論を得ている。

これらの結果は、発情に影響を与えるような実験的研究を評価する場合の対照となり、また、実用面での応用としては種付け適期やその回数を決める場合にも役立つものである。

第3章 疑似発情を誘起した卵巢摘出豚における頸管粘液中の好中球数および外部徴候の変化

第2章の結果から発情期における豚の頸管粘液中の好中球数の増数は、体内でのエストロゲンの増加が一つの誘因であることが示唆された。

本章では、そのことを検証するため、卵巢摘出豚に、エストロゲンとプロゲステロンの投与によって、頸管粘液中の好中球数の変動状態や外部徴候変化を観察し、自然発情豚と内分泌学的変化、頸管粘液中の好中球数、外部徴候について比較した。

実験材料

第2章の結果に基づき、卵巢除去豚における、エストロゲンやプロゲステロン投与の影響を解析した。エストロゲンとして、estrone(E1), estradiol-17 β (E2)、estriol(E3)およびProgesterone(P)を使用した。投与プログラムは次表の通りである。ホルモン投与量を表示した。

供試豚	E1 3日	E2 3日	E3 3日	E2 1回	P 3日	E2+P	E2 1回
#68	①	③					
#69	②	④					
#70			⑤		⑩		
#71			⑥		⑪		
#154				⑦		⑫	
#138				⑧		⑬	⑮
#164				⑨		⑭	
#108	自然発情豚						

①② 1.0,2.0,1.0mgの順で3日連続

③④ 2.0,4.0,2.0mgの順で3日連続

⑤⑥ 1.0,2.0,1.0mgの順で3日連続

⑦ 0.2mg ⑧ 0.5mg ⑨ 1.0mg

⑩⑪ 40mgを3日連続

⑫ E21.0mg投与前4日と1日、および投与後2,5,8日にP60mg

⑬ E20.8mg投与前4日と1日、および投与後2,5,8日にP140mg

⑭ E20.8mg投与前4日と1日、および投与後2,5,8日にP100mg

⑮ #108と比較のため1mgを投与

供試豚は、2～4歳（1～4産）のランドレース種と大ヨークシャー

種の雑種で、卵巣摘出したもの7頭 (No.68, 69, 70, 71, 138, 154, 164) と正常発情豚1頭 (No.108) を用いた。

供試ホルモンは、estrone (シグマCo, 以下E1略)、estradiol-17 β (デンカCo, 以下E2略) estriol (帝国臓器Co, 以下E3略)、progesterone (デンカCo, 以下P略) である。

実験方法

エストロゲンおよびプロゲステロンは単味あるいは両者を組み合わせて、投与量、投与回数にも変化をつけた。このことは、最も自然の発情状態の再現を確認することを目的とした。ホルモン投与方法は臀部筋肉内注射とした。

検査の対象項目は、頸管粘液中好中球数、血中E₂、P濃度、血中白血球数、外部徴候とした。同じ供試豚を再度試験する場合は1か月以上の間隔をおいて供試した。なお、頸管粘液中好中球数の検査法は第1章、血中E₂、Pの検査法は第2章と同様である。Eの投与量は、小動物に対する基準を体重換算した量を大体の目安としたが大中家畜の繁殖障害治療量も参考にした。

実験成績

A. E₁投与実験群 (表中①②として示した)

No.68

頸管粘液中の好中球数はE₁投与開始時 $5 \times 60 / \mu\text{l}$ であったが、4日目に $76 \times 60 / \mu\text{l}$ と急上昇し、5日目には復旧し、その後低値を維持した。雄許容反応は投与終了日以後3日間持続した。外陰部の充血と腫脹は好中球の上昇とほぼ同調した (図26)。

No.69

投与前日、頸管粘液中の好中球数は $45 \times 60 / \mu\text{l}$ とやや高値であったが、投与開始直後に一旦下降し、翌日より上昇しはじめ、8日目は $38 \times 60 / \mu\text{l}$ となったがその後、次第に下降し、12日目には $10 \times 60 / \mu\text{l}$ となった。

雄許容反応、外陰部の充血と腫脹は投与終了日より数日間認められた (図27)。

B. E₂投与実験群 (表中③④として示した)

No.68

投与開始後3日目までは、頸管粘液中の好中球数は、ほとんど変化なく、 $10 \times 60 / \mu\text{l}$ 前後であったが、8日目から急激な上昇が始まり、 $75 \times 60 / \mu\text{l}$ を示し、12、13日目で $160 \times 60 / \mu\text{l}$ となり、14日目に急下降し、投与前の値に戻った。翌日 $80 \times 60 / \mu\text{l}$ と上つたが、その後下降した。雄許容反応は4日目から13日目まで持続し、外陰部の充血と腫脹は3日目から17日目まで認められた (図28)。

No.69

投与開始後3日目までは頸管粘液中の好中球数は $5 \times 60 / \mu\text{l}$ であったが、7日目 $80 \times 60 / \mu\text{l}$ 、11日目に $70 \times 60 / \mu\text{l}$ と上昇がみられた。16日目に急激の $893 \times 60 / \mu\text{l}$ と顕著な上昇がみられたが、17日目には下降した。雄許容反応は4日目から13日目までみられ、外陰部の充血と腫脹は5日目から13日目まで認められた (図29)。

C. E₃投与実験群 (表中⑤⑥として示した)

No.70

投与開始日、頸管粘液中の好中球数は $5 \times 60 / \mu\text{l}$ であった。4日目 $40 \times 60 / \mu\text{l}$ と上昇、6日目には一旦下降したが、7日目に $45 \times 60 / \mu\text{l}$ と急上昇し、8日目以降は低値で推移した。雄許容反応は投与終了翌日から3日間認められ、外陰部の充血と腫脹は投与開始後3日目から4から5日間みられた (図30)。

No.71

頸管粘液中の好中球数は投与開始後5.5日目に $56 \times 60 / \mu\text{l}$ と上昇したが、次第に下降し、10日目で $14 \times 60 / \mu\text{l}$ となったが、翌日急上昇して $70 \times 60 / \mu\text{l}$ となり、翌日急下降した後復旧した。雄許容反応は4、5、6日目にみられ、外陰部の充血と腫脹は投与開始後3、4日目から4から5日間みられた (図31)。

D. E₂投与実験群 (表中⑦⑧⑨として示した)

No.154

0.2mg投与後、3日目に頸管粘液中の好中球数は $65 \times 60 / \mu\text{l}$ と一過性に上

昇し、翌日下降し、以後 $20 \times 60 / \mu\text{l}$ 前後で推移した。雄許容反応は3日目の1日だけ認められ、外陰部の充血と腫脹は投与後2～6日目の間認められた(図32)。

No.138

0.5mg投与後5日目、頸管粘液中の好中球数は $200 \times 60 / \mu\text{l}$ と急上昇し、8日目にはもとに戻った。雄許容反応は4～8日目の間、外陰部の充血と腫脹は投与後2～9日目の間認められ、好中球数の消長と同調した(図33)。

No.164

1.0mg投与後3日目、頸管粘液中の好中球数は $244 \times 60 / \mu\text{l}$ と上昇し、4日目に下降し、5日目には $550 \times 60 / \mu\text{l}$ と最高となり、翌日は下降した。雄許容反応は3～6日目の間、外陰部の充血は2から6日目の間、腫脹は8日目まで認められた(図34)。

E. P投与実験群 (表中⑩⑪として示した)

No.70

40mg3日間投与開始から10日連続観察したが、頸管粘液中の好中球数に変化はみられなかった。雄許容反応、外陰部の充血と腫脹は認められなかった(図35)。

No.71

40mg3日間投与開始から頸管粘液中の好中球数は $48 \times 60 / \mu\text{l}$ とやや高い値であったが一旦下降し、9日目に $70 \times 60 / \mu\text{l}$ となったが翌日は低値となった。雄許容反応、外陰部の充血と腫脹は認められなかった(図36)。

F. E₂・P併用投与実験群 (表中⑫⑬⑭として示した)

No.164

E₂ 1mg1回、P 60mg×5回投与として、E₂投与後4日目、頸管粘液中の好中球数は $382 \times 60 / \mu\text{l}$ と急上昇したが、翌日下降し、以後あまり増減なく推移した。雄許容反応、外陰部の充血と腫脹は認められなかった(図37)。

No.154

E₂ 0.8mg1回、P 140mg×5回投与として、E₂投与後5日目、頸管粘液中好中球数が $80 \times 60 / \mu\text{l}$ と上昇したが、7日目には下降した。雄許容反応、

外陰部の充血と腫脹は認められなかった（図38）。

No.138

E₂ 0.8mg 1回, P100 mg×5回投与として、E₂ 投与後6日目に頸管粘液中好中球数は $263 \times 60 / \mu\text{l}$ と顕著な上昇を示した。10日目には $15 \times 60 / \mu\text{l}$ に下降したが翌日 $248 \times 60 / \mu\text{l}$ まで上昇したがすぐに下降した。雄許容反応、外陰部の充血と腫脹は認められなかった（図39）。

G. 自然発情豚とE₂投与卵巢摘出豚との血中E₂濃度、白血球数および頸管粘液中の好中球数、外部徴候の比較

No.108（自然発情豚）（表中⑮とNo.108として示した）

発情開始後1日目に血中E₂は109pg/mlと急激な上昇がみられた。頸管粘液中の好中球は、発情開始4日前に $379 \times 60 / \mu\text{l}$ と一過性の上昇をみたがすぐ下降し、発情開始後、1および2日には、それぞれ $650, 705 \times 60 / \mu\text{l}$ と上昇した。

血中白血球数は $10.000 / \mu\text{l}$ 前後を持続し、顕著な動きはみられなかった。

血中E₂値は、発情前日54pg/ml、発情開始翌日には109pg/mlとなり、翌日は急下降した。雄許容反応はから2日間認められ、外陰部の充血、腫脹は発情開始日の前後4, 5日間は発情開始認められた（図40）。

No.138（卵巢摘出豚）

E₂ 1mgを投与した。血中E₂値は投与翌日48.7pg/mlであったが、2日、3日、4日目には、それぞれ317, 337, 357pg/mlとなり、5日目は急下降し、以後低値を持続した。頸管粘液中好中球はE₂投与後3日目に $305 \times 60 / \mu\text{l}$ となったが一旦下降し、5日目には $540 \times 60 / \mu\text{l}$ と最高値を示した。しかし、翌日には急下降し、以後50から $100 \times 60 / \mu\text{l}$ 前後で推移した。血中白血球数は観察期間中5.000から $8.000 / \mu\text{l}$ で、顕著な変化はみられなかった。

なお、臨床的な発情様徴候は、E₂投与後3日目に出現し、雄許容反応、外陰部の充血と腫脹は発情様徴候出現日から数日間認められた（図41）。

考 察

この実験は、頸管粘液中の好中球数の出現はエストロゲンに依存するかどうかを確認のために実施した。

生体内に存在するエストロゲンの内のE₁, E₂, E₃を投与した。発情時に卵胞内膜から分泌されるのはE₂が主体で、雌に対して生理的反応のうち発情誘起効果はE₁, E₃に比べて数倍である [19,24,45]。

一方、E₁, E₃は、副生殖器の中で頸管部組織の血管拡張作用や、血液循環を盛んにし、それらの細胞の増殖、粘液分泌を刺激するといわれている [19,24]。そのため、前述の3種のを別々に卵巢摘出豚に投与して、頸管粘液中の好中球数の変動、発情徴候発現に対する影響を観察した。さらに自然発情では、Pの介在も発情徴候に関連する [105]、E₂とPとの併用投与も行なった。

E₁は3日間総投与量 4.0mg、E₂は3日間総投与量 8.0mg、E₃は3日間総投与量 4.0mg、E₂は1回投与量0.2、0.5、1.0mgを投与した。

その結果、E₂投与では自然発情と同程度の頸管粘液中の好中球数および外部徴候がみられた。

一方、E₁、E₃投与では、E₂と同質の所見はみられたが、反応の程度はかなり低かった（投与量の差も関係があるかもわからない）。

卵巢摘出豚へのE₂投与では、自然発情と同程度の反応がみられたので、E₂投与豚と自然発情豚の血中E₂濃度を比較した。自然発情豚は発情開始1日後109pg/mlで最高値を示したが（図40）、E₂ 1.0mg投与では最高357pg/mlとなった（図41）。しかし、筆者はE₂の作用閾値は自然発情と同等の再現が有ることを一応の目安とした。その結果、自然発情により近い投与適量は、今回の投与試験の結果からE₂ 0.5mgから1.0mgの1回筋肉内投与でよいことが確認できた。

しかし、E₂投与豚は、頸管粘液中の好中球数の出現や雄許容反応、外陰部所見が自然発情に比べて長く持続した。このことは、自然発情豚では卵胞からのE₂が速やかに血流に移行する機構が存在している [33,34]。しかし、E₂投与したE₂は溶解しにくい構造の剤質を筋肉内注射しているので、短時間で血中に移行せず、ゆっくりと作用が続き（徐放的）、E₂効果が持続した結果であった。また血中E₂濃度の変化をみると明らかにE₂ 1.0mg投与した豚は自然発情の血中E₂濃度よりも約3倍も高い濃

度を維持し、しかも持続時間が長かった。自然発情豚との違いがここにあった。さらに、推測として血中P濃度の緩やかに上昇と高値持続し、そして急激な下降という変化を受けていない。血中E₂濃度の変化のみの影響が何らかの要因になっているとも考えられた。

E₂投与後、これにPを併用投与すると、雄許容反応や外陰部の発情徴候が抑制された。しかし、頸管粘液中の好中球数の変化はNo138、154、164はE₂・P併用投与を行なった。結果、E₂投与開始時から各々の個体の好中球数が4から5日目に増加ピークを形成する。しかし、それらの変化の反応性は、ピーク形成する時間帯や好中球数の数量の程度は個々の個体が持っている特有の共通した傾向が認められた。すなわち、好中球の出現が高く出現するものはその傾向が認められていた。しかし、頸管粘液中の好中球数の増数の抑制は、P投与の量的に依存性が高いことが示唆された。これらの結果から、雄許容反応の発現機構と頸管粘液中の好中球の出現とは異なった機構があることが示唆された。すなわち、雄許容反応はエストロゲン依存により大脳の性興奮中枢の支配に関連する上部刺激での反応と考えられ、また、発情時の頸管粘液中に好中球数の増数変動する現象や外陰部を取り巻く変化として充血と腫脹等の局所変化は局在（下部）反応と考えられた。

また、E₂投与後、血中の白血球数を測定したが、正常範囲の値であったことと、好中球数の解析が今回はしていないために断定はできないものの頸管粘液中の好中球数の増数は局所的な現象と考えられた。

以上の結果から、発情時に認められる頸管粘液中の好中球数の増数現象は、エストロゲンの存在が主体的に必須の条件でプロゲステロンはエストロゲンの効果を抑制的に作用することがほぼ確認できた。

第4章 自然発情および疑似発情豚の頸管部粘膜組織の形態学的変化

第1章から第3章までは、頸管粘液中に好中球が多数出現する時期は発情期と密接に関連し、エストロゲン濃度が上昇した後の低値の傾向と、プロゲステロン濃度が軽度上昇し始める時期に相当すること、また、卵巢摘出豚にエストロゲンを投与し、疑似発情を誘起させたときにも、自然発情時と似た頸管粘液中の好中球数の増加が生じ、プロゲステロンはこの現象を抑制することが明らかにした。次に、エストロゲンやプロゲステロン投与によって好中球の遊走を誘導させその時の組織の変化を解明するために、頸管部粘膜の組織学的解析を行った。この現象の機序や意義に少しでも接近できると考えたからである。

実験材料

供試豚は、正常豚1頭、卵巢摘出豚7頭、計8頭である。使用したエストロゲン（E₁、E₂、E₃）およびプロゲステロンは第3章に示したものと同様である。

実験方法

頸管部粘膜の第2皺襞部の一部を、子宮内膜バイオプシー器（鳥取大学式）で採取した〔44〕。採取片は10%ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋後、5 μ m程度に薄切した後、脱パラフィンをアルコールで実施し、HE染色を行った後、封入剤で封入を行なった。

頸管粘液は、試験期間中連日実施した。外部徴候はE₂投与群のNo.138, 154, 164の3頭について観察した。

正常豚（No.67）での試験

頸管粘膜採取は、発情開始前の4日目、発情開始日および発情開始後2、3、4日目の5回とした（表5）。

卵巢摘出豚での試験

エストロゲン（E₁、E₂、E₃）およびプロゲステロンをそれぞれ単味投与した。その要領はつぎのとおりである。

E投与

E₂ 1回投与 : No.138, 154, 164に、それぞれ1.0、0.8、1.0mg 投与した。

E₂ 連続3日投与 : No.68, 69, 70に、それぞれを3日連続投与、投与量はE₁、E₂、E₃ともに第1日目1.0mg、第2日目2.0mg、第3日目1.0mgである。

E投与豚の粘膜採取は、投与直前、投与後2, 3, 5, 7, 9日目に行った。

P投与

No.71 (卵巣摘出豚) に、日量40mg、3日連続、計120mgとし、粘膜採取は、投与開始前4日、投与日、ついで2, 3, 6日目に行った。

実験成績

頸管部粘膜組織像を検討し、また、組織像と併行して頸管粘液中の好中球の推移と一部供試豚についての外部徴候を記述した。

1. 外部徴候および頸管粘膜中好中球数の消長

この章で外部徴候を観察したのは、E₂ 1回投与を行ったNo.138、154、164の3頭である。3頭とも、ほぼ同様の経過を辿り、雄許容反応が出現するのは、E₂投与後3ないし4日目であり、4から5日間持続する。外陰部充血、腫脹は許容より1日早く出現し、充血は4から6日、腫脹は充血より2、3日長く観察された。粘液中の好中球数はE₂投与後3～5日後にピークを示し、1または2日後には下降した。この投与試験では頸管粘液中の好中球数の増数変動と組織中を遊走して粘膜表面に進出してきた結果と一致していた。(図64～66)。

2. 組織像の変化

上皮層、下織、粘膜固有層の3つを観察した。

自然発情豚 (No.67)

上皮層の厚さは発情開始4日前は5層程度であったが、発情開始2日目には20～25層となり、4日目には半減した。

変形細胞の上皮層への進入は発情当日からみられ、観察を打ち切った

4日目でも顕著であった。

下織の変形細胞の浸潤は発情前から認められ、発情後4日目でも明らかであった。血管の拡張も明瞭であった。

固有層では発情中、変形細胞の浸潤が強く、血管の拡張もみられ、組織の疎造化傾向も認められた（表5、図42～45）。

E₂投与卵巣摘出豚

E₂ 1回投与：No.138 (E₂ 1.0mg) ,154 (E₂ 0.8mg) ,164 (E₂ 1.0mg) の3頭は、ほぼ同様の反応がみられた。

上皮層の所見で、No.138はE₂投与日の2～3層から5日目には8～18層、No.154は7日目に10～20層、No.164は5日目に12～23層と最高を示した。細胞層の増加に伴い、組織の密度が疎になる傾向がみられた。その後、各豚とも細胞層の厚さは次第に減少した。

上皮層への変形細胞の進入は、No.138では2～5日目の間、No.154は9日目まで、No.164は7日目までみられた（表6～8）。上皮層で、細胞増殖（過形成状）の結果、乳頭状の像が認められるものも出現した（図53-3）。

下織の変化として、E₂投与前には細胞間隔にややゆとりがあったが、投与数日後には、細胞形態が扁平形から類円形、紡錘形に変化し、密度を増す現象が一般にみられた（表6～8）。

No.164では、5日目、変形細胞と円形細胞の顕著な集団がみられた（図53-2）。また、一般的な傾向として、空胞やのう胞の出現が比較的多く認められた。

血管構造の変化として、E₂投与直前から投与後3日目まで、円形、紡錘形を呈していた細胞は次第に扁平菲薄となり、血管内皮に密着し、貼りつくような状態となった。そのため、内腔の拡大、白血球の充満が認められた（図52-3）。また、変形細胞や円形細胞（リンパ球）が血管周囲に集積する像が多くみられた

（図49-1）。

固有層は当初変形細胞の浸潤や血管の拡張はなかったが、E₂投与後2日目（No.154,164）、5日目（No.138）に血管の拡張が顕著となり、白血球の集積が認められた（図47, 49-1）。個々の詳細な所見は表6～8、図46～53に記載されている。

E連続3日投与：

No.68 (E₁投与は、3日間総量4.0mg)、No.69 (E₂投与は、3日間総量4.0mg)、No.70 (E₃投与は、3日間総量4.0mg) の3頭は組織学的変化はほぼ同様の所見がみられたので、生理作用の強いE₂を投与したNo.69の成績を中心に記述する。

上皮層はE₂投与終了日には6~11層であり、それから2、3、6日目にはさらに重層化が進み肥厚した。それに併行して表層細胞の剥離が2日目から明瞭となった。

変形細胞の粘膜上皮層への進入はE₂投与終了後、2、3、6日目と次第に増加し、上皮細胞を押し上げるような所見も認められた。

また、この時期には下織と上皮基底膜との境界にも変形遊走細胞の集積が認められた (図55-1)。

下織と固有層の細胞間隔が広くなり、そこに存在する物質がHE染色で染め出された (図55-2)。

ほとんどの組織標本は、程度の差はあるが血管から遊走したと考えられる変形細胞の存在が確認された (図54~57)。なお、E₁、E₃をそれぞれ投与したNo.68、70でもNo.69と大差のない反応がみられ、E投与による下織の変化に呼応して、変形遊走細胞の動きが活発となり、上皮層部へ進行中と考えられる像が、ほとんどの標本で認められた (図58~60)。

P連続3日投与 (No.71) :

上皮層は菲薄で、影響をうけたと思われる所見はみられなかった。

粘膜下織、固有層は血管周囲に少数の細胞浸潤が認められたが、血管の拡張はなく、上皮層細胞の核周辺に空胞のあるものが若干観察された (図61~63)。

まとめとして、上皮層の細胞増殖、それと同時に粘膜全般にわたる血管の変化 (拡張、壁の菲薄ルーズ化)、変形細胞や円形細胞の血管内増加、血管から遊走した変形細胞の組織中増加、最終的にはこれらの細胞が上皮層表面に進出することが判明した (表5~8、図42~80)。

考 察

頸管部粘膜組織の周期的変化を形態学的に、生殖道組織の周期による変化や組織中の好中球の遊走状態を光顕、電顕で観察し、発情期に著明な動きのあることを報告した [10,69,73-77,79,87-89,91,94,98,99]。

丸山らも発情周期にともなう生殖道粘膜組織の形態的な推移を調べ、粘膜を形成している細胞層の発情期の変化について詳細に検討し、組織細胞の増殖像を認めている [60-63]。しかし、このような現象が起こるための始動的役割を演じる要因についてはふげんしていない。

今回、エストロゲンとプロゲステロン投与によって外部徴候および頸管粘液中の好中球数の変動は、第3章の結果とほぼ同じであった。E₂の1回投与では、投与後2日目から頸管粘膜上皮細胞層の増殖と変形好中球の遊走が組織中に認められ、血管拡張し、上皮細胞層の増殖は5日目をピークにその後減弱しはじめた。1.0mg投与の2頭は、E₂投与後9日目まで組織学的変化が続いて、変形細胞（好中球）の浸潤、血管内の白血球も明瞭に認められた。また、E₂の投与量を4倍に増量すると、投与後2日目に粘膜上皮細胞層の増殖が著明となった。その程度は、E₂の1回投与群や自然発情豚の変化を上回っていた。E₁およびE₃投与では組織の反応が1日程度遅れ頸管部組織の変化が最高となった。P投与では、頸管部組織の増殖変化が認められなかった。以上のことから結果として、E₂の投与の増量よつて生理的反應の増強が起きることは用量および血中E₂濃度に依存していることが示唆された。さらにエストロゲンの種類の異なりによって生理的反應の差異が生じることが確認できた。

最初に反応が出現する組織部位は、粘膜上皮細胞層が時間的に増殖し、その後、粘膜下織、固有層組織および血管系におよび、さらに遊走細胞や血管内白血球の充満や、そして肥厚した粘膜上皮細胞層の中を変形紐状になった白血球が認められる。肥厚した上皮細胞層の中に嚢胞が出現し、そこに白血球の集塊が認められた。これらの変化は、エストロゲンによつて生起され、この現象が丁度、発情期前後に生じ、その変化が頸管粘液中の好中球数の特異的変動と密接に関係していることが確認できた。

しかし、なぜそのような現象が起こるのか、その機序は解析していない。

一般に好中球の遊走と炎症とは関係が深く、この場合は誘引因子、いわゆるケミカルメディエーターの存在がその役割を持っている [9,10,20,22-27,29,30,43,96,100,102]。

発情時のエストロゲンの高濃度レベル、あるいはエストロゲンを投与した場合、それが直接生体に対して起炎的な反應を誘引する物質とは考

えずらい。しかも、生殖器系に限定される変化である。頸管粘膜組織の反応、すなわち、充血、腫脹、血管拡張、血管壁構成細胞の変形、血管内壁への好中球の接着などは炎症時と極めて類似した変化である [9,10,72,77,79,87]。発情期の生じた変化は、炎症時の変化と極めて類似性の高い変化であることが確認され、この現象を類炎症現象としてとらえた。今後、これらの現象を誘引するケミカルメディエーターの存在の解明と関連性についての課題が残されている。

なお、頸管粘膜組織中にHE染色で染まる無構造な物質が認められたが、その性格についても検討する必要がある (図55-3)。この変化は、WinnやBranscheidらの報告によると卵巣摘出豚にE₂Pを投与すると頸管部組織中のDNA量と含水量の増加するとしている。この変化がちょうどHE染色で赤桃色に広く染色された所である [9,110]。

第5章 頸管粘液中の好中球の遊走におよぼす

Indomethacin

および顆粒球コロニー形成刺激因子の効果

第2, 3, 4章の結果から排卵時期、血中エストロゲン（以下Eと略）とプロゲステロン（以下Pと略）濃度、および頸管粘液中の好中球数は密接に関係していることがはかった。これを基礎に、本章の実験を組み立てた。排卵制御に関連する物質としてProstaglandin（以下PGと略）が知られている。この物質は、また炎症現象と密接に関連している。PG合成抑制剤であるIndomethacin（以下Indと略）

[3,5,36,38,39,54,59,64,67]を投与し、頸管粘液中の好中球数と外部徴候、卵巢の観察と血中E₂、P濃度の変化をみた。さらに、E₂とIndを併用投与し、E₂による頸管粘液中の好中球数の増加が抑制されたか否か、E₂と顆粒球コロニー形成刺激因子（以下G-CSF以下と略）の併用投与による頸管粘液中の好中球数への影響を観察をした。

実験材料

供試豚は、体重230kg前後の2～4歳（1～4産）のランドレース種と大ヨークシャー種の雑種6頭および卵巢摘出した、体重85kg前後の梅山豚系雑種3頭である。

供試薬剤は、E₂（第3章と同様）、Ind（和光純薬Co）、G-CSF（塩野義製薬Co）である。

Ind投与試験

実験方法

1. 発情期前後の正常豚への投与

正常豚4頭に、体重1kgあたりInd日量3.0mg（1頭あたり日量690mg）を小麦粉に混ぜて投与した。投与開始時期は、次回発情予定日より逆算して、それぞれ下記のとおりである。

No.170（6日前より）

No.179, 707（3日前より）

No.29（1日前より）

投与日数は、4頭とも7日間とした。

No.631, 846の2頭には小麦粉のみを与え、Ind無投与群とした。

血中E₂およびP濃度は、Ind無投与群で発情開始前2日から発情開始後4日まで、Ind投与群では発情予定日前2日から発情予定日後4日まで連日測定した。

2. 卵巣摘出豚に対するIndとE₂の併用投与

梅山豚系種で体重85kgの卵巣摘出豚2頭 (No.196, 207) を用いた。

Indは体重1kgあたり3mg (1頭あたり日量255mg) とし、16日間連日経口投与した。

E₂はInd投与開始後2日目に1mgを筋注した。また、頸管部粘膜層を生検によって採取し、細胞組織学的検査を行った。

実験成績

1. 発情期前後の正常豚への投与

Ind投与群4頭 (No.170, 179, 707, 299) の発情予定日における頸管粘液中の好中球数の平均は $35 \times 60 / \mu\text{l}$ であった。No.29は発情開始4日前で $60 \times 60 / \mu\text{l}$ 、その後Ind投与期間を含め発情日から発情後15日間まで $40 \times 60 / \mu\text{l}$ 以上増加しなかった。No.170では、発情開始2日前に $15 \times 60 / \mu\text{l}$ 、発情開始1日前、発情開始後2および4日目にそれぞれ60、60、 $40 \times 60 / \mu\text{l}$ と僅かに増数したにすぎなかった。No.179は、発情開始2日前に $60 \times 60 / \mu\text{l}$ であったが、発情開始当日に $100 \times 60 / \mu\text{l}$ であった、それ以後は4日目まで $20 \times 60 / \mu\text{l}$ 前後で推移した。No.707は、発情開始2日前に $5 \times 60 / \mu\text{l}$ で、その後増数は認められなかった。すべての供試豚は、発情時のような急激な好中球数の増加はみられず、低値を持続した (図81)。また、雄許容反応も認められなかった。

他方、2頭のInd無投与群 (No.631, 846) は、それぞれ3回の発情期について観察した2頭のInd無投与群 (No.631, 846) では、発情前後にいずれも明らかな好中球数の上昇が認められた。

No.631では、発情開始前3日目平均が $25 \times 60 / \mu\text{l}$ 、1日前 $160 \times 60 / \mu\text{l}$ 、発情開始当日に最高の $230 \times 60 / \mu\text{l}$ となり、発情開始後1日目には $50 \times 60 / \mu\text{l}$ と急激に減少した。その後は $50 \times 60 / \mu\text{l}$ 以上にならなかった。

No.846もNo.631とほぼ同じような変動を示した。発情1回目および2回目の発情時には開始前1日目に、3回目では開始当日に明瞭な増数ピークが認められた(図82,83)。

Ind投与群中2頭(No.179,707)と無投与群2頭について血中E₂およびP濃度を測定した。Ind投与群No.707では発情予定2日前のE₂値が25pg/mlと高値を示したが、翌日には5 pg/mlと下降した。この例を除けば、E₂は5 pg/ml以下、Pは1 ng/ml以下で推移した(図90)。

Ind無投与群2頭のE₂値は、発情開始2日前それぞれ、10および11pg/mlであったが、翌日は以降は5 pg/ml前後で推移した。

P値は発情終了1または2日後から上昇し始め、4日目にはそれぞれ5および6 ng/mlとなった(図91)。

Ind投与群の卵巢には、無排卵性卵胞が認められ、黄体形成はなく、卵胞囊腫様所見を呈した。他方、Ind無投与群それは、卵胞発育、排卵、黄体形成が認められた。頸管粘液中の好中球数の変動や血中E₂、P濃度も、卵巢の順調な変化を反映していた(図82,83,91)。

2. 卵巢摘出豚に対するIndとE₂の併用投与

E₂投与時、No.196の頸管粘液中の好中球数は10×60/μlであった。6日目には250×60/μlと急上昇し最高値となった。翌日には110×60/μlとなり、その後ゆるやかに下降していった。

外陰部の充血、腫脹はE₂投与後3日目から始まり、12日間続いた。雄許容反応はE₂投与後4日目から4日間認められた。

組織学的には、E₂投与後2日目から上皮細胞層の増殖があり、8日目にはピークとなったが、13日目にはもとにもどった。

上皮細胞の剥離は8日目に中程度認められた。血管拡張はE₂投与後2日目に強かったが、次第に弱くなり、13日目には認められなかった。

粘膜下織および粘膜固有層の間質の疎性化はE₂投与後2日目に強く、8日から13日目にかけて弱くなり、もとの状態に戻った。

組織内変形細胞(好中球)はE₂投与前から多少認められたが、E₂投与後8日目には顕著に増加した。

こらは上皮細胞層、下織および粘膜固有層の間質の血管の変化が著明となった時期に一致して粘液中の好中球数の増加が認められた(図84)。

No.207の粘液中好中球数は、E₂投与当日10×60/μlであった。投与後6日目にやや上昇し、7日目にはさらに増加し120×60/μlとなった。しかし、それからさらに2日後には投与前のレベルにもどった。E₂投与後12日目から再度増加し始め、14日目に最高値の170×60/μlとなった(図85)。

外陰部の充血、腫脹はわずかにみられたが、雄許容反応は認められなかった。

粘膜上皮細胞層はE₂投与後2日目から中程度に増殖し、14日目に剥離がやや顕著となった。変形細胞(好中球)もこの時期増加している。

粘膜上皮細胞、粘膜下織および固有層間質の疎性化や血管拡張等の変化が現れる時期はまちまちで、反応の程度も低かった。頸管粘液中の好中球数の増加と組織内変形細胞(好中球)の動向は一致した時間帯があったが、それほど緊密ではなかった。

G-C-S-F投与実験

実験方法

梅山豚系種の卵巢摘出豚1頭(No.138延べ4頭)を用い、次の実験を行った。

1. 対照試験としてE₂ 1mg単味投与
2. E₂ 1mg、G-C-S-F 200 μg同時投与(当日を0日とする)翌日(1日目とする) G-C-S-F 200 μg再投与
3. E₂ 1mg投与後、2および3日後にG-C-S-F 200 μgずつ投与
4. E₂ 1mg投与後、3および4日目にG-C-S-F 200 μgずつ投与

E₂は臀部筋肉内注射、G-C-S-Fは1 ml滅菌水溶液とし臀部皮下に注射した。観察期間はE₂投与後2週間とし、各実験の間隔は、前実験終了後20日以上とした。

頸管粘液中の好中球数、雄許容反応、外陰部の充血、腫脹の有無について観察した。

実験成績

1. E₂単味投与の結果、3日目と5日目に好中球数が増加し、230それぞれ550×60/μlを示した。実験期間中の好中球数平均は141.5 ± 153.2×60/μlである。外陰部の充血、腫脹はE₂投与後3~7日目に顕著で、

雄許容反応も随伴した（図86）。

2. E₂とG-CSF投与後、好中球数は、4日目 $350 \times 60 / \mu\text{l}$ 、5日目 $220 \times 60 / \mu\text{l}$ 、6、7、8日目にはそれぞれ450、470、 $450 \times 60 / \mu\text{l}$ と継続的にピークを作った。9日目以降は減少した。実験期間中の好中球数の平均は、 $210.9 \pm 187.2 \times 60 / \mu\text{l}$ で、E₂単味投与時の平均値 $141.5 \times 60 / \mu\text{l}$ と比較すると49%増加した。その他の成績はE₂単味投与時のそれと、差はなかった（図87）。

3. E₂投与後2および3日後にG-CSF投与を投与したところ、好中球数は3から8日目に高くなった。実験期間中の好中球数の平均は $230.5 \pm 165.9 \times 60 / \mu\text{l}$ で、E₂単味投与時の平均値 $141.5 \times 60 / \mu\text{l}$ と比べる62%増加した。他の成績はE₂単味投与時と差はなかった（図88）。

4. E₂投与後3および4日後にG-CSF投与を投与すると、好中球数は3から7日目にそれぞれ200、350、450、150、 $50 \times 60 / \mu\text{l}$ となった。実験期間中の好中球数の平均は 155.6 ± 167.8 で、E₂単味投与時の平均値 $141.5 \times 60 / \mu\text{l}$ よりも10%増加した。雄許容はE₂投与後2~4日目の間認められた。外陰部の充血と腫脹は弱かった（図89）。

以上の結果から、E₂投与後のG-CSF投与が接近していると頸管粘液中の好中球数の増加は著しくなり、ピークを作る回数も増えることもわかった。

考 察

正常豚では卵巢周期に伴い、規則的なリズムで発情が発来する。この間、頸管部組織も前駆的感作を受けその感作に対応する生殖的適応変化が進行する。その一現象として発情期は、特に頸管粘液中の好中球の変化が、卵巢活動に伴う内分泌学的変化と極めて密接に関係していることを第2、3、4章を通して確認ができた。それらの結果から、卵胞発育と無排卵状態それに伴うエストロゲン・プロゲステロン合成の抑制が同時に可能な実験系として最も効果的であるIndomethacin投与試験を実施した。また、卵巢摘出豚にE₂投与とInd投与の併用投与によって、E₂投与による頸管粘液中の好中球数の増数変化を抑制する効果の確認試験を合わせ実施した。今回の結果からInd投与群とInd無投与群の間での反応は、外部徴候の反応として雄許容反応、外陰部の充血そして腫脹の変

化に差異が認められた。Ind投与群には発情徴候が全く認められなかった。さらに、頸管粘液中の好中球数の特徴的増数変化がなかった。これに反して、Ind無投与群は、発情が明瞭に2頭の実験豚に規則的に回帰した。外部徴候も発情開始3日間と頸管粘液中の好中球数の増数ピーク形成が特徴的であった。臨床的に直腸検査により、Ind無投与群では卵胞の発育と排卵そして黄体形成が認められた。内分泌学的には血中E₂濃度の発情開始4日前の高値から急激な減少と血中P濃度の緩やかな上昇という正常な卵胞の成熟そして排卵期の変化の反映が認められた。他方、Ind投与群は、卵胞発育が弱く、無排卵性閉鎖卵胞で黄体形成が認められない定型的な小型卵胞嚢腫であった。内分泌学的には血中E₂濃度の低値と血中P濃度の上昇もなく、正常な卵胞の成熟そして排卵期に認められる変化が全くなかった。山田らは、Ind投与による排卵抑制効果と内分泌学的変化について、血中プロゲステロン値の変動は排卵するものとほとんど差がないと報告している [113,114]。今回はInd投与群とは明らかにプロゲステロン値の変化に差が認められた。その違いについては明らかにできなかった。

卵巢摘出豚に、IndとE₂を併用し、PG抑制効果と頸管粘液中の好中球数の変動、好中球の組織内遊走および外部徴候の充血や腫脹に対する抑制効果を解析した。1頭は頸管粘液中の好中球数の増数ピークが1峰認められた。組織学的変化もE₂投与の影響が認められていた。特に、粘膜上皮細胞層の増殖が強く認められた。粘膜下織と固有層は遊走細胞の出現があった。しかし他の1頭では、E₂投与による組織学的変化が顕著に出なかった。頸管粘液中の好中球数の増数ピークは1つであったが、強くなかった。外部徴候は2頭とも強くなかった。外部徴候の出現が弱いしない要因は、Indの大量に連続投与によって、エストロゲン値の低濃度が雄許容反応に関与している大脳部の上部反応の興奮の抑制が示唆された。また、充血は血管系そして腫脹は細胞間質の変化の反映で、そこにPGの合成の抑制とエストロゲン値の低濃度という状況が関与している可能性が示唆された。

しかし、今回の実験の結果から、頸管粘液中の好中球の出現に関しては、PG合成の抑制 [26,36,38,67,82,108,113,114] がかかっているにもかかわらず好中球の遊走が大なり小なり認められたことは、PGとの

関連性が否定的であることが確認できた。

次に、G-CSFとE₂を併用投与した。G-CSFは好中球の産生を刺激し、さらに分泌促進、増数および遊走能の強化作用が認められている [6,40,90,101,102,104,113,114]。E₂単独投与に比べ、粘液中への好中球の遊走が強くみられ、また、増数期間が長く持続する傾向がみられた。また、G-CSFによる好中球の刺激時期によつて増数割合が変わることが確認できた。G-CSF投与は、好中球を活性化し、刺激したことを検証した。その結果、刺激されていることが確認ができた。

総括と結論

この実験は、発情期の豚の頸管粘液中の好中球数の増加が認められる。その現象の生理的意義と遊走機序の探求が主な目的であった。

全ての実験を通して外部徴候は発情期およびエストロゲン投与時に明瞭な雄許容反応と外陰部の充血と腫脹が明らかとなった。充血、腫脹は雄許容反応に先がけて認められた。また、雄許容反応は頸管粘液中の好中球数の増数ピークと共に出現した。

1、繁殖周期における頸管粘液中の好中球数の変化は、特に発情期と分娩後2日目から5日目までに特徴的な増数ピークが出現することが明らかになった。妊娠期は、しだいに低値になり妊娠中期から後期にかけて最も低値となった。これらの変化は、内分泌学的影響による可能性が示唆された。

2、発情期と排卵時期にともなう頸管粘液中の好中球数の変化を発情期前後を観察した。発情開始当日を中心に、前後1日の間に好中球数の増数ピークが認められ、その出現は1つのピークを形成する特徴的な変化を示した。

排卵時期は、交配後の胚の分割の確認と開腹手術による卵巢での排卵を確認し、推定排卵時間帯は発情開始後26～38時間となった。好中球数の増数変化は、これよりも1日前から排卵時間帯にちょうど重なることが認められた。内分泌的には血中E₂値が高値から低値に移行し、P値のゆるやかな増加に移ることが認められた。好中球数はE₂値ピーク出現後に1から2日後に特徴的変化があらわれ、特に血中E₂との関連が密接にあることが結論できた。

3、卵巢摘出豚へのE、P投与による頸管粘液中の好中球数の変動について解明した。

E₁、E₂、E₃およびPを使用して、その影響をみると、E₁、E₂、E₃は共に投与量の差異によって、頸管粘液中好中球数の増減の差異が認められた。しかし、E₂の0.5～1.0mg投与は最も自然発情に近い状況が再現できた。P投与は好中球数の増加作用はなかった。E₂とPの併用投与では、E₂の好中球増数効果をP投与量は増量すると抑制傾向を示した。また、E₂投与を増量すると好中球数は増加した。以上の結果から、発情時に認められる頸管粘液中好中球数の増数にはエストロゲン中、特にE₂の存在は不可欠であった。また、プロジェステロンはエストロゲンの作用を抑制する傾向が示された。

4.自然発情および疑似発情豚の頸管部粘液組織の形態学的変化について

は、頸管粘液中に好中球が多数出現する時期が排卵前期と密接に関連し、エストロゲン、プロゲステロン濃度の変化、卵巢摘出豚にエストロゲン投与し、疑似発情を誘起させ、自然発情豚と極めて似た頸管粘液中の好中球数の特徴的変化の再現ができた。そこで、好中球の遊走がどのような組織で変化するかを検討した。

エストロゲン投与では、粘膜上皮細胞増殖が2日目から開始され、粘膜下織に変形細胞（変形好中球）の侵入と粘膜基底膜直下に集まる。その後、粘膜上皮の細胞間を変形細胞（好中球）が遊走し通過現象が明らかに認められた。粘膜下織血管の拡張的变化も同調していた。その変化も5日位からしだいに激減した。しかし、E₂投与量を増加すると投与後9日目まで変化が継続していた。プロゲステロン投与では、エストロゲン投与による組織的变化がなかった。

以上の結果から、発情の主因はエストロゲンで粘液中の好中球は拡張した血管から遊走してくるものと推測された。しかし、エストロゲンが直接的であるかまた、介在因子が存在するかについては不明である。

5、頸管粘液中の好中球数の遊走におよぼすIndomethacinおよび顆粒球コロニー形成刺激因子の効果

Indomethacin（以下Indと略す）投与し、無発情無排卵による内分泌学的変化と頸管粘液中の好中球の変化は、血中E₂およびP値がInd無投与とは対照的に低いレベルを維持した。好中球数は発情日開始日にわずかな増数があった。また発情徴候および外部徴候の変化は認められなかった。IndとE₂の併用投与は頸管粘液中の好中球の変化はE₂投与3～4日目に好中球数の特徴的増数ピークが強く認められた。G-CSFとE₂投与による好中球数の変化についての効果は増数効果が6～7日目つづき明らかにE₂単味投与とは差異が認められた。

以上の一連の実験は、豚の発情に起因する頸管粘液中の好中球の増加現象を内分泌学機序について探求、解明することを目的として行った。その結果として、頸管部の好中球増加は血中E₂濃度と密接な関係が明確であった。また、血中E値が高くなると、多数の好中球が血管壁から頸管部組織中を移動する組織像が確認できた。

本論文の研究は、血中Eによる好中球の子宮頸管部組織への選択的移動を誘起する細胞生物学的機序の解明を確認した。また、この現象のケミカルメディエーターの解明は今後の大きな研究課題である。

移動を開始することを示唆する組織像を確認することができた。

本論文の研究は、血中Eによる好中球の子宮頸管部組織への選択的移動を誘起する細胞生物学的機序の解明を確認した。また、この現象のケミカルメデエーターの解明は今後の大きな研究課題である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導、御助言を賜った麻布大学 教授 小林好作 博士、名誉教授 大地隆温 博士、教授 舘 鄰 博士、教授 川上静夫 博士に心より厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Abul, F.Y. and Scott, R.B. 1969.
Glycogen in human peripheral blood leucocytes III effect of female hormones.
Scand.J.Haematol 6: 262-269.
- 2) Anderson, L.L., Adair, V., Stromer, M.h. and McDonald, W.G. 1983.
Relaxin production and release after hysterectomy in the pig.
Endocrinology 113: 677-689.
- 3) Ainsworth, L., Baker, B.D. and Armstrong, D.T. 1976.
Pre-ovulatory changes in follicular fluid prostaglandine levels in swine.
Prostaglandins 9: 915-918.
- 4) Ash, R.W. and Heap, R.B. 1975.
Oestrogen, progesterone and corticosteroid concentration in peripheral plasma of sows during pregnancy, parturition, lactation and after weaning.
J.Endocr 64: 141-154.
- 5) Ainsworth, L., Tsang, B.k., Marcus, G.J. and Downey, B.R. 1984.
Prostaglandin production by dispersed granulosa and theca.
Biol.Reprod 31: 115-121.
- 6) 笠倉新平.編集.1997
サイトカイン 第2版改訂: 日本医学館. 東京. 247-256.
- 7) Betteridge, K.J. and Raeside, J.I. 1982.
Investigation of cervical mucus as an indicator of ovarian activity in pigs.
J.Repro.Fertil 3: 410-421.
- 8) Becker, J., Sherwood, L.C., Fink, B.F. and Sadover, R.C. 1993.
Estrus detection by using vaginal cytologic examination in miniature swine.
Lab.Animal.sci 43: 597-602.

- 9) Branscheid, W. and Holtz, W. 1988.
Histochemical examination of the vaginal epithelium of sows at various stages of the estrus cycle.
Anat.Hist.Embryol 17: 12-26.
- 10) Bel, H.S. and Getty, R. 1972.
Vaginal histology of the domestic pig: Histomorphology from birth to 8 years with some clinical aspects.
J.Reprod.Fert 28: 1-7.
- 11) Carle, B.N. and Dewhirst, W.M.H. 1942.
A method for breeding swine.
J.Anim.Med.Assoc 101: 495-496.
- 12) Christie, D.W., Bailey, J.B. and Bell, E.T. 1972.
Classification of cell types in vaginal smears during the canine estrous cycle.
Biol.Vet.J 128: 301-310.
- 13) Dalin, A.M., Nanda, T., Hulten, F. and Einarsson, S. 1995.
Ovarian activity at naturaly attained estrous in the sow an ultrasonographic and LH study.
Acta.Vet.Scand 36: 377-382.
- 14) Davis, M.P. and Susan, M. 1976.
Leukocyte emigration and migration in the vagina following mating in the rabbit.
Anat.Rec 189: 45-60.
- 15) Elier, H. and Nalbandov, A.V. 1977.
Sex steroids in follicular fluid and blood plasma duling the estrous cycle of pigs.
Endocrinology 1 : 331-338.
- 16) Eldrige, R.W., Easter, R.A., Heaton, D.M., Oday, M.B., Peteroen, G.C., Shanks, R.D. and Sherwood, O.D. 1989.
Hormonal control of the cervix in pregnant gilt. I. Changes in the physical properties of the cervix correlate temporally with elevated serum levels of estrogen and relaxin.

Endocrinology 125: 2996-3003.

17) Evans, H.M. and Cole, H.H. 1931.

An introduction to the study of the estrous cycle in the dog.
Men. Univ. Califl : 65-103.

18) Folwer, E.H., Feldman, M.K. and Loeb, W.F. 1971.

Comparison of histologic features of ovarian and uterine fissures
with vaginal smears of the bitch.
Amer. J. Vet. Res 32: 327-334.

19) Guthrie, H.D., Henricks, D.M, and D.L, Handlin. 1972.

Plasma estrogen and progesterone and lutenizing hormone prior to
estrous and during early pregnancy in pigs.
Endocrinology 91: 675-67

20) 林 秀男. 1976.

炎症の生化学, 炎症と生体防御.
岩波書店. 東京: 24.

21) 林 基之. 1980.

卵巣, 基礎と臨床
金原出版. 東京 : 30, 126.

22) Haynes, N.B. 1971.

Changes in pig cervical mucus in relation to the estrus cycle.
J. Reprod. Fertil 27: 211-218.

23) Henricks, D.M., Guthrie, H.D. and Handlin, D.L. 1972.

Plasma estrogen, progesterone and LH levels during the estrus
cycle in pigs.
Biol. Reprod 6: 210-218.

24) Henricks, D.M., Guthrie, H.D. and Handlin, D.L. 1972.

Plasma estrogen, progesterone and LH prior to estrus and during
early pregnancy in pigs.
Endocrinology 91: 675-679.

25) Holness, D.H. and Hunter, R.H. 1975.

Postpartum oestrus in the sow in relation to the concentration of

- plasma oestrogens.
J. Reprod.Fertil 45: 15-20.
- 26) 姫野憲雄. 1986.
排卵時兔卵胞壁コラーゲン合成系に及ぼすプロスタグランジンの影響.
日内分泌会誌 62: 1181-1193.
- 27) 星 修三. 1977.
犬の繁殖生理 : 30-43.
- 28) Hoerlein, A.B., Hubbared, E.D. and Getty, R. 1951.
The procurement and handling of swain blood samples on the farm.
J.Amer.Vet.Assoc 119: 357-362.
- 29) 樋口 肇, 黒瀬 巖. 1995.
炎症時の細胞間接着反応とNO.
医学の歩み 179: 315-318.
- 30) Ito, A., Imada, K., Sato, T., Kudo, T., Matushima, K. and Nasi, T. 1994.
Supression of IL-8 production by progesterone in rabbit uterine cervix.
Biocem.J 301: 182-186.
- 31) 伊藤裕之, 工藤 篤, 丹羽太左衛門. 1944.
豚の発情に関する研究.
畜試報告 49: 1-51.
- 32) 岩本雅幸, 富塚常夫. 1975.
豚における発情の同期化(1).
畜産の研究 29: 1074-1078.
- 33) 岩村洋吉, 横木勇逸, 加茂前秀夫, 井上忠怒, 小笠 昇. 1986.
豚の性周期における性ホルモンの推移と発情, 排卵.
家畜繁殖会誌 32: 220.
- 34) 岩村洋吉. 1993.
豚卵胞発育、排卵における内分泌環境.
家畜診療 355: 5-20.
- 35) Jaroslay, K. and Chanining, C.P. 1972.

Stimulatory effects of LH, FSH and progesterone upon cycle
3,5-AMP levels in porcine granulosa cells.
Endocrinology 90: 1543-1550.

36) 清田明憲. 1984.

産婦人科領域とプロスタグランジン.
順天堂医学 30: 431-439.

37) 熊倉哲夫, 浪岡茂郎, 丹羽太左衛門, 笹原二郎. 1982.

豚病学 : 893-896.

38) 鹿取 信. 1984.

プロスタグランジンの細胞機能の調節因子.
順天堂医学 30: 403-410.

39) 呉 道明. 1981.

排卵におけるPGの意義.
日産婦会誌 32: 259-268.

40) Laham, N., Bishop, G.J., Ranson, C. and Brennedce, S. 1993.

IL-8 concentration in amniotic fluid and peripheral venous plasma
during human pregnancy and parturition.
Acta. Endocrinol 129: 220-224.

41) Lemman, A.D. 1986.

Diseases of Swine: 112. Iowa State University Press. USA.

42) Liptrap, R.M. and Cummings, E. 1991.

Steroid concentrations in follicular fluid of sows treated with
dexamethasone.
Anim. Reprod. Sci 26; 303-310.

43) Maraduy, E.E., Kanayama, N., Halin, A., Maehara, K. and Terao, T. 1996.

Stretching of fetal membranes increases the concentration of IL-8 and
collagenase activity.
Am. J. Obstet. Gynecol 174: 843-849.

44) 南 三郎. 1984.

性周期にともなうブタ生殖器の形態的, 機能的変化と野外臨床段階における応用.

南三郎学位論文より引用 138.

45) 森下育紀, 大浪洋二, 大沼秀夫. 1976.

豚の性周期に伴う末梢血中progesterone, Estrone, およびEstradiol-17 β の消長.
第81回日獣学会講演要旨集176.

46) Masuda, H., Anderson, L.L., Henricks, D.M. and Melampy, R.M. 1967.

Progesterone in ovarian venous plasma and corpora lutea of the pig.
Endocrinology 80: 240-246.

47) Mattner, P.E. 1966.

Differential leukocyte response to spermatozoa in the cervix and the uterus in ewes.
J.Reprod.Fert 18: 297-303.

48) Mckenzie, F.F. 1926.

The normal estrous cycle in the sow.
Missouri.Agr.Exp.Sta.Res.Bull 86: 1-41.

49) Michael, R.P. 1958.

Sexual behavior and the vaginal cycle in the cat.
Nature(London) 181: 567-568.

50) Mcdonald, L.E. 1975.

Veterinary endocrinology and report.
Philadelphia : 402.U.S.edition.

51) Mills, J.N., Valli, V.E. and Lumsden, J.H. 1979.

Cyclical changes of vaginal cytology in the cat.
Canad.Vet.J 20: 95-101.

52) Mowrer, R.T., Conti, P.A. and Rossow, C.F. 1975.

Vaginal cytology an approach to improvement of cat breeding.
Vet.Met.Small.Anima 70: 691-696.

53) 宮本 元, 石橋武彦, 中野 栄. 1986.

イノブタ雌性の生殖器の形態.
日畜産会誌 57: 712-717.

54) 森 崇英, 福岡正恒. 1992.

免疫系による卵巣機能調節.

日内分泌学誌 68: 1151-1157.

55) 森川博史, 岡崎武士, 岡村 均, 西村敏雄. 1976.

排卵家兎卵巣中ヒスタミンの動態.

日産婦会誌 28: 504-508.

56) 森川博史. 1979.

排卵機構におけるヒスタミンの役割について.

日不妊会誌 28: 159-164.

57) 森 陽. 1996.

子宮頸管熟化と細胞外マトリックス.

医学のあゆみ 177: 91-95.

58) 信永利馬, 中村勝美. 1968.

Wistar imamichi rat の性周期ならびにこれに伴う生理的諸現象に関する基礎的
検討. 腔垢像の連続的観察.

家畜繁殖会誌 14: 1-7.

59) 三橋直樹. 1979.

排卵周辺期における卵胞のPG生合成とその意義とindomesthacinによる排卵抑制
と卵胞のincubation.

日産婦会誌 33: 479-488.

60) 丸山淳一, 小山昭二郎, 丹羽太左衛門. 1974.

豚発情に関する研究. 1, 各生殖器官の粘膜上皮細胞層の検討.

日豚会誌 11: 235-241.

61) 丸山淳一. 1979.

Biopsyによる豚の妊娠診断.

日豚会誌 25: 5-8.

62) 丸山淳一, 木村 威, 宮原 強, 石井利男, 加藤良忠. 1982.

豚発情に関する研究. 5, 繁殖周期と卵巣周期における生殖器官の検討.

日豚会誌 19: 22-26.

63) 丸山淳一. 1983.

豚の性周期に伴う生殖器官の解剖組織学的研究.

- 日豚会誌 20: 109-111.
- 64) 中原達夫. 1977.
プロスタグランジンに関する最近の知見, とくに繁殖領域における2、3の問題について.
日畜会誌 48: 591-609.
- 65) Newberry, W.E. and Gier, H.T. 1952.
Determination of breeding time in the bitch from vaginal smears.
Vet. Med 47: 390-392.
- 66) Nissen, A.K., Soede, N.M., Hyttle, P.C., Schmidt, M. and Hoore, D. 1997.
The influence of time of insemination relative to time of ovulation on farrowing frequency and litter size in sows as investigated by ultrasonography.
Theriogenology 47: 1571-1582.
- 67) 岡村 均, 森川博史, 竹中 章, 矢島康雄, 神崎秀陽, 森本幸巳, 奥田雄治, 西村敏雄. 1980.
卵胞壁の形態と機能. 産婦人科「排卵誘発その理論と実際」
金原出版. 東京. No13: 23-41.
- 68) Pond, W.G. and Houpt, K.A. 1978.
The Biology of the pig.
Cornal University Press. USA : 192-204.
- 69) Rigby, J.P. 1967.
The cervix of the sow during estrus.
Vet. Rec 80: 672-675.
- 70) Robertson, H.A. and King, G.J. 1967.
Plasma concentration of progesterone, oesterone, oestradiol-17 β and oesterone sulfate in the at implantion, during pregnancy and at parturation.
J. Repro. Fert 40: 133-141.
- 71) 真田 武, 武石昌敬, 永富 靖, 津曲茂久, 北村才太郎, 中尾 剛, 常包 正. 1976.
膣の内分泌細胞診による豚の種付適期の診断に関する研究. 第1報
膣の内分泌診による受精結果について.
第82回 日獣学会講演要旨集 : 155.

- 72) 真田 武, 武石昌敬, 津曲茂久, 田村康博, 常包 正. 1976.
膣の内分泌細胞診による豚の種付適期の診断に関する研究. 第2報.
末梢血中estrone, estradiol-17 β およびprogesterone値の発情期における動態.
第82回 日獣学会講演要旨集 : 156.
- 73) 佐藤正光, 丹羽太左衛門. 1980.
雌の発情および妊娠に伴う膣スメア像の変化について.
日豚会誌 17: 71-73.
- 74) 佐藤正光, 正木淳二, 丹羽太左衛門. 1980.
雌豚の生殖道上皮細胞の走査型電子顕微鏡(SEM)による観察.
日豚会誌 17: 78-83.
- 75) 佐藤正光, 正木淳二, 丹羽太左衛門. 1981.
ブタの子宮上皮およびウシの子宮頸管上皮表面に出現する紐状物質の組織学的観察.
家畜繁殖会誌 27: 143-147.
- 76) 佐藤正光, 正木淳二. 1982.
発情休止期における豚生殖器上皮細胞の走査型電子顕微鏡による観察.
日豚会誌 19: 1-5.
- 77) 佐藤正光, 正木淳二, 丹羽太左衛門. 1986.
豚の膣上皮細胞層および膣内腔での好中球の形態学的観察.
日豚会誌 23: 117-125.
- 78) 佐藤正光. 1987.
豚の生殖器および分泌物の組織学的ならびに生化学的研究.
日豚会誌 28: 145-148.
- 79) Satou, M., Masaki, J. and Niwa, T. 1980.
Morphological observation on the fibrous materials in the gilts vagina.
Tohoku.J.Agric.Res 31: 1-8.
- 80) Satou, M., Masaki, J. 1981.
The ultrastructure of bovine cervical mucus under scanning
electron microscope.
Tohoku.J.Agric.Rec 32: 27-33.

- 81) 佐藤龍男. 1974.
性周期にともなうラット卵巢内の肥満細胞の態度.
日本不妊学誌 19: 287-291.
- 82) 佐藤和雄. 1979.
排卵におけるプロスタグランジンの意義.
日産婦会誌 31: 975-984.
- 83) 定免昌臣, 中尾敏彦, 角田修男, 河田啓一郎. 1980.
豚血清中progesteroneのEIA.
家畜繁殖会誌 26: 77-80.
- 84) Schutte, A.D. 1967.
Canine vaginal smear.
J. small Anima. Pract 8: 301-317.
- 85) Sheares, I.J., Purvis, K., Jenkin, G. and Haynes, N.B. 1982.
Peripheral plasma progesterone and Estradiol-17 β level before
and after puberty in gilts.
J. Reprod. Fertil 30: 347-360.
- 86) Stabenfeldt, G.H., Akins, E.L., Ewing, L.L. and Mosrissette, M.C. 1968
Peripheral plasma progesterone levels in pig during the oestrous
cycle.
J. Reprod > Fertil 20: 443-449.
- 87) 管沢武敬, 石井巖宏, 永松直義. 1982.
繁殖用雌豚の性器粘液中の細胞所見
家畜診療 224: 27-30.
- 88) 紫野正雄, 千田惣治, 川上静夫, 大地温隆. 1986.
卵巢囊腫発生豚の長期経過観察例.
日豚会誌 23: 211
- 89) Smith, J.C. and Nalbandov, A.V. 1958.
The role of hormones in the relaxation of the uterine portion of the
cervix in swine.
Am. J. Vet. Res 19: 15-18.

- 90) 央戸寛治. 1990.
腎不全患者の顆粒球減少症,免疫異常に対するG-CSFの効果.
透析療法 7: 1-6.
- 91) Sorokin, S.P. 1968.
Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian
lungs.
J.Cell.Sci 3: 207-230.
- 92) Thurmon, J.C., Nelson, D.R. and Christie, G.J. 1972.
Ketaminn anesthesia in swine.
J.A.Vet.M.A 160: 1325-1330.
- 93) 武田浩輝, 紫野正雄, 福岡秀雄, 田中英隆, 吉田晶徳, 豊浦雅次, 宮田幸雄. 1986.
豚子宮頸管部粘液スメア像の変化による交配適期の検討.
日豚会誌 23: 210.
- 94) 高橋 茂, 平尾和義. 1977.
豚の性周期における腔上皮細胞の組織的变化
酪農学園大学研究雑誌 7: 13-23.
- 95) 鈴木善祐 編集. 1988.
新家畜繁殖学: 朝倉書店. 東京. 11.122
- 96) 玉谷卓也. 1995.
好中球の接着分子, セレクチン接着分子のリガンド.
医学のあゆみ 174: 18-21.
- 97) Tsutsui, T. 1975.
Studies on the reproduction in the dog, 3. observations of vaginal smear
in estrous cycle.
Jap.J.Anim.Reprod 21: 37-42.
- 98) 津村 巖, 佐々木博一, 南 三郎, 松浪俊郎, 平山正通, 黒坂正光. 1982.
子豚の子宮頸管に関する肉眼的および組織的研究.
家畜繁殖会誌 28: 128-131.
- 99) 津村 巖, 佐々木博一, 南 三郎, 松浪俊郎, 平山正通, 黒坂正光, 野並耕志. 1981.
豚子宮頸管の硬直に関する研究.

家畜繁殖会誌 27: 65-74.

100) 上田重晴 編集. 1988.

感染と炎症, 生体防御機構1.

新医科学大系: 中山書店. 東京. 217-232

101) 梅咲直彦, 川端政実, 深山雅人, 段 志憲, 須川 信. 1990.

脱落組織におけるG-CSF産生能.

医学のあゆみ 155: 135-136.

102) 梅咲直彦, 段 志憲, 深山雅人, 川端政実, 須川 信. 1991.

毛細胞の増殖と分化に与えるG-CSFの影響.

医学のあゆみ 157: 381-382.

103) Uchiyama, T., Ito, A., Ikesue, A., Nakagawa, H. and Mori, Y. 1992.

Chemotactic factor in the pregnant rabbit uterine cervix.

Am.J.Obstet.Gynecol 167: 1417-1422.

104) Watari, K., Asano, S. and Shirajuji, N. 1989.

Serum G-CSF levels in healthy volunteers and patients with various disorders as estimated by enzyme immunoassay.

Blood 73: 117-122.

105) 吉田重雄, 正木淳二, 入谷 明 翻訳. ハーフエッツ著者 5版. 1987.

家畜繁殖学: 185, 535.

106) Waston, J. and Wigglesworth, C.E. 1975.

Progesterone synthesis by pig corpus luteum tissue during superfusion.

Biochem.J 150: 301-304.

107) Watson, J. and Patek, C.E. 1979.

Steroid and prostaglandin secretion by the corpus luteum, endometrium and embryos of cyclic and pregnant pigs.

J.Endocrinol 82: 425-428.

108) Weiner, R. and Kaley, G. 1972.

Lysosomal fragility induced by prostaglandin F₂.

Nature New Biol 236: 46.

- 109) Wilson, K.M. 1926.
Histological changes in the vaginal mucous of the sow in relation to the estrous cycle.
Am.J.Anat 37: 417-431.
- 110) Winn, R.J., Baker, M.D. and Sherwood, O.D. 1994.
Individual and combined effects of relaxin, estrogen and progesterone in ovariectomized of the cervix.
Endocrinology 135: 1241-1249.
- 111) Witisk, E. 1967.
The use of vaginal smears to determine ovulation in the bitch.
Vet. Med 62: 859-879.
- 112) Yanagimati, R. and Chang, M.C. 1963.
Infiltration of leucocytes into the uterine lumen of golden hamster during the estrous cycle and following mating.
J.Reprod.Fertil 5:389-396.
- 113) Yamada, Y., Kawai, Y. and Watanabe, S. 1984.
Changes in concentrations of PG and sex steroids around the time of induced ovulation in prepuberal gilts.
Jpn.J.Vet.Sci 45: 677-685.
- 114) 山田 豊, 河井康夫. 1984.
未成熟豚における排卵誘起時の性ステロイドおよびPGの動態.
日豚会誌 34: 157-161.
- 115) Zupp, B.A. 1924.
Studies of the Oestral flow of the pigs.
Anat.Rec 27: 224-225.

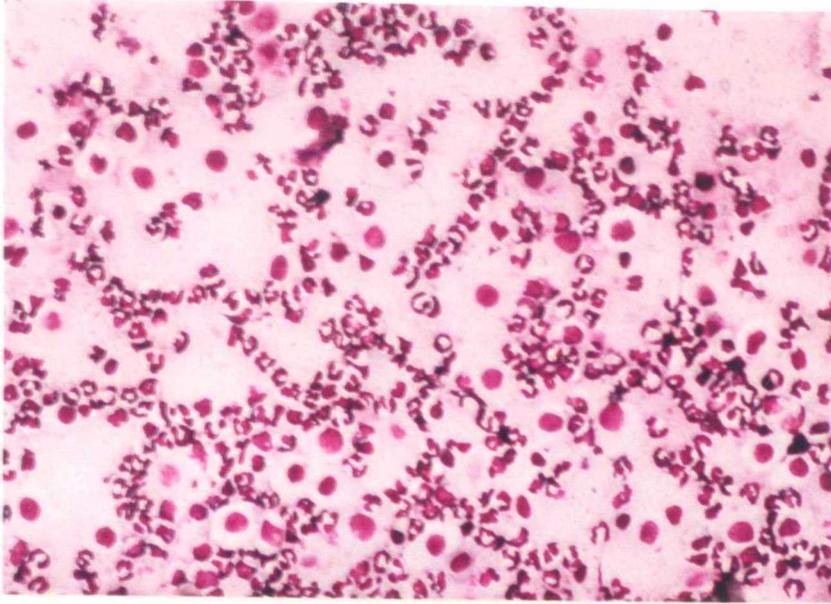


図1. 子宮頸管粘液の直接塗抹標本
発情期：上皮細胞/好中球（10%/90%）
ギムザ染色、×100

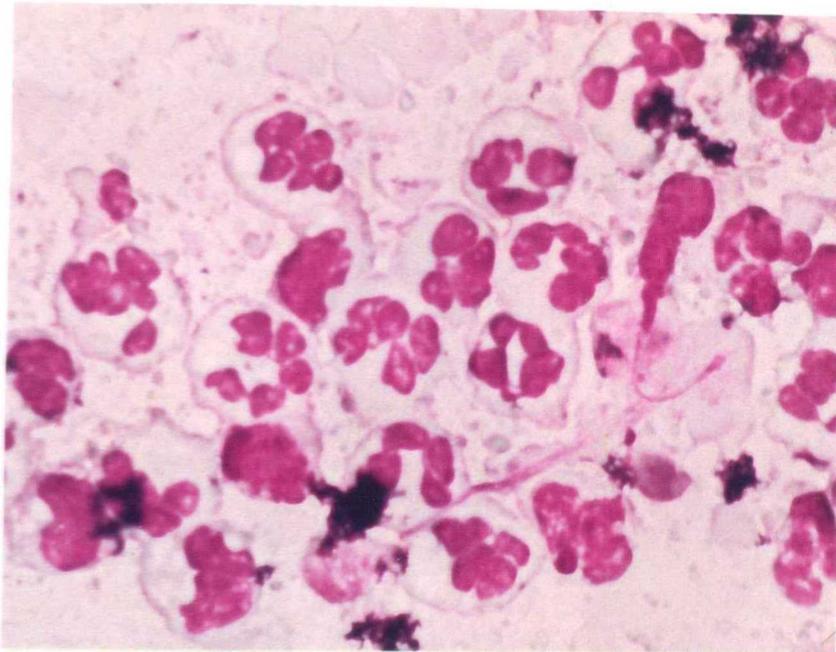


図2. 子宮頸管粘液の直接塗抹標本
発情末期：分葉核好中球
ギムザ染色、×400



図3. 外陰部所見
発情開始直前：充血、腫脹やや出現粘液分泌
は認められない。

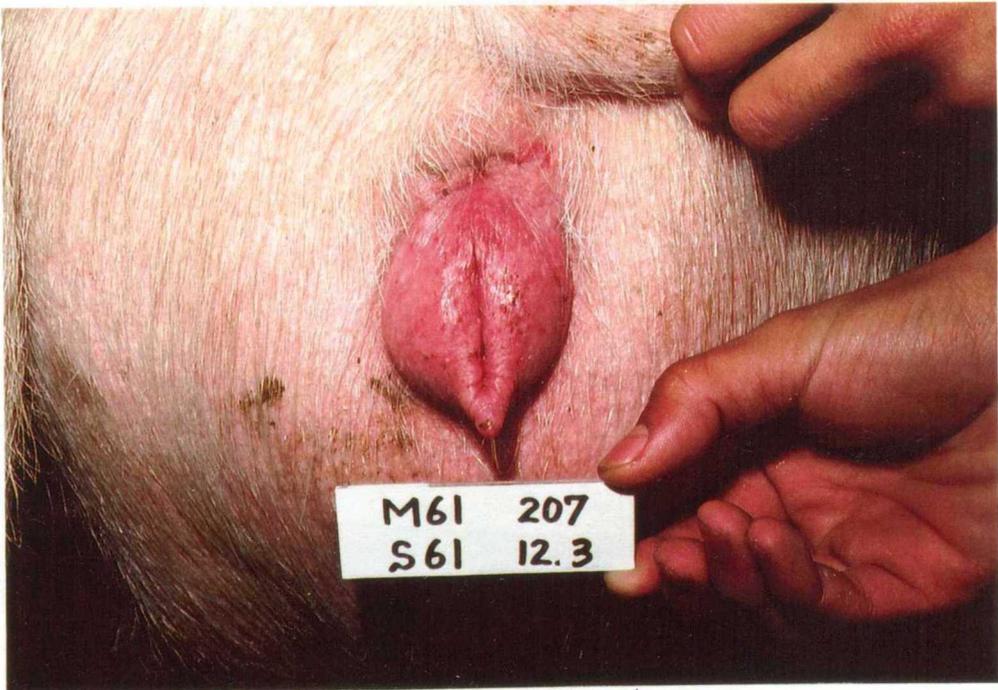


図4 .外陰部所見
発情初期：充血、腫脹が強度で粘稠分泌液がみられる。

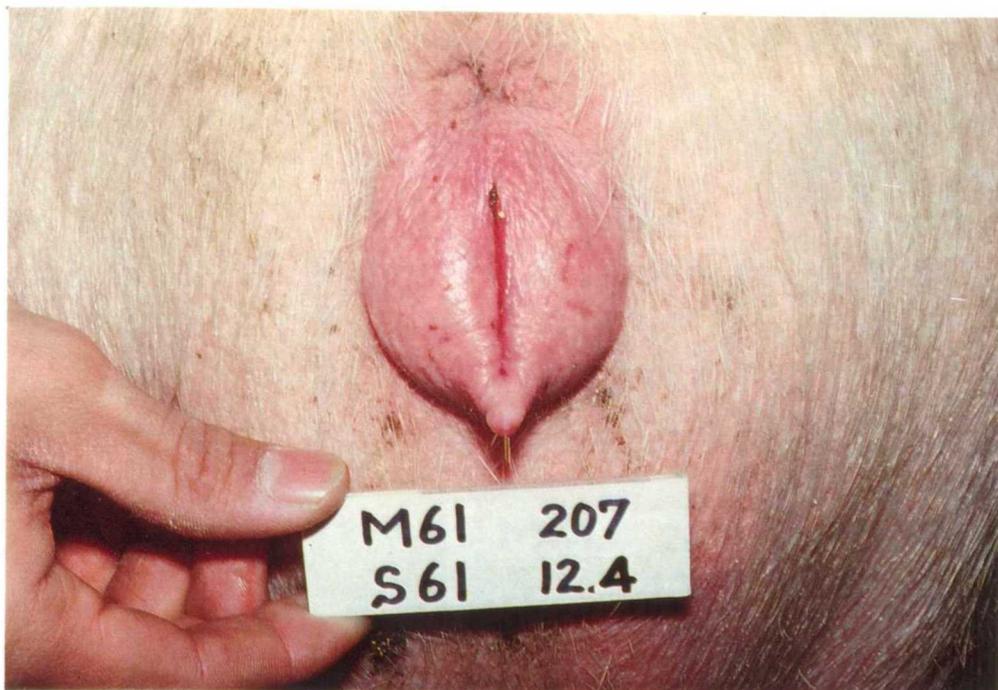


図5 .外陰部所見

発情中期：充血、腫脹がさらに顕著となり、粘液分泌が旺盛に認められる。



図6. 外陰部所見

発情末期：充血、腫脹がやや消退し、のり状粘液がみられる。



図7 .外陰部所見

非発情期：充血、腫脹はなく、粘液もみられない。



図8. 子宮頸管部粘液採取（外套管挿入中）

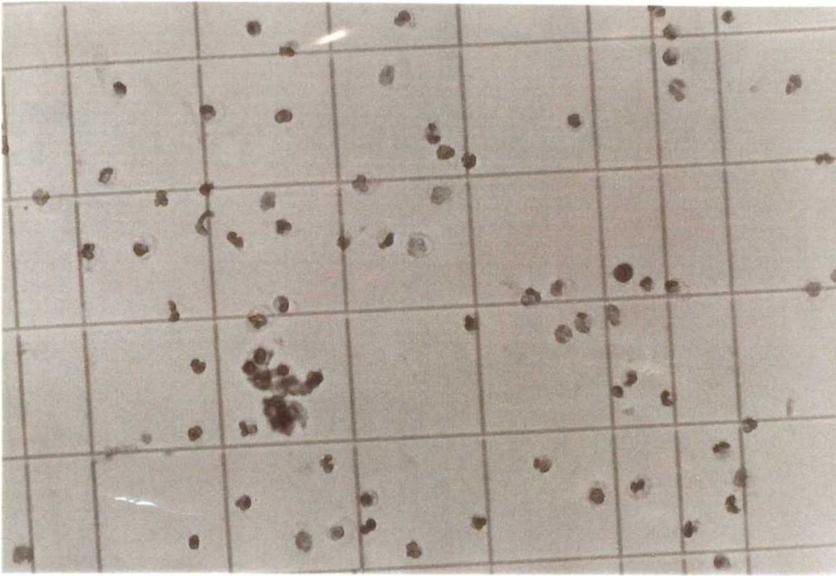


図9 .Thoma血球計算板による頸管粘液中の細胞数算定時の鏡検像 (×200)

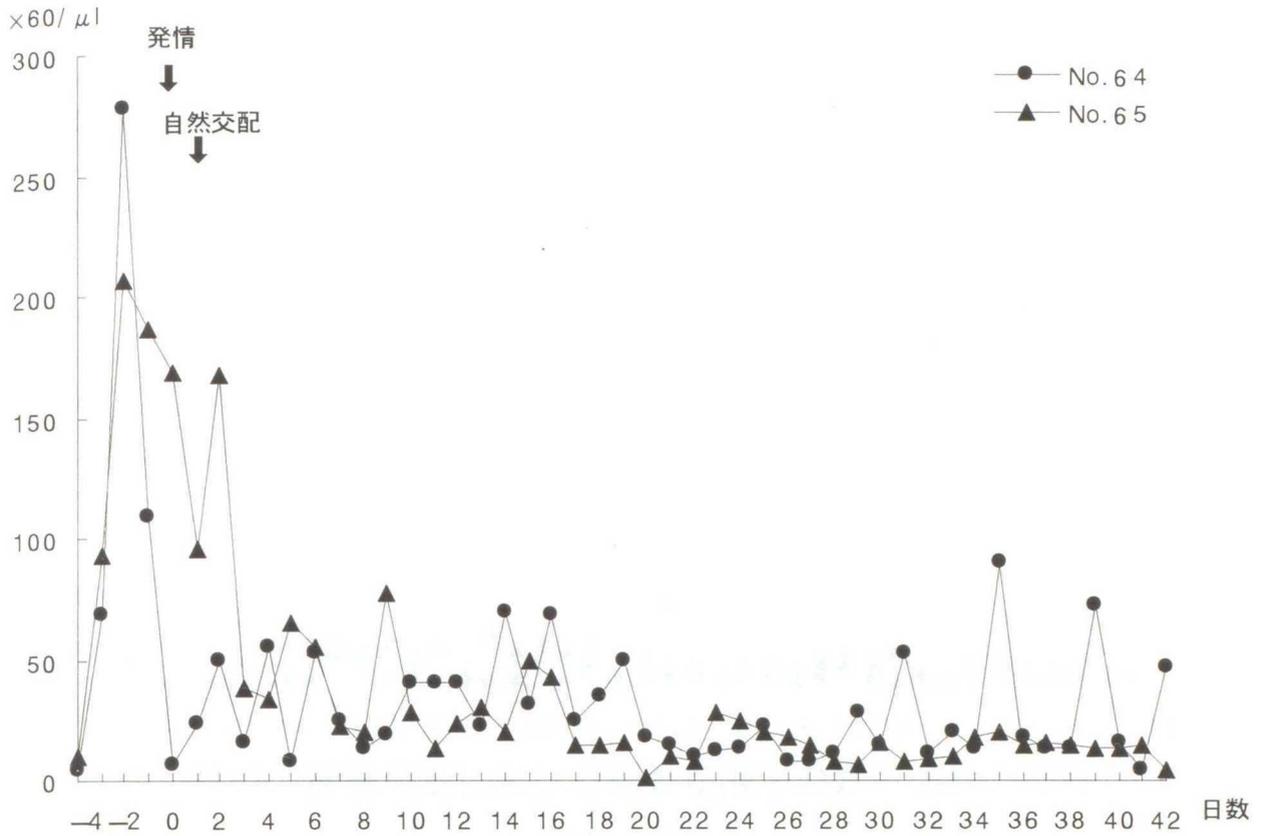


図10. 繁殖周期における頸管粘液中の好中球数の推移

発情期・交配・妊娠初期

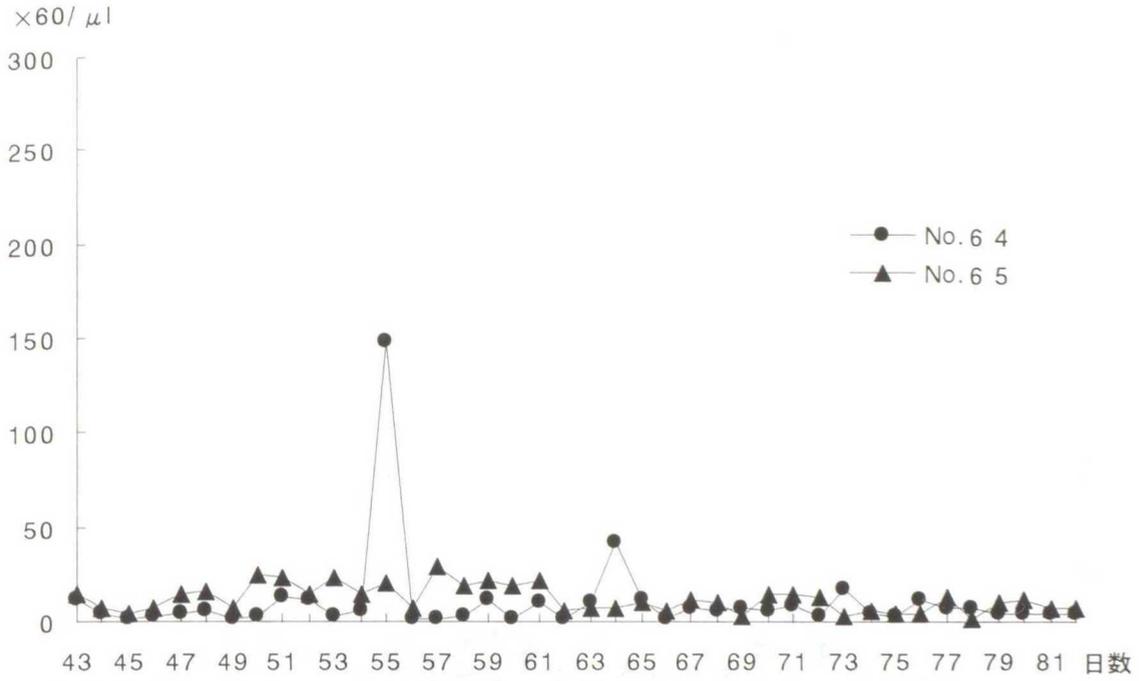


図11. 繁殖周期における頸管粘液中の好中球数の推移

妊娠中期

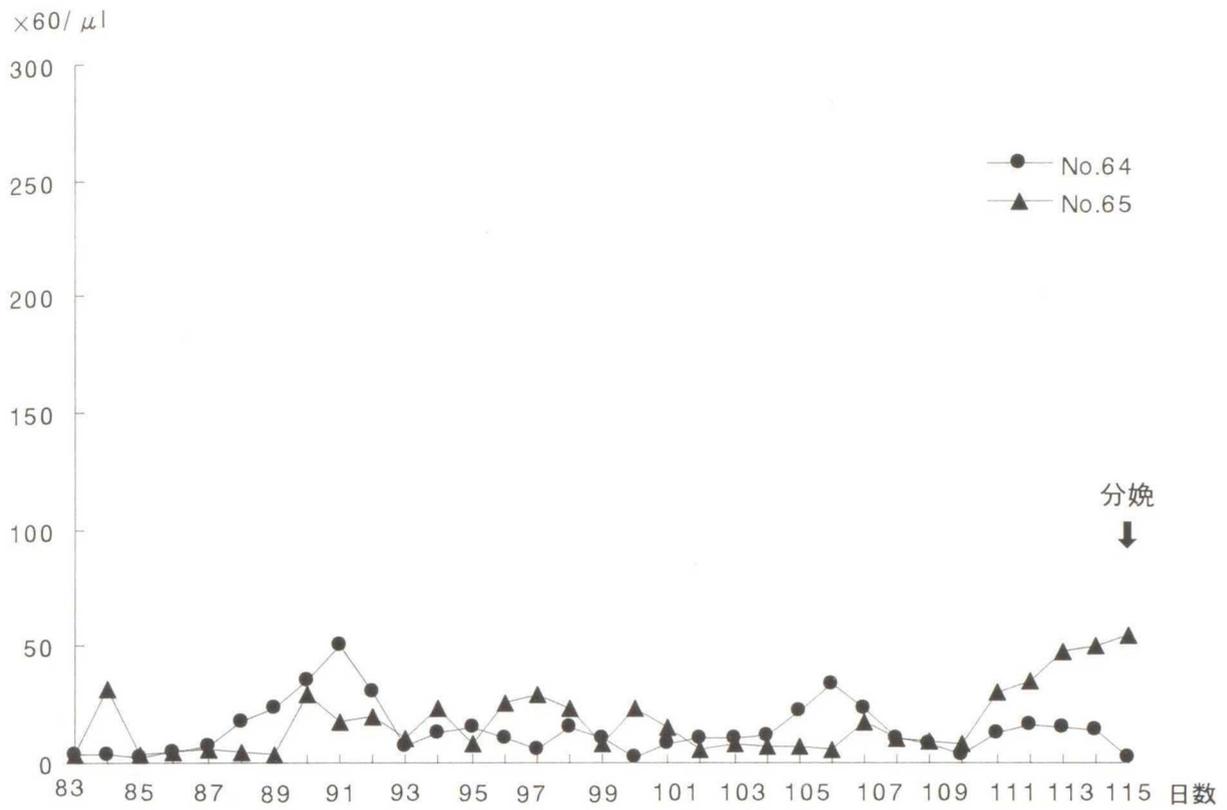


図12. 繁殖周期における頸管粘液中の好中球数の推移

妊娠後期・分娩期

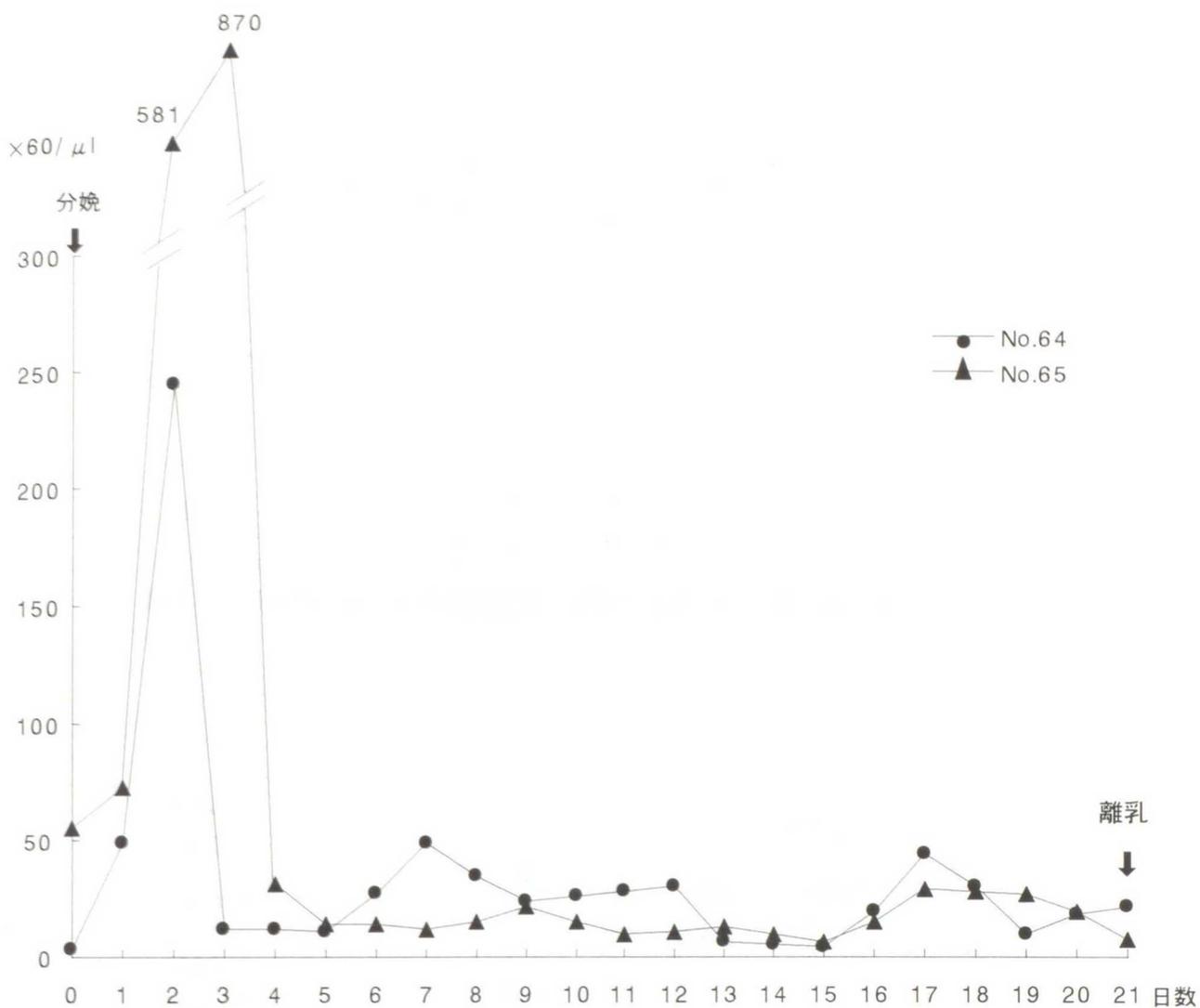


図13. 繁殖周期における頸管粘液中の好中球数の推移

分娩期・授乳期

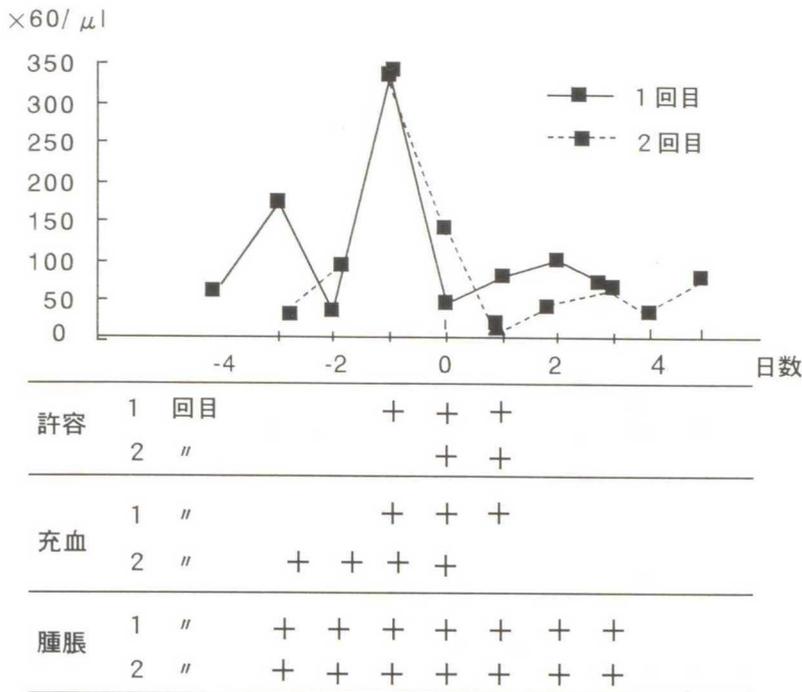
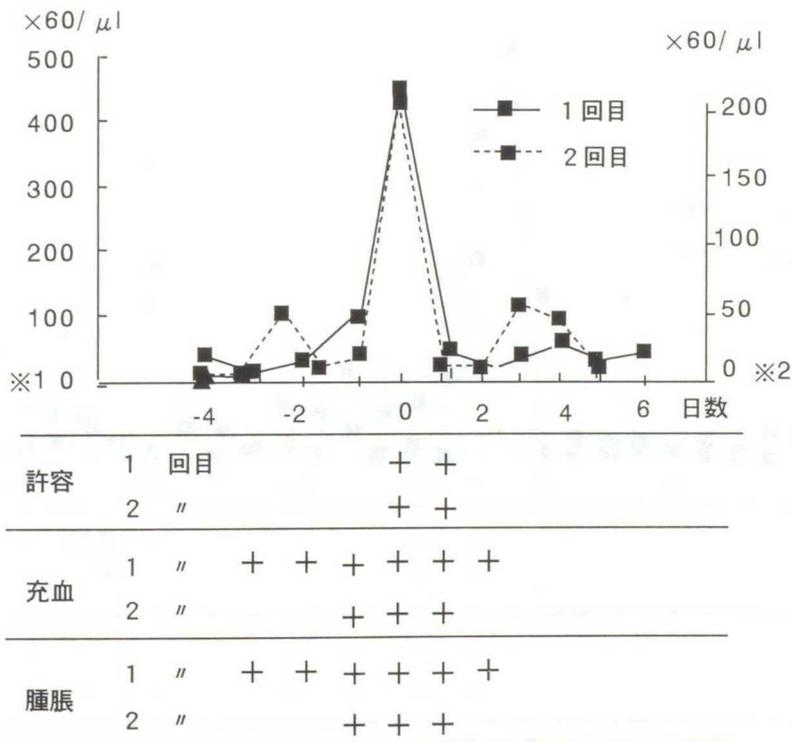
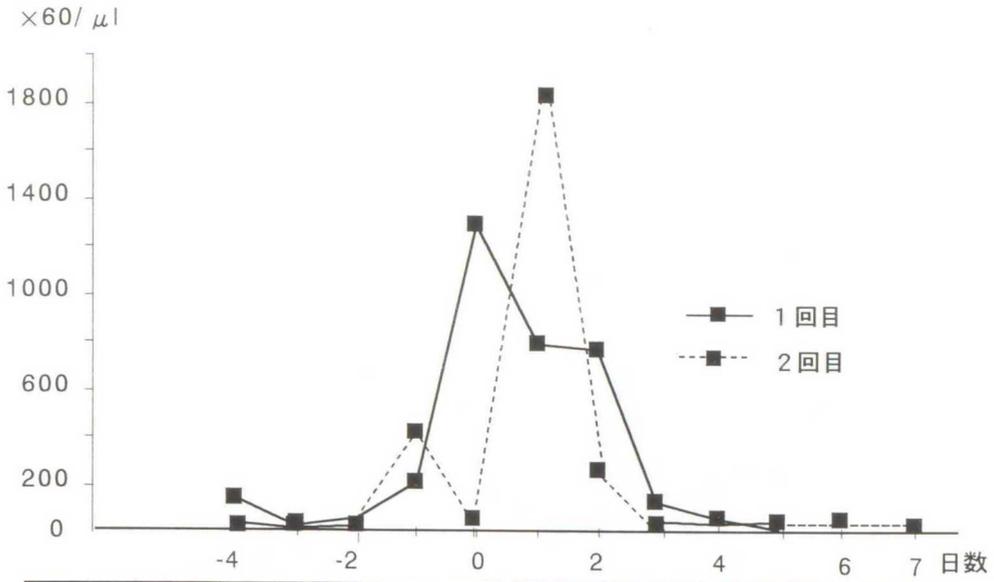


図14. No.64 の2回目の発情期前後の頸管粘液中好中球数と外部徴候



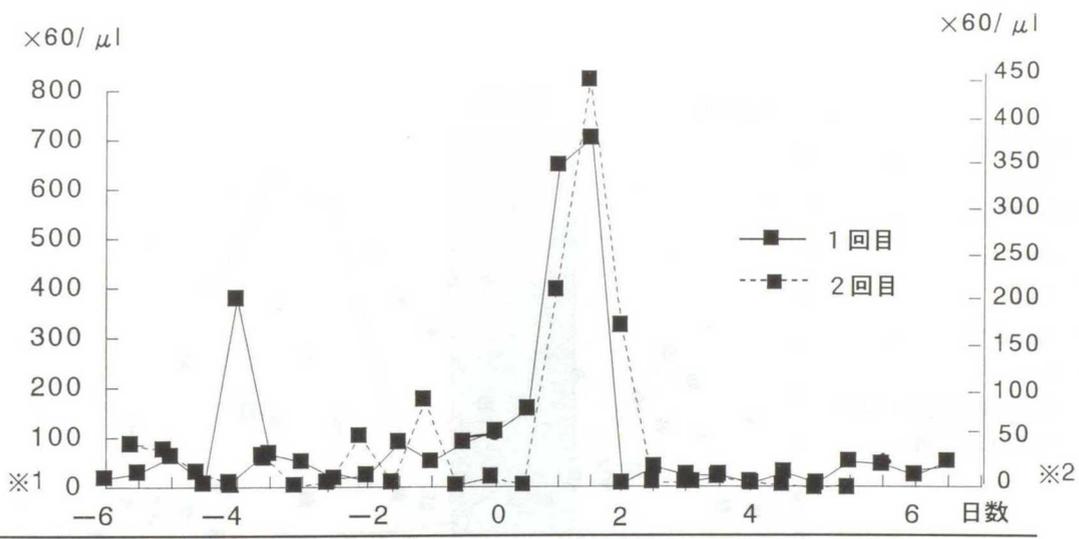
※1: 1回目、※2: 2回目

図15. No.67 の2回目の発情期前後の頸管粘液中好中球数と外部徴候



許容	1 回目		+	+	+
	2 "			+	+
充血	1 "		+	+	+
	2 "			+	+
腫脹	1 "		+	+	+
	2 "			+	+

図16. No.96 の2回目の発情期前後の頸管粘液の中好中球数と外部徴候



許容	1 回目		+	+
	2 "		+	+
充血	1 "		+	+
	2 "		+	+
腫脹	1 "		+	+
	2 "		+	+

※1 : 1回目、※2 : 2回目

図 17. No.108の2回目の発情期前後の頸管粘液の中好中球数と外部徴候

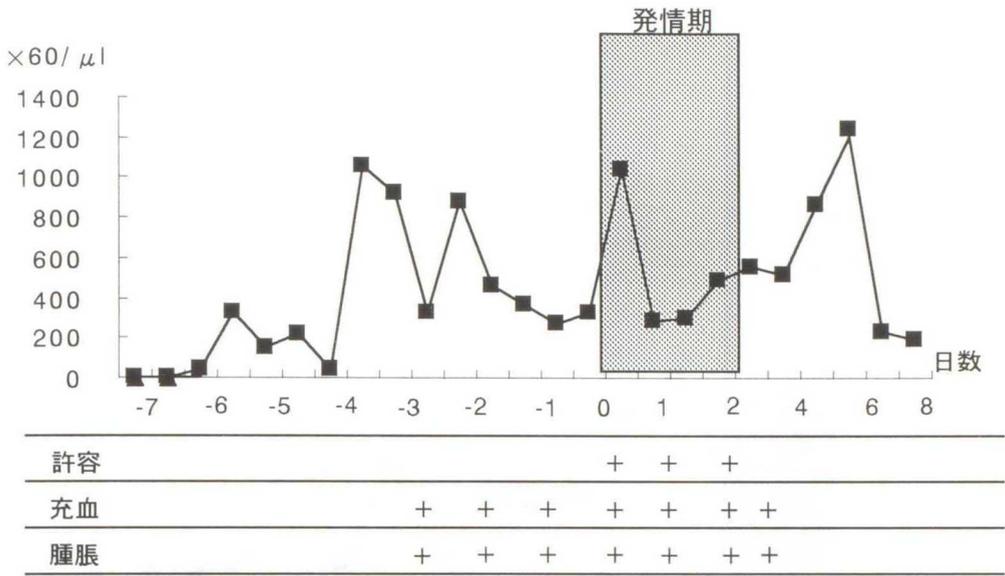


図 18. No.84 の発情期前後の頸管粘液中好中球数の推移と外部徴候

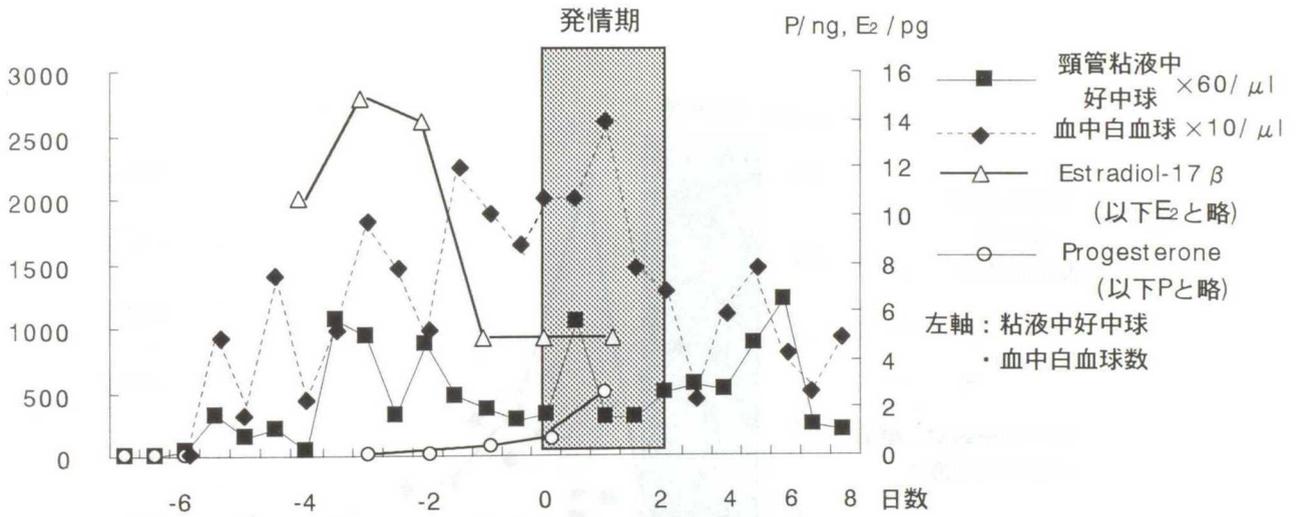


図19. No.84の発情期前後の血中Steroid Hormone、
血中白血球数および頸管粘液中好中球数の推移

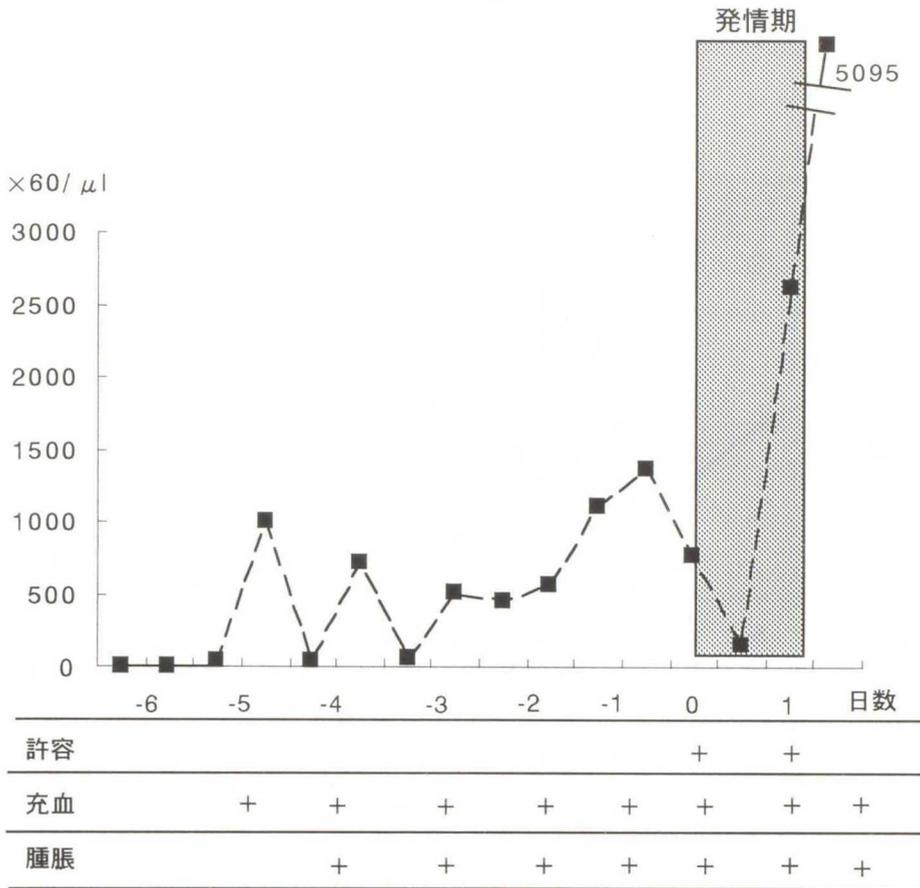


図 20. No.85の発情期前後の頸管粘液中好中球数の推移と外部徴候

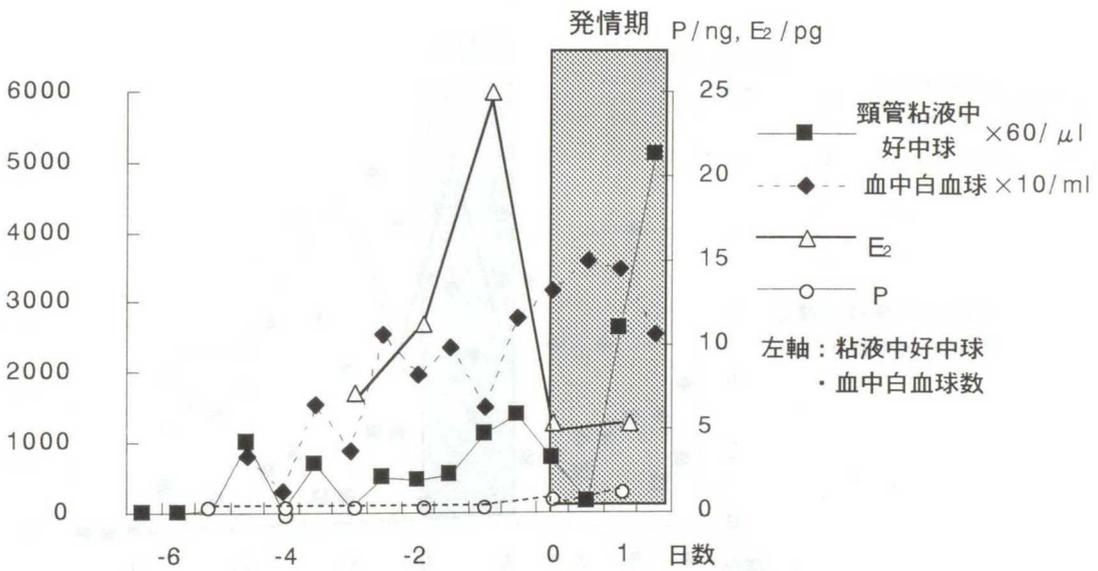


図21. No.85の発情期前後の血中Steroid Hormone、
血中白血球数および頸管粘液中好中球の推移

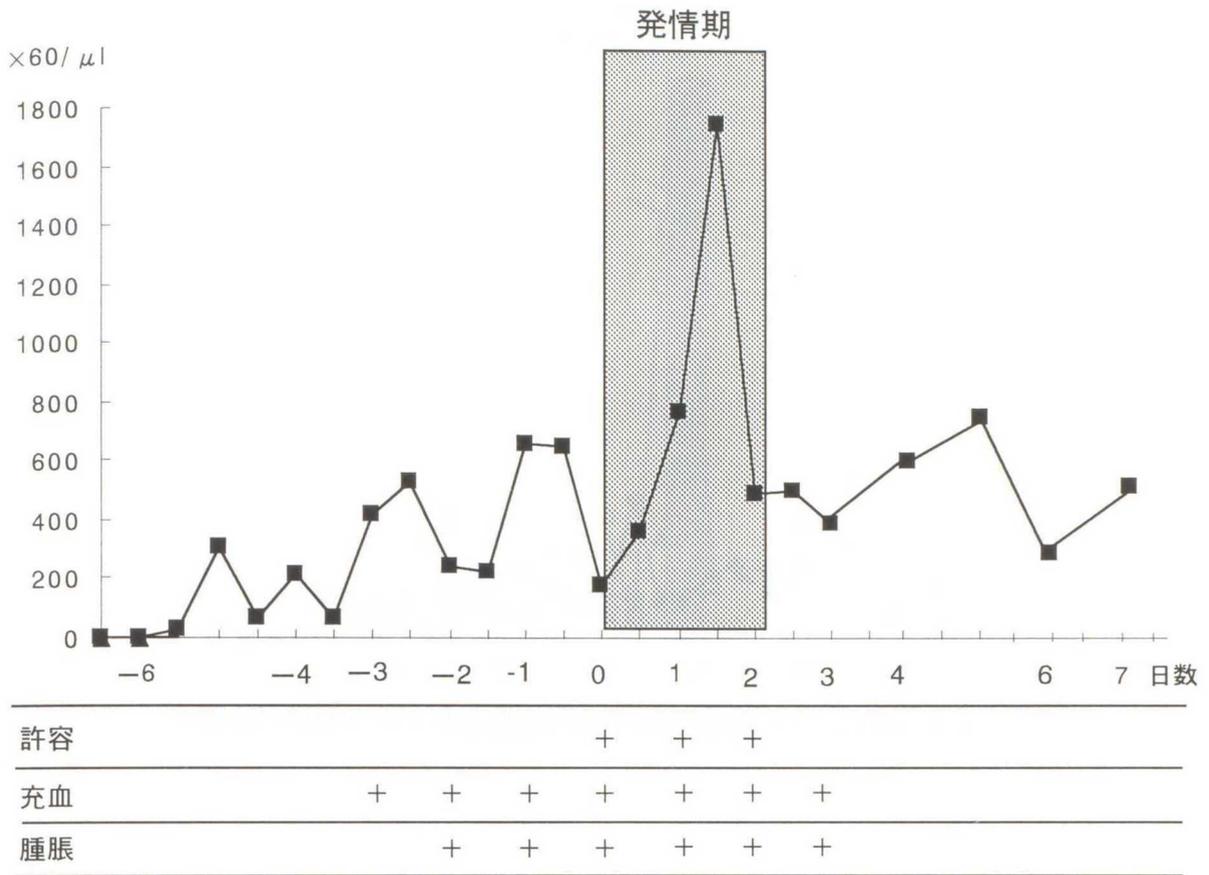


図 22. No.88 の発情期前後の頸管粘液中好中球数の推移と外部徴候

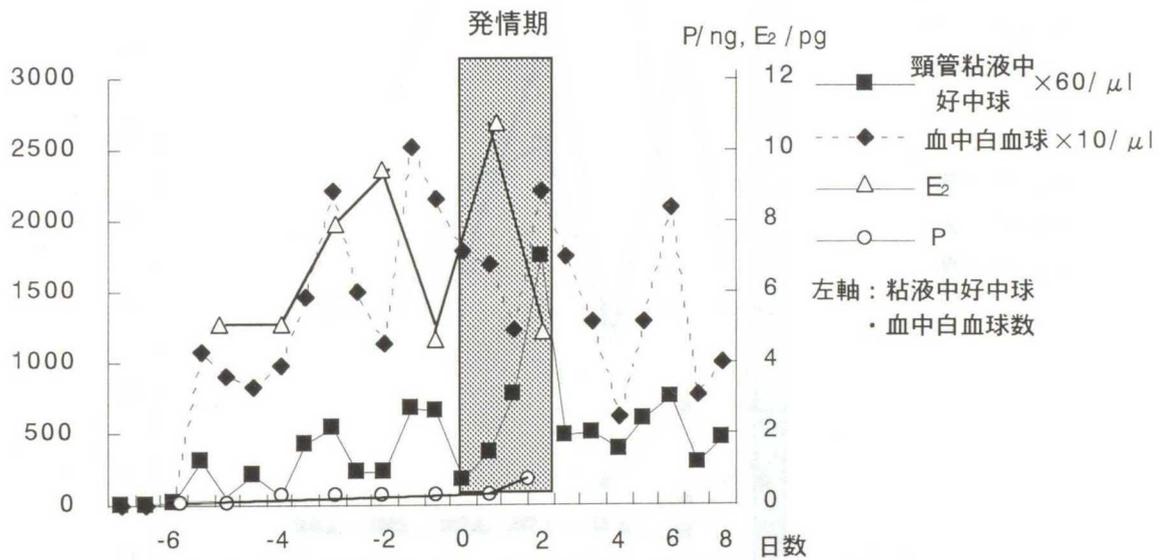


図23. No.88の発情期前後の血中Steroid Hormone、
血中白血球数および頸管部粘液中好中球数の推移

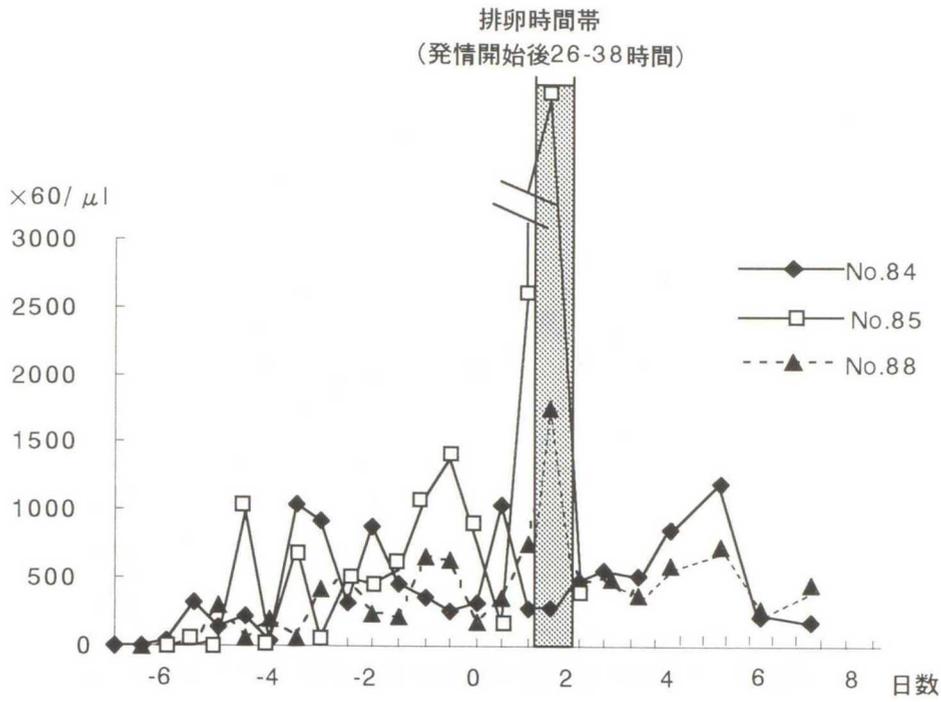


図 24. No.84.85.88 の排卵時間帯と頸管粘液中好中球数の推移

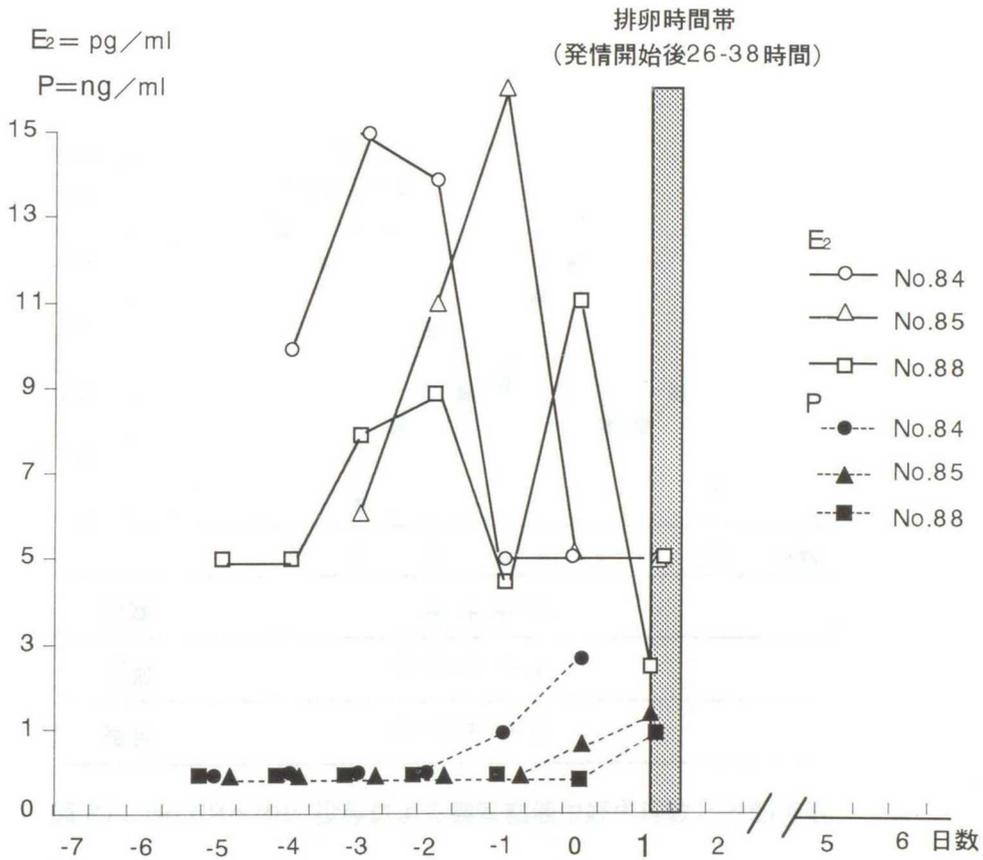


図 25. No.84,85,88の血中Steroid Hormone濃度と排卵時間帯

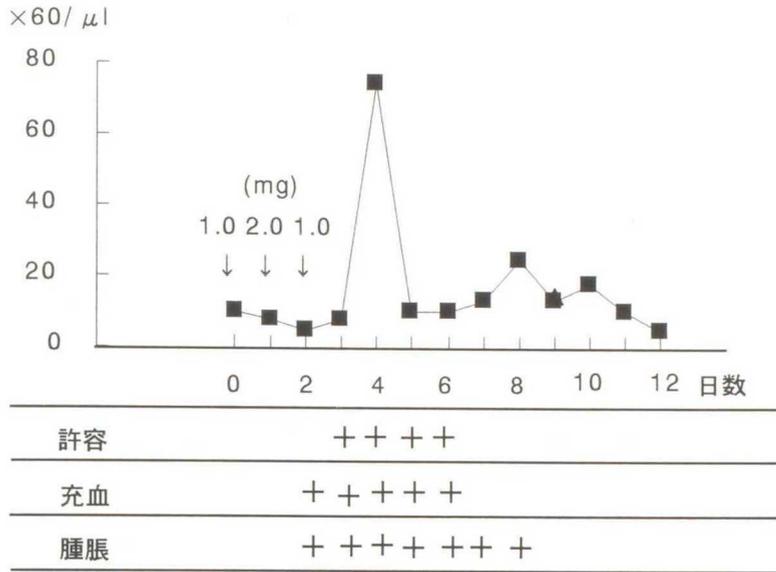


図 26. No.68へのE1 投与による頸管粘液中好中球数と外部徴候

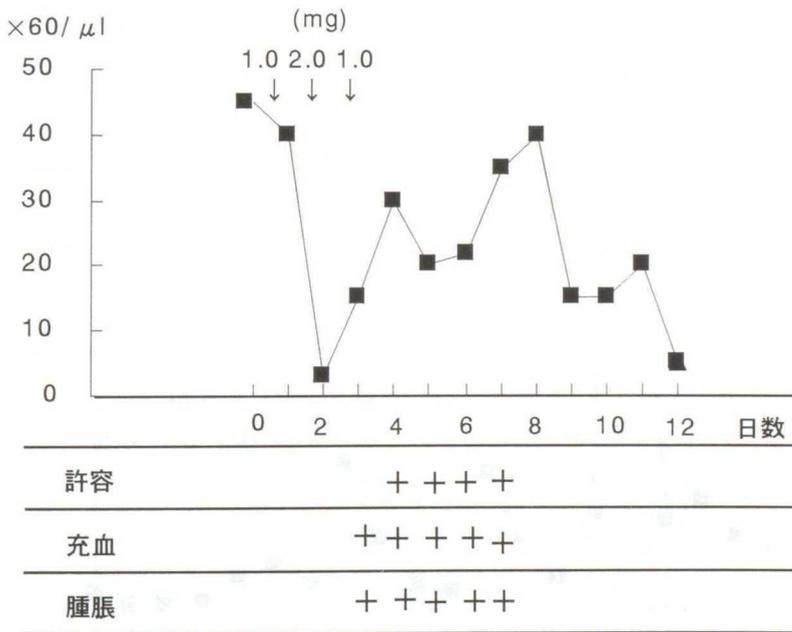
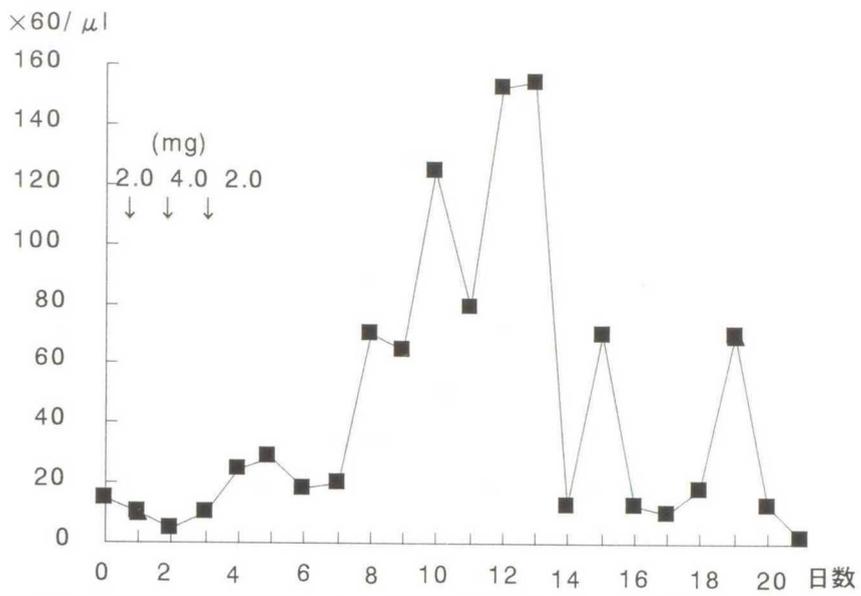
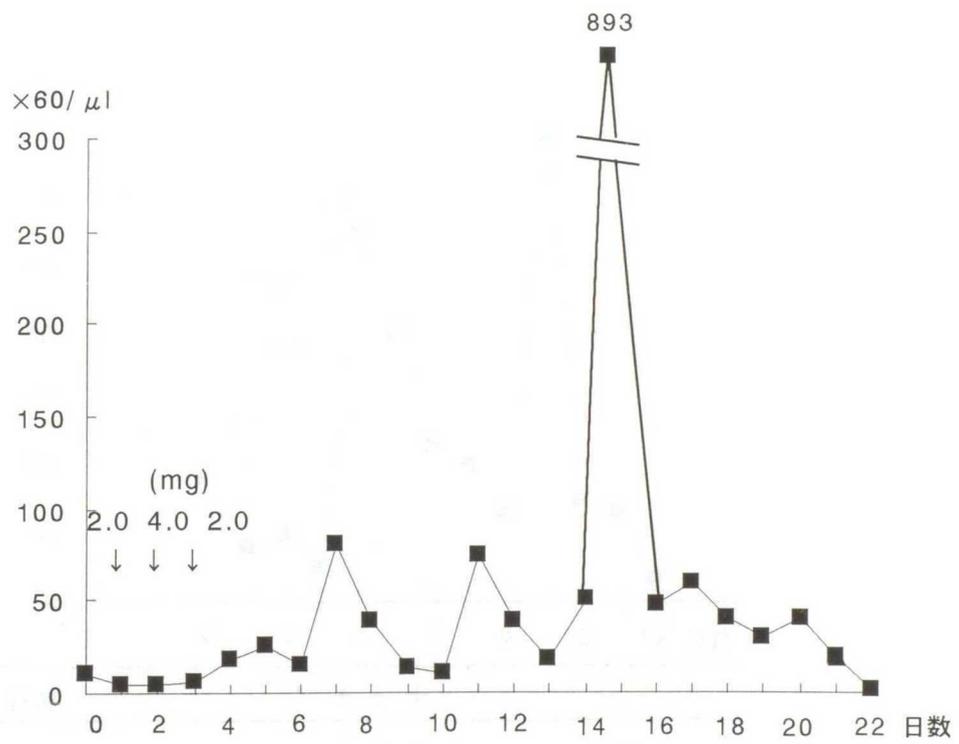


図 27. No.69へのE1 投与による頸管粘液中好中球数と外部徴候



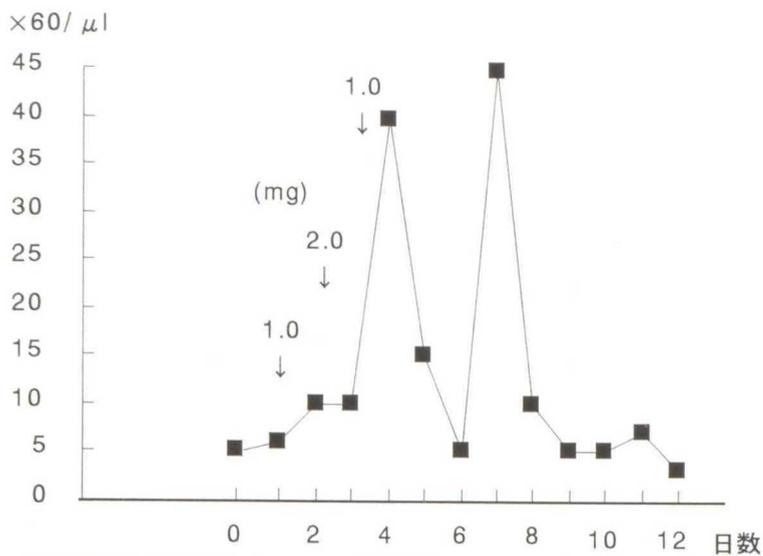
許容	+++++
充血	+++++
腫脹	+++++

図 28. No.68へのE₂ 投与による頸管粘液中好中球数と外部徴候



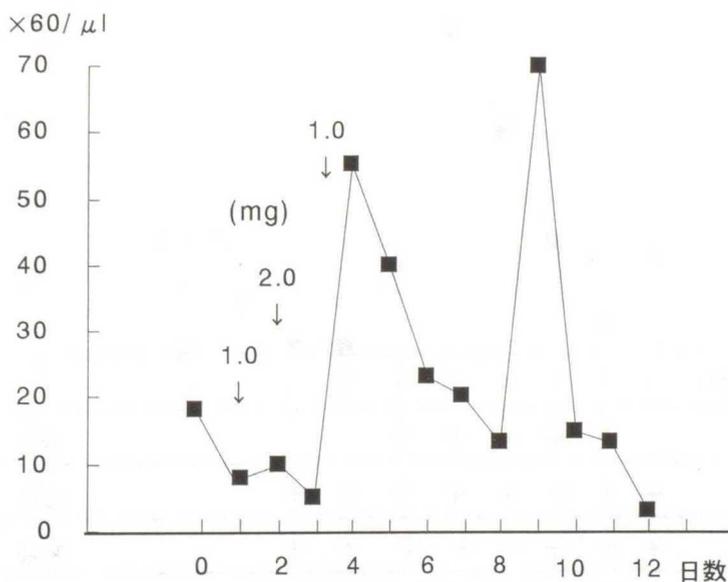
許容	+++++
充血	+++++
腫脹	+++++

図 29. No.69へのE₂ 投与による頸管粘液中好中球数と外部徴候



許容	+	+	+			
充血	+	+	+	+		
腫脹	+	+	+	+	+	+

図 30. No.70へのE₃ 投与による頸管粘液中好中球数と外部徴候



許容	+	+	+			
充血	+	+	+	+		
腫脹	+	+	+	+	+	+

図 31. No.71へのE₃ 投与による頸管粘液中好中球数と外部徴候

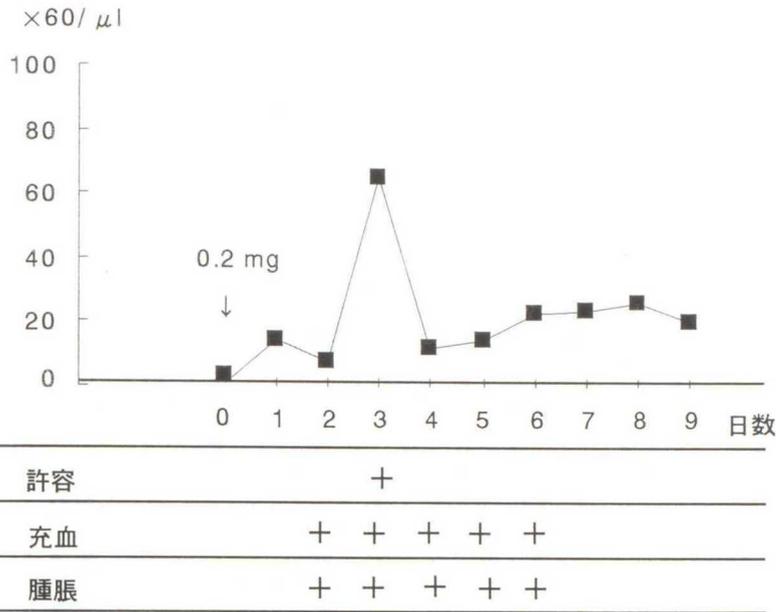


図 32. No.154 へのE₂ 1回投与による頸管粘液中好中球数と外部徴候

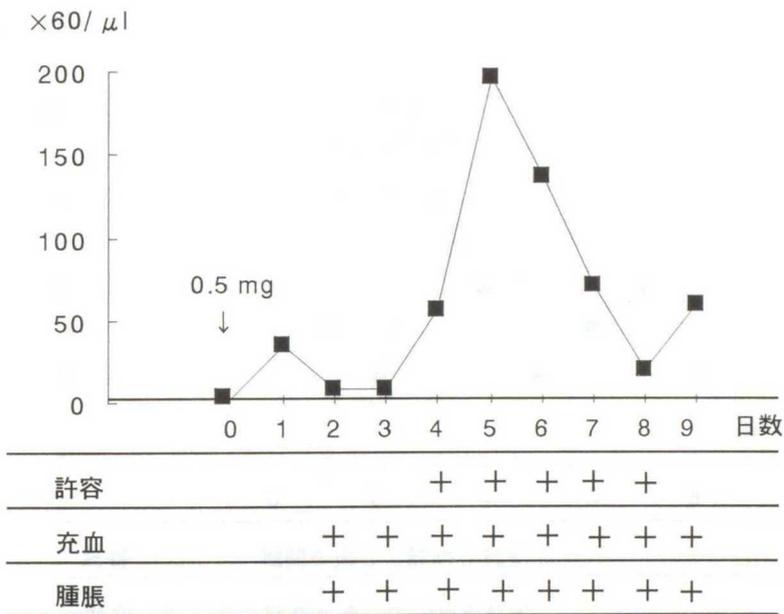


図 33. No.138 へのE₂ 1回投与による頸管粘液中好中球数と外部徴候

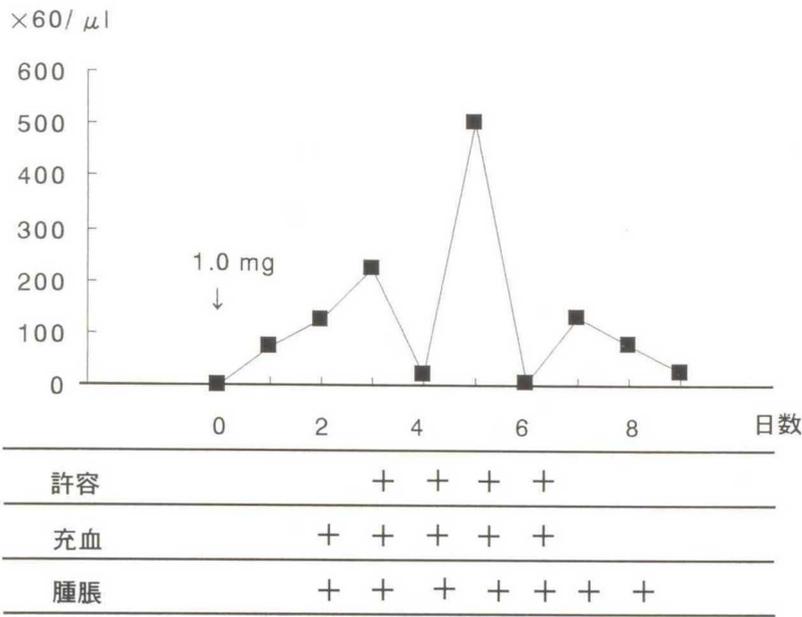


図 34. No.164へのE₂ 1回投与による頸管粘液中好中球数と外部徴候

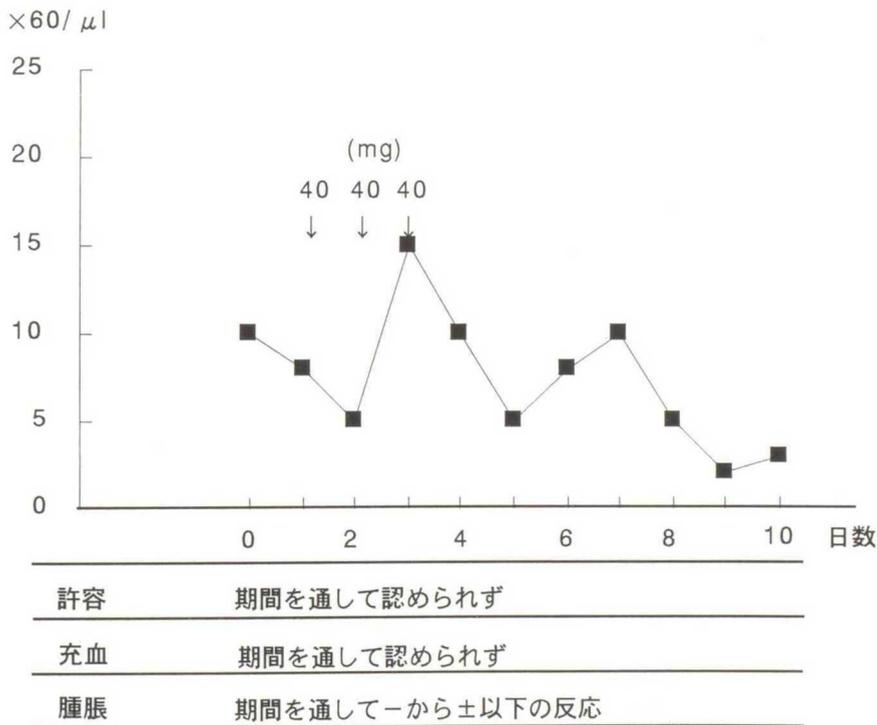
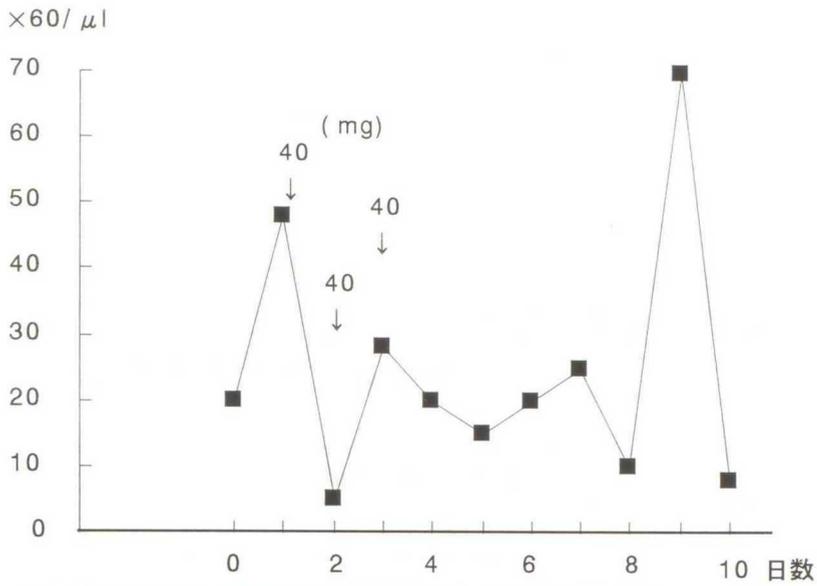


図 35. No.70へのP投与による頸管粘液中好中球数と外部徴候



許容	期間を通して認められず
充血	期間を通して認められず
腫脹	期間を通して-から±以下の反応

図36. No.71へのP投与による頸管粘液中好中球数と外部徴候

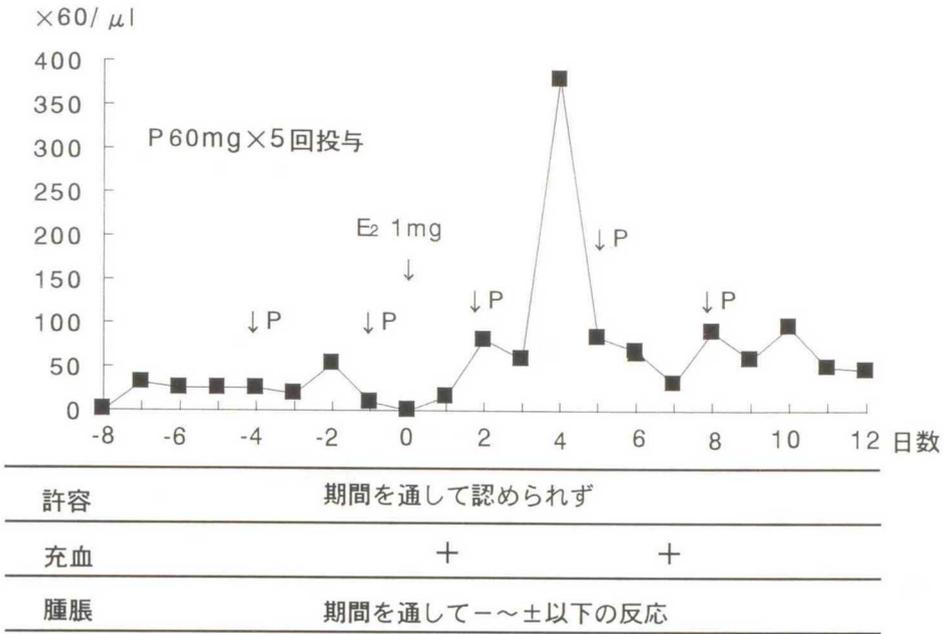


図 37. No.164へのE₂, P投与による頸管粘液中好中球数と外部徴候

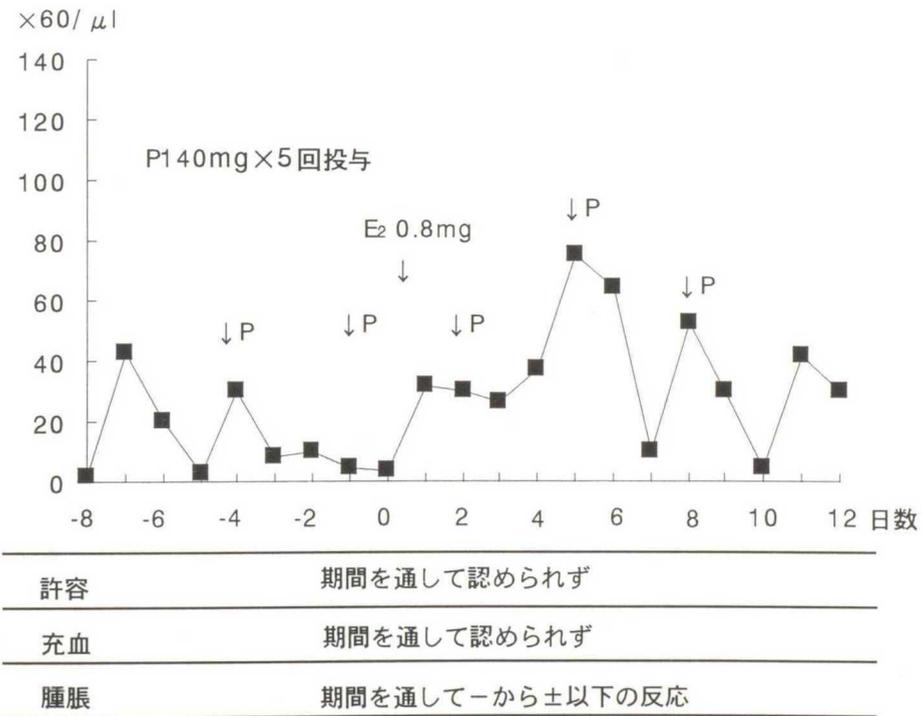
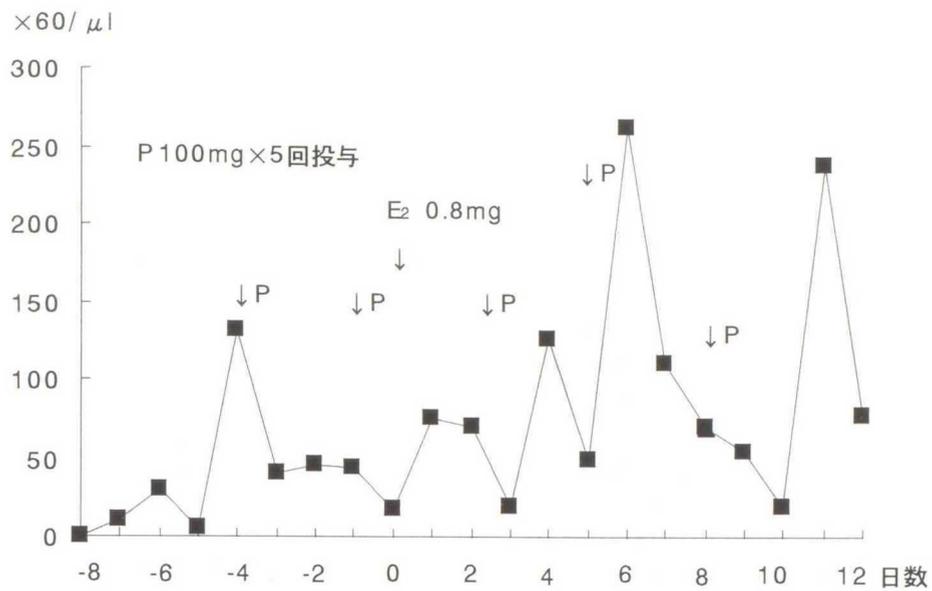


図38. No.154へのE₂, P投与による頸管粘液中好中球数と外部徴候



許容 期間を通して認められず

充血 期間を通して認められず

腫脹 期間を通して-から±以下の反応

図39. No.138への P, E₂ 投与による頸管粘液中好中球数と外部徴候

粘液中好中球数×60/μl

血中白血球数×10/μl

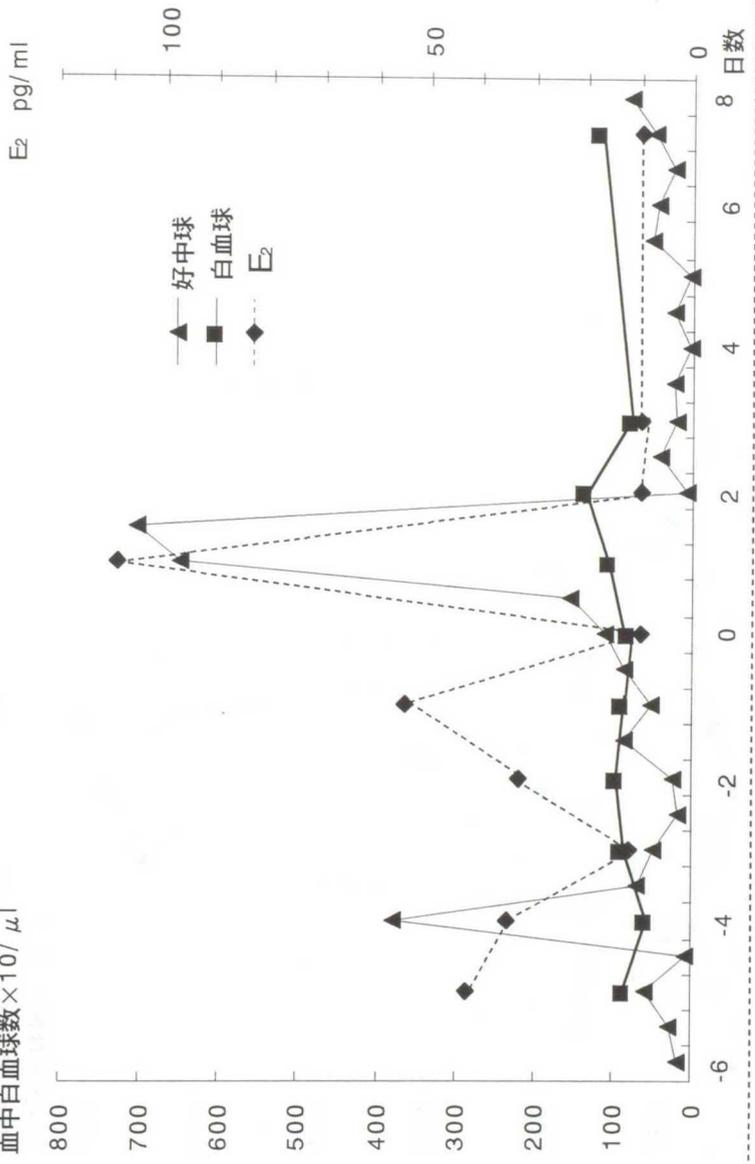


図40. No.108の発情時の血中白血球数, E2濃度, 頸管粘液中の好中球数と外部徴候

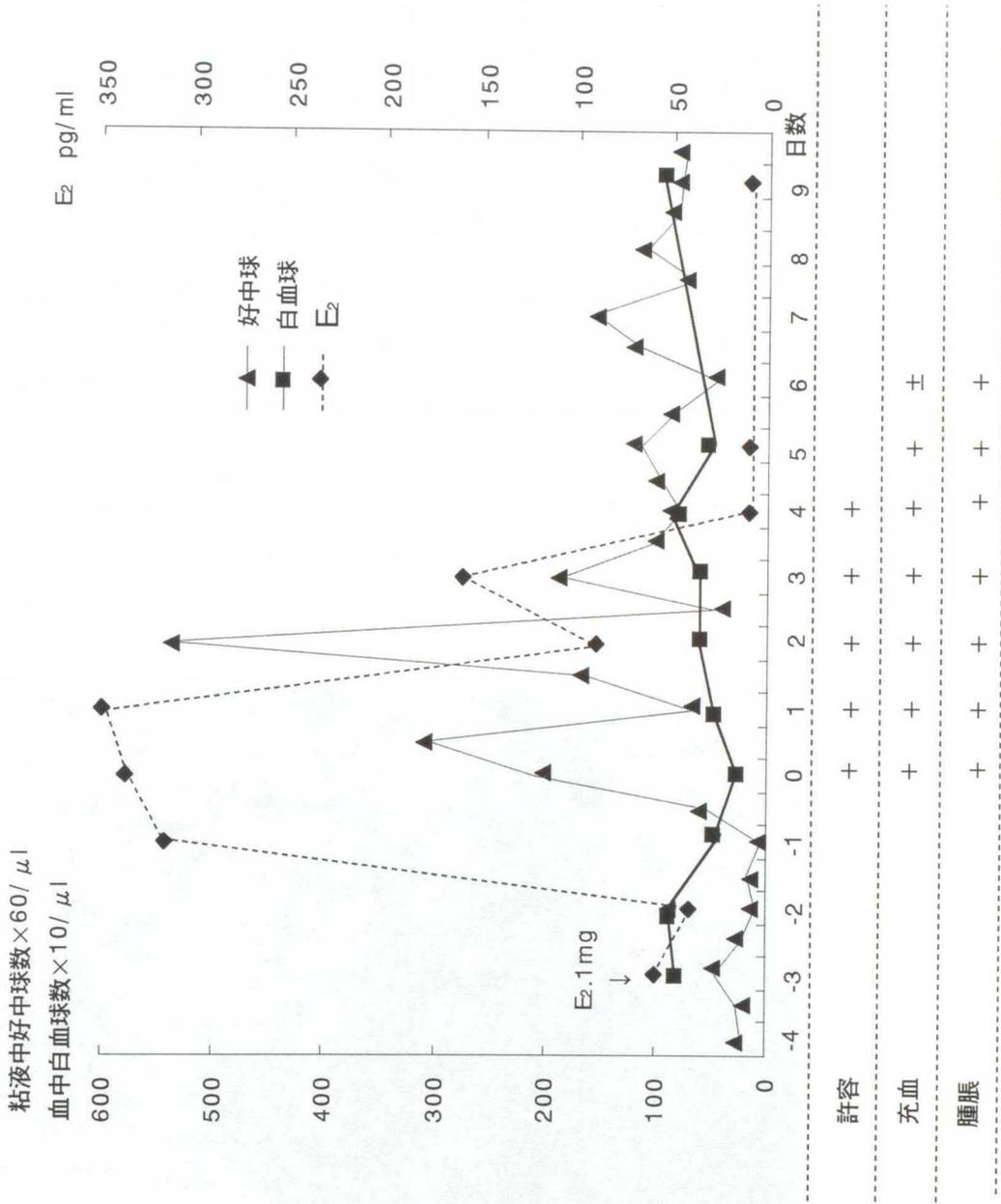


図 41. No.138の疑似発情時の血中白血球数, E_2 濃度, 頸管粘液中の好中球数と外部徴候

自然発情豚No.67の頸管部粘膜上皮細胞層（以下上皮層と略）
と粘膜下織（以下下織と略）（図42-1～45-3）

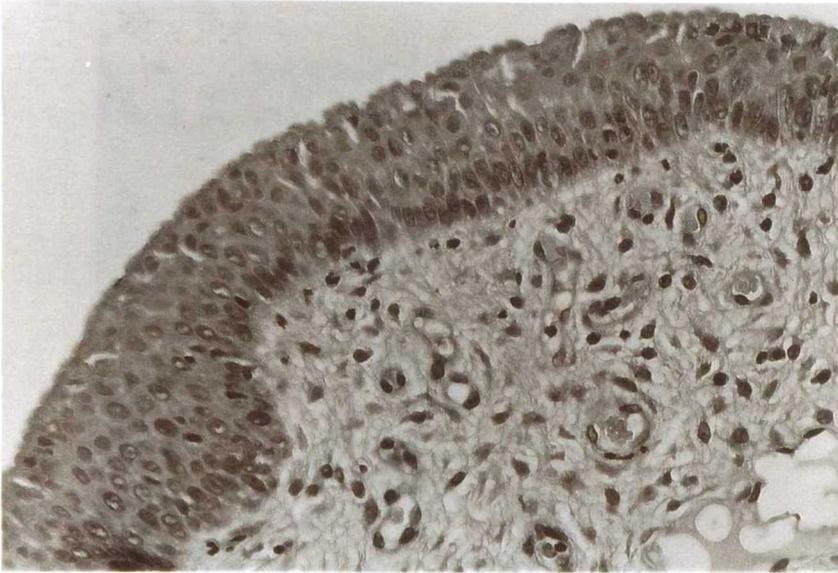


図42-1・発情開始直前

発情開始期上皮層は5～9層、基底膜下に円形細胞が散在的に認められるが、下織の血管の拡張は認められない。

(×150)

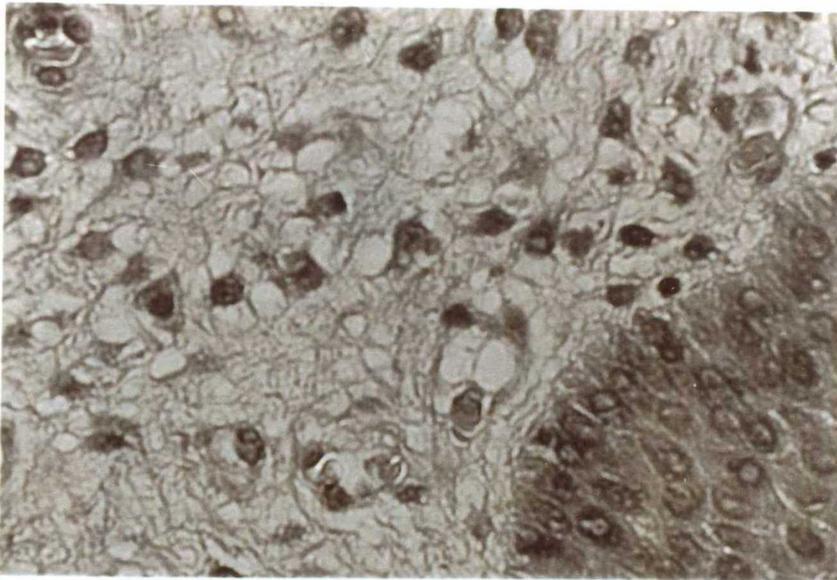


図42-2・発情開始直前

発情開始期上皮層および下織に円形細胞が認められ、間質部に大小の房状物が認める。(×600)

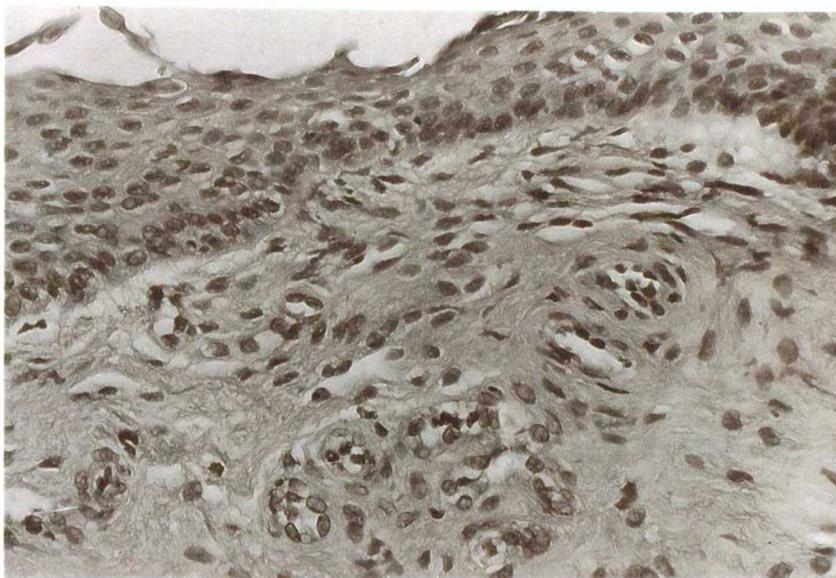


図43・発情2日目

上皮層はやや肥厚し、剥離が進み、基底膜下に変形細胞が増加し、血管の拡張が認められる。(×300)

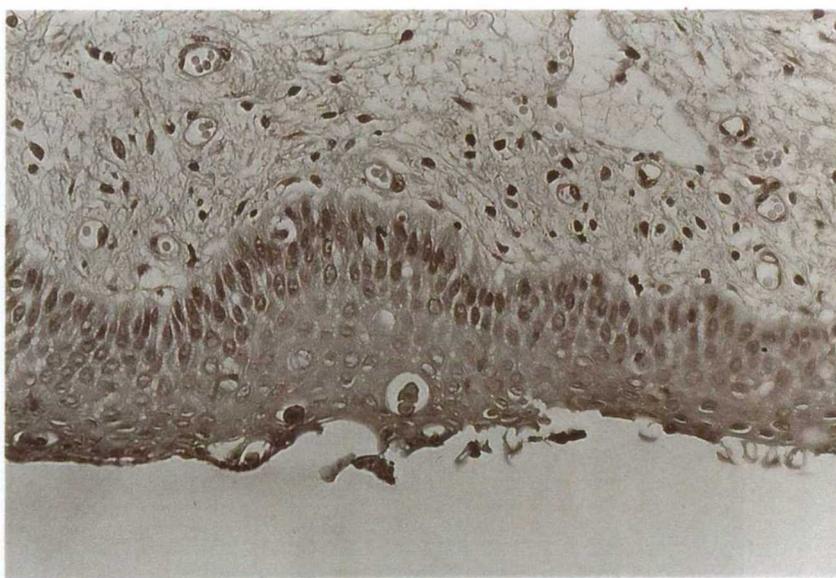


図44-1・発情3日目

上皮層の肥厚が強く、上層部に細胞嚢胞があり、上皮細胞の剥離が進行している。基底膜下に円形細胞が散在しており、血管の拡張は中等度で、下織の疎造化が認められる。(×300)

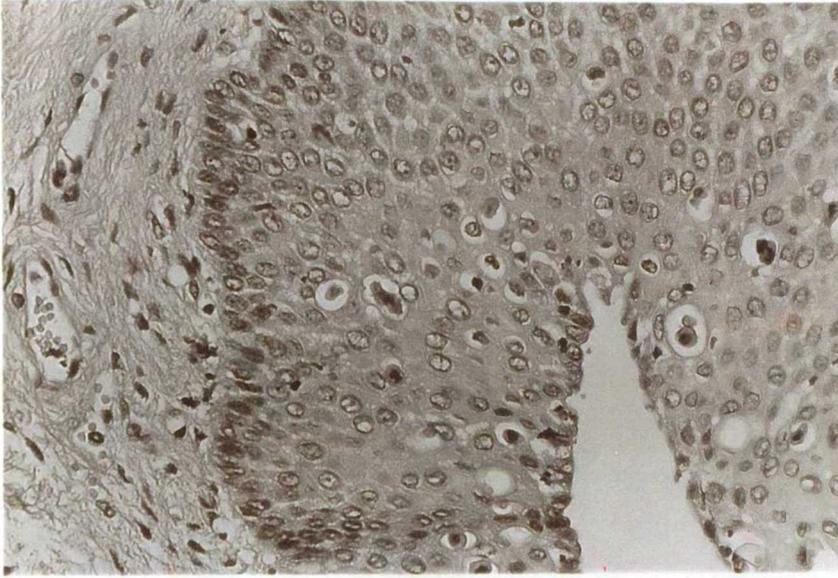


図44-2. 発情3日目

上層に細胞嚢胞があり、表層は剥離後の所見が認められる。
基底膜下に円形細胞が若干認められ、血管は中程度に拡張している。
(×300)

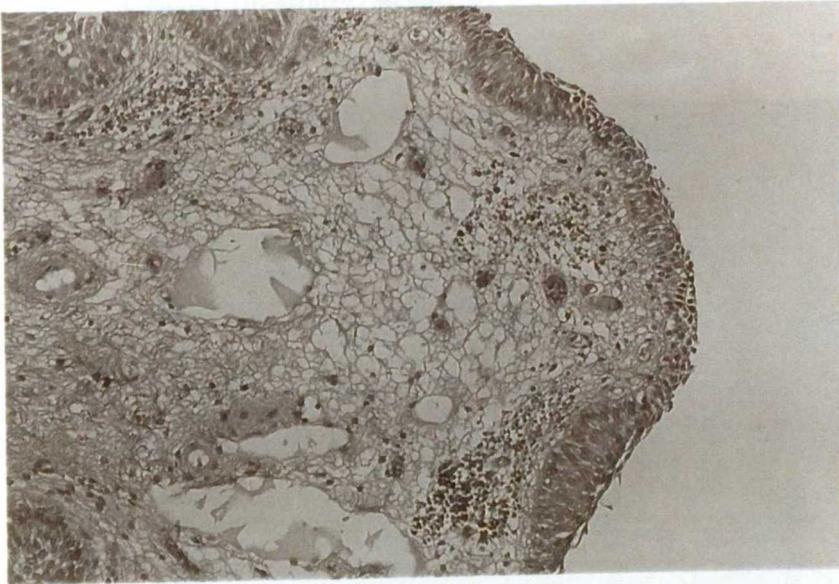


図45-1・発情4日目

上皮層の肥厚が強く、下織に円形細胞の集塊が認められる。
リンパ管の拡張、間質は極めて疎造感が強い。上皮細胞層の上
層部に小嚢胞がみられ、剥離もみられる。血管は強度に拡張し
ている。(×150)

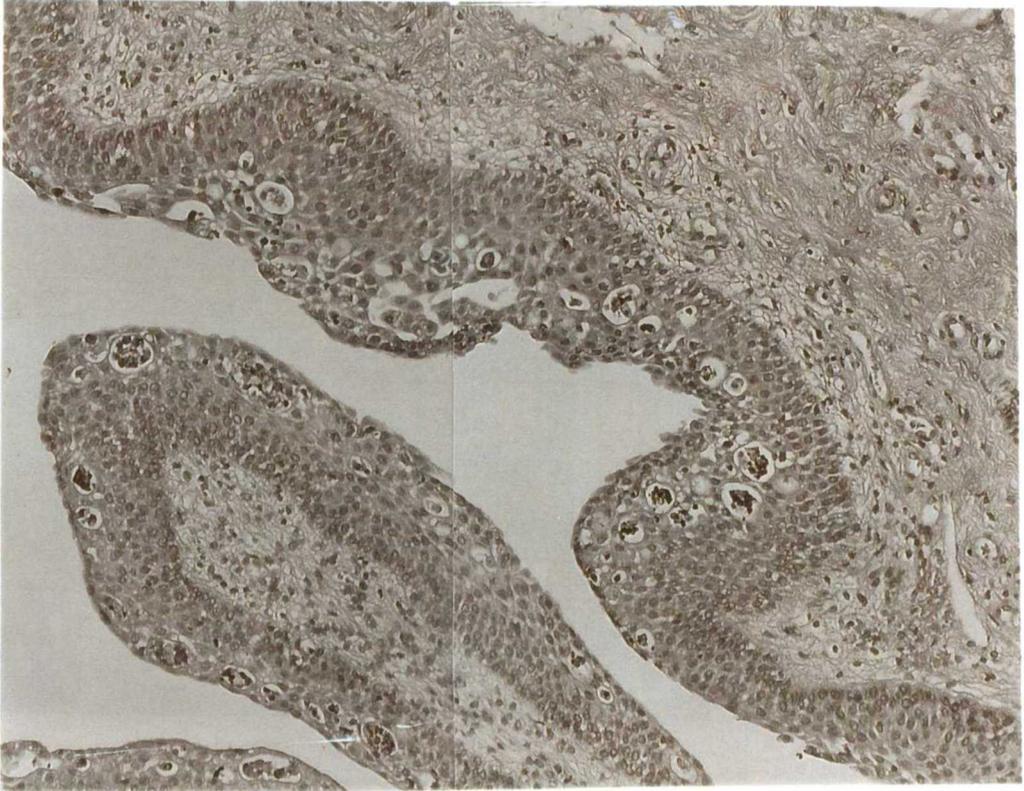


図45-2・発情4日目

上皮層は肥厚し、嚢胞が多数認められ、一部剥離もみられる。
下織に円形細胞の集塊があり、リンパ管、血管の拡張がみられる。
。(×150)

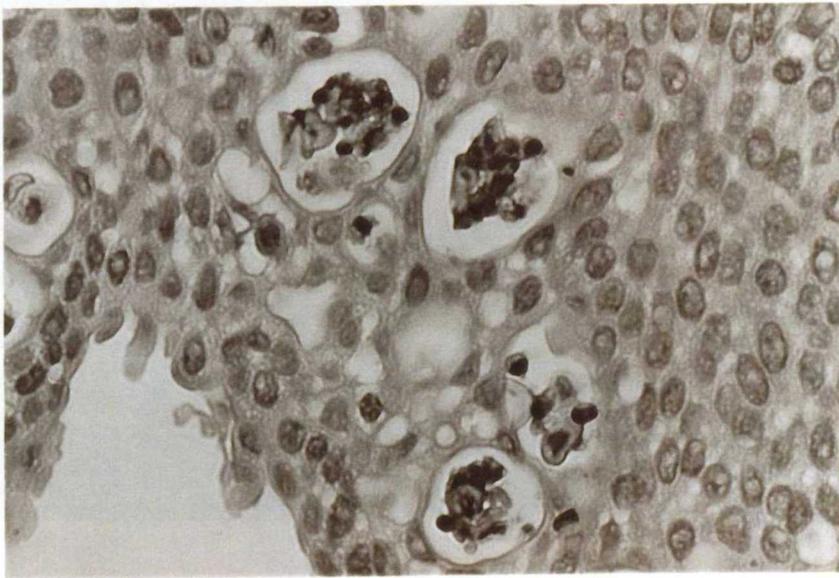


図45-3・発情4日目

上皮層の肥厚や、多数の細胞嚢胞が認められる。(×600)

E₂ 1回 (1.0mg) 投与豚No.138の上皮層と下織の図示
(図46～図51)

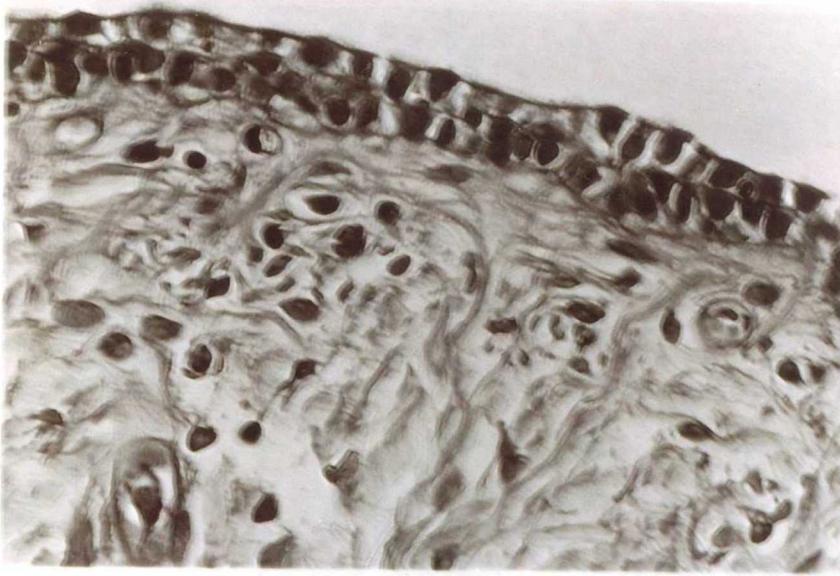


図46 . 投与直前

上皮層の増殖はなく、下織の血管拡張もみられない。
(×450)

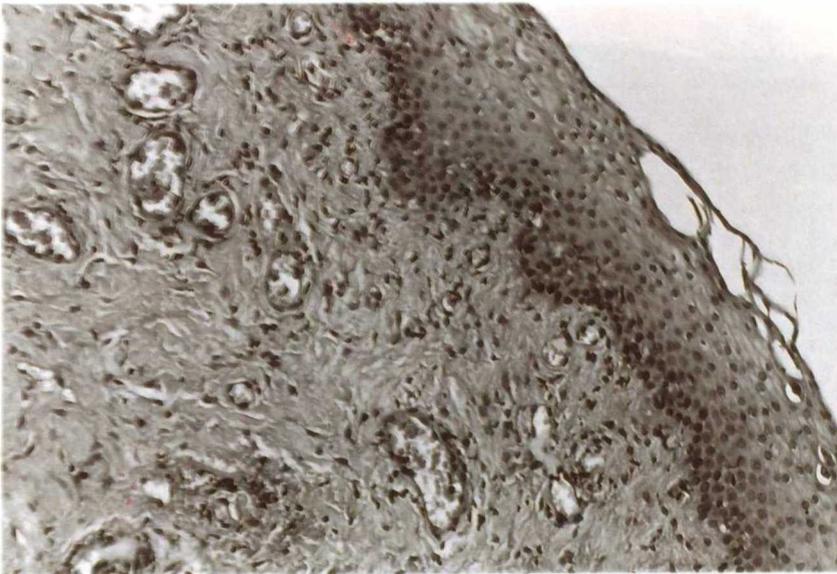


図47. 投与後2日目

上皮層の多層化と下織の血管拡張が認められる。(×150)

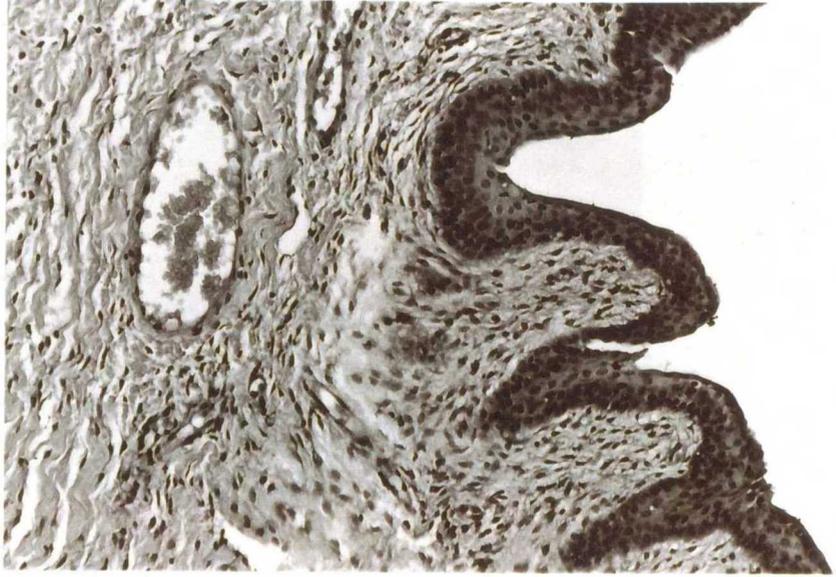


図48. 投与後4日目

上皮層の増殖的变化は消退し、下織の血管の拡張も認められない。(×150)

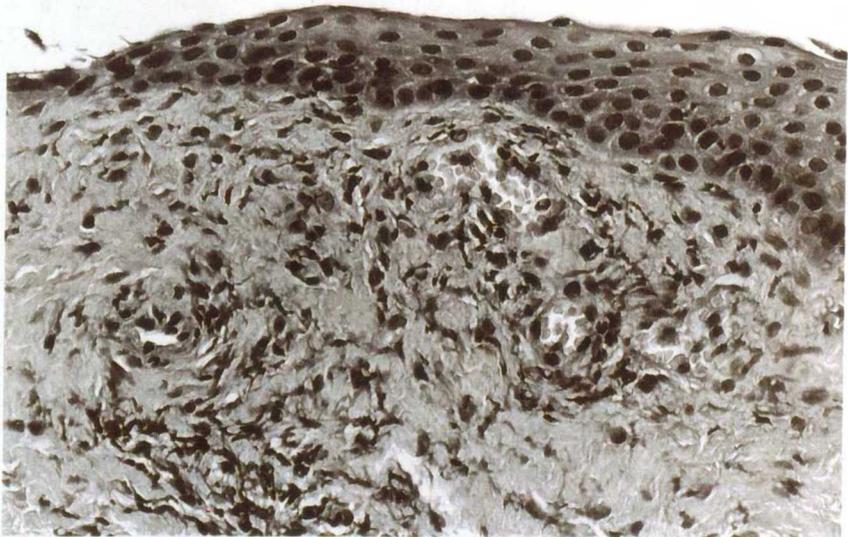


図49-1. 投与後5日目

下織の血管の拡張が認められ、血管周囲および下織に円形細胞や変形細胞が集合している部分がみられる。(×300)

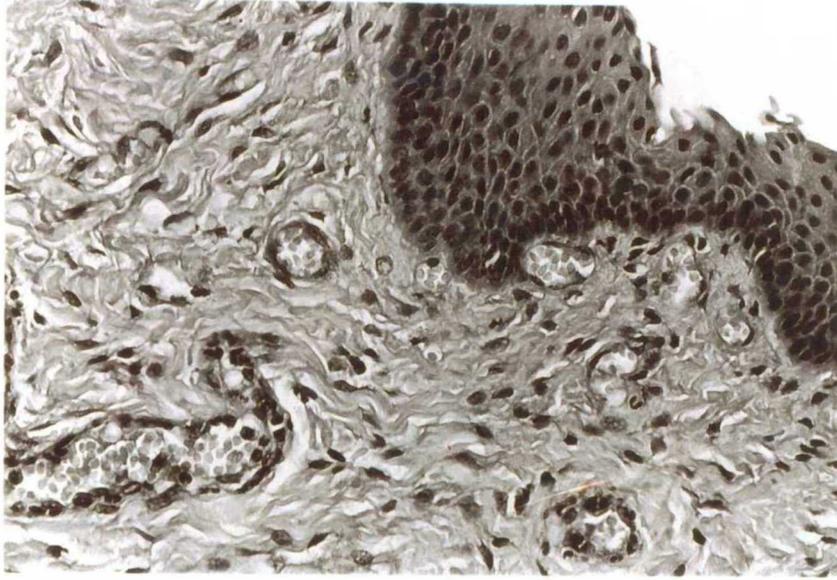


図49-2. 投与後5日目

上皮層の多層化が進み、変形細胞が少数散在している。下織に強い血管拡張が認められるが、円形細胞や変形細胞は散在しており、図49-1で示したような所見とはやや異なり、部位により、多小の差異が存在する。(×300)



図50. 投与後7日目

上皮層の多層化がみられるが血管の拡張はなく、変形細胞が散在しており、下織では円形細胞と変形細胞がかなり認められる。上皮表面は剥離がみられる。(×150)

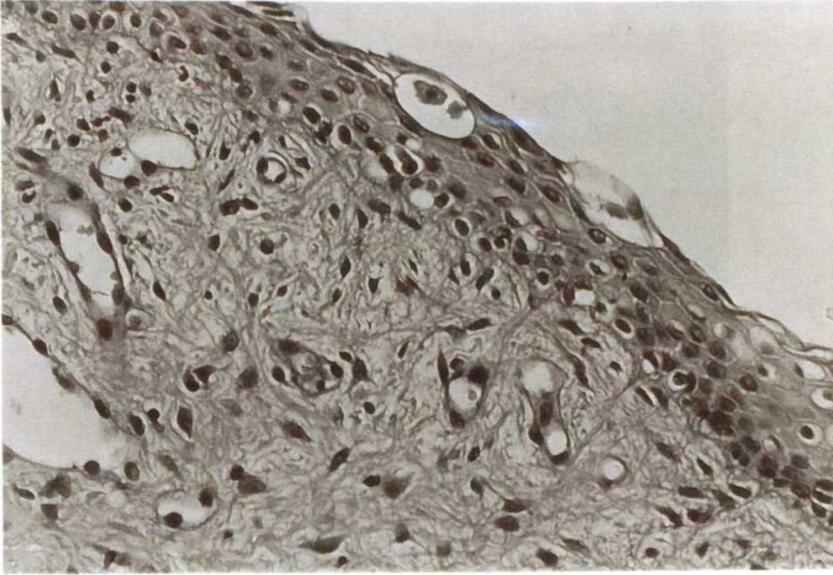


図51. 投与後9日目

上皮層の多層化が消退し、下織の血管に拡張はみられず、円形細胞と変形細胞は少ない。上皮細胞層内には少数の小嚢胞がみられる。(×150)

E2 1回 (1.0mg) 投与 豚No.164の上皮層と下織の図示
(図 52-1, 2, 3, 4, 図 53-1, 2, 3, 4)

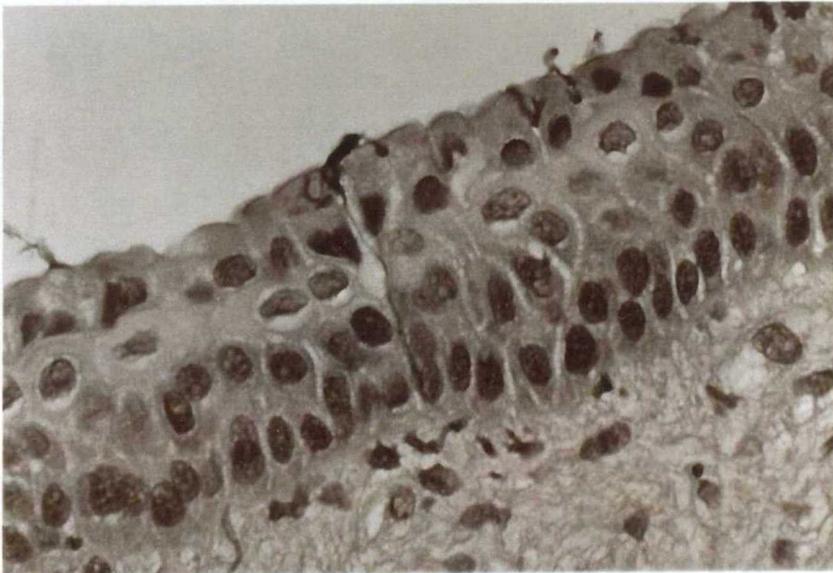


図52-1. 投与後3日目

上皮層の増殖がみられ、層内には移動中の変形細胞がみられ、基底膜下にも散在している像がみられる。上皮細胞表面には遊走してきた変形細胞が突出し、遊離前の状態がみられる。

(×600)



図52-2. 投与後3日目

上皮層の増殖、層中に変形細胞の移動しつつあるものが認められる。上皮表面に変形細胞の遊離と表面細胞の剥離がみられる。
(×600)

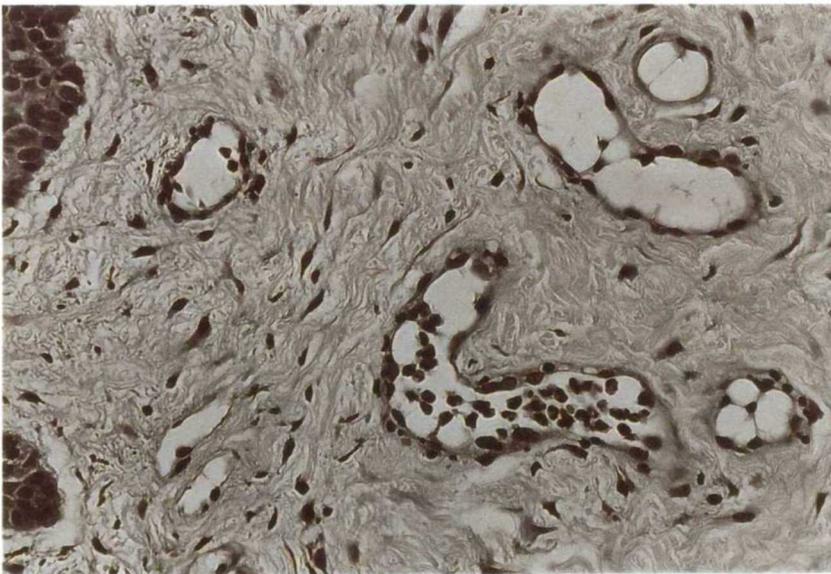


図52-3. 投与後3日目

下織に強度の血管の拡張がみられ、周囲に変形細胞が若干みられる。血管内には白血球の集塊があり、組織は疎造感を呈する。
(×250)

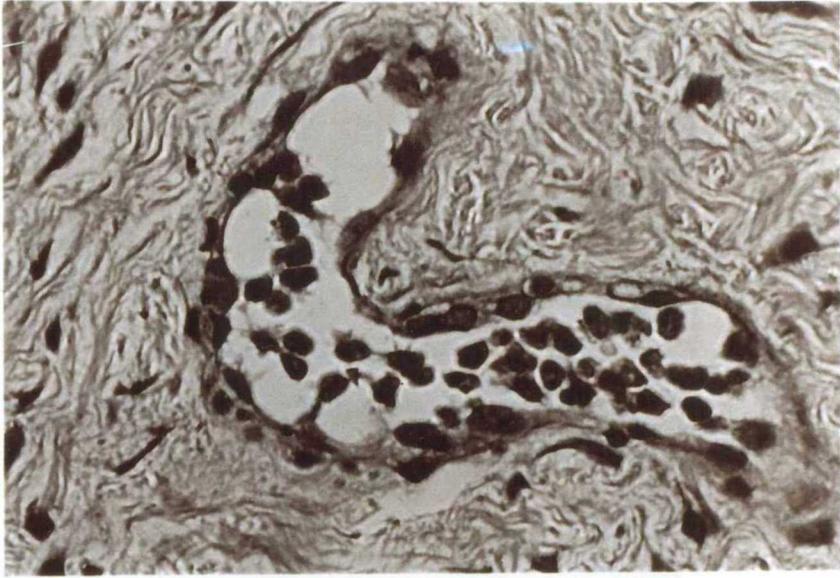


図52-4. 投与後3日目、図52-3の拡大図 (×600)

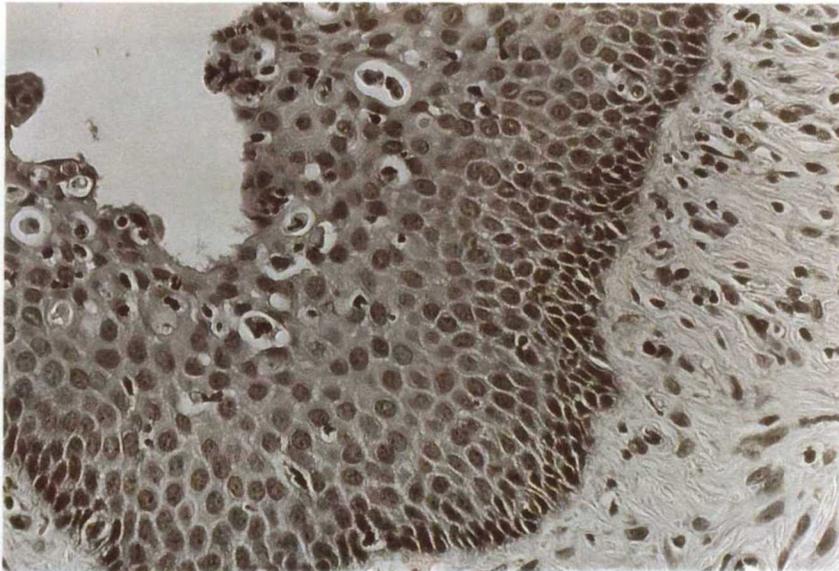


図53-1. 投与後5日目

上皮細胞の強度の増殖、層内に嚢胞が多数認められる。下織には極めて多数の変形細胞と円形細胞が認められる。(×300)

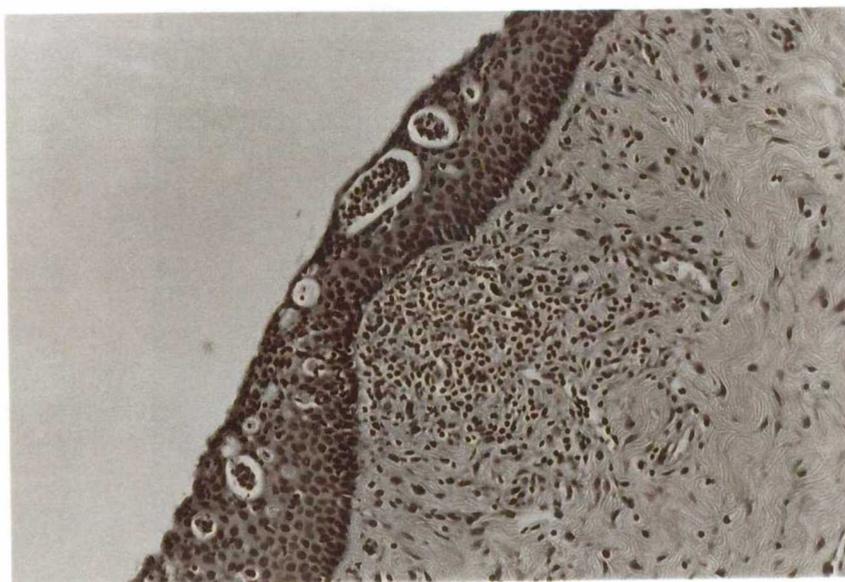


図53-2. 投与後5日目

上皮細胞の増殖は顕著で、内に細胞塊を包含する嚢胞が多数認められる。下織には変形細胞と円形細胞の顕著な集団がみられる。(×150)

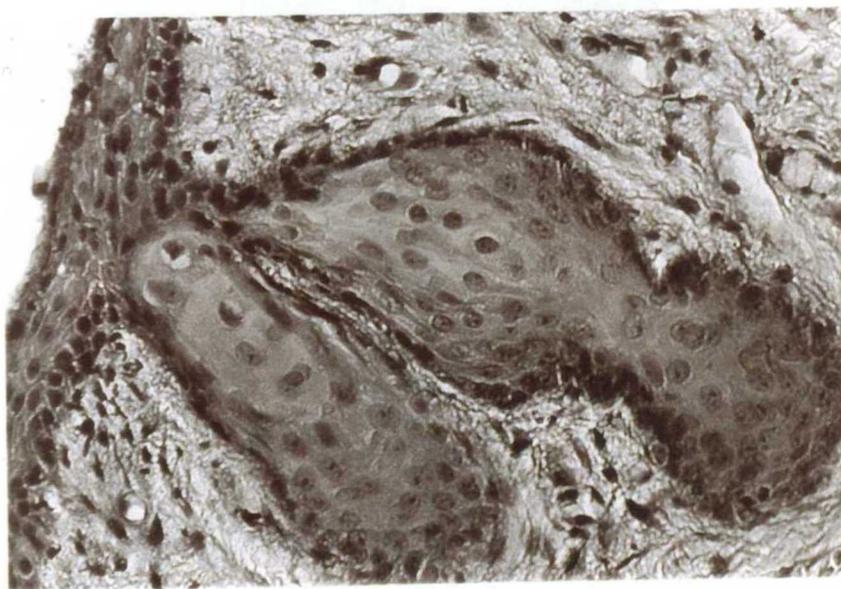


図53-3. 投与後5日目

上皮層から移行したとみられる下織内への過形成所見が認められる。下織には変形細胞が多数認められる。(×300)

E₂連続3日投与（1.0, 2.0, 1.0mg）豚No.69の上皮層と下織の図示
（図54-1～57-3）

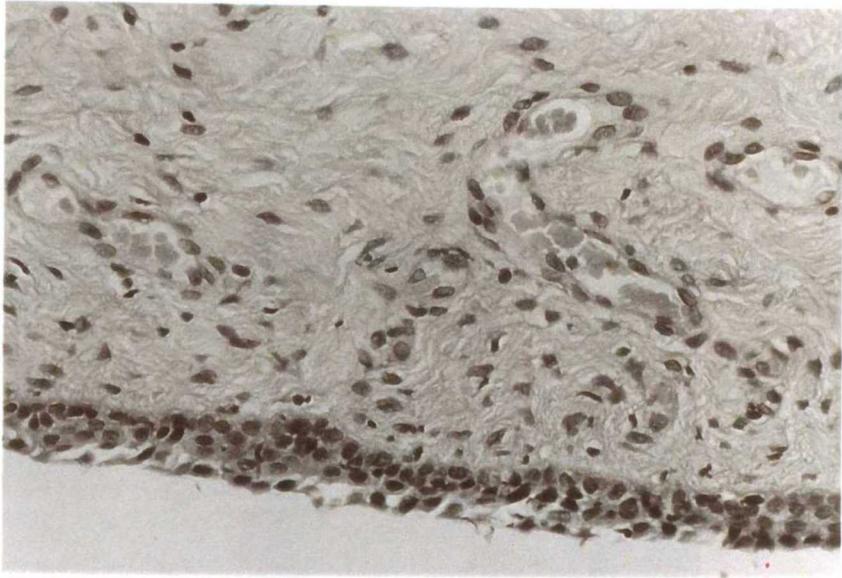


図54-1. 投与直前

上皮層の配列は数層、血管の拡張は僅かに認められる。下織には円形細胞と変形細胞が少数散在している。（×300）

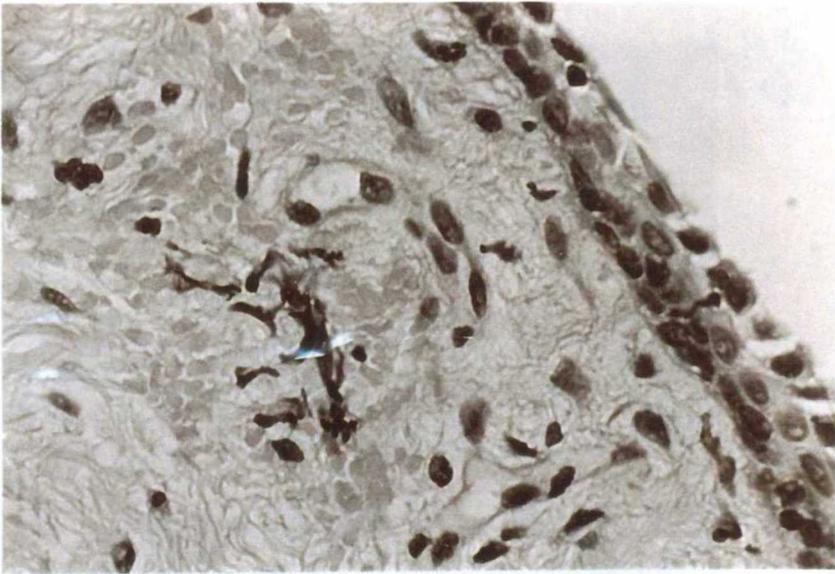


図54-2. 投与直前

上皮層では数層の細胞配列と移動中の少数の変形細胞があり、下織で赤血球の組織内への漏出による出血様変化と変形細胞の集合が認められる。（×450）

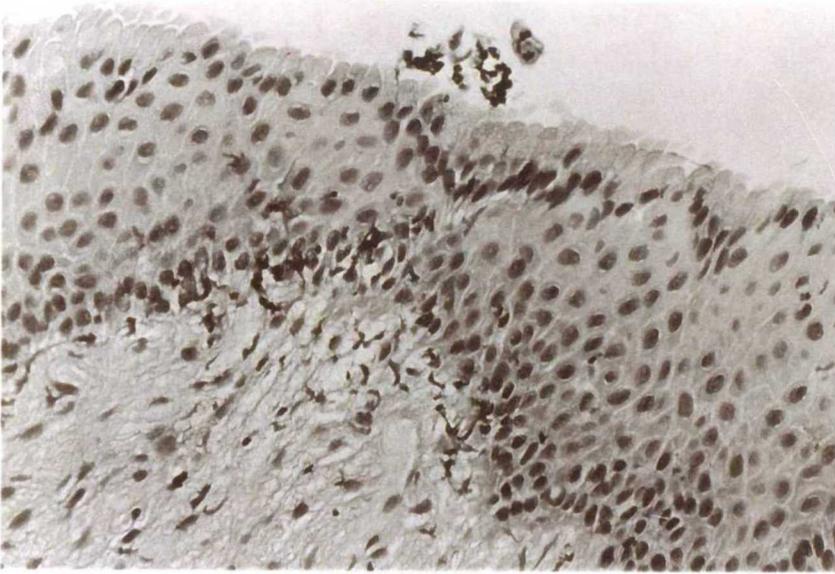


図55-1. 投与開始後4日目

上皮層の増殖と変形細胞の移動中の所見がみられ、基底膜下に多数の変形細胞が認められる。下織の間質は疎造感を呈し、上皮表面には変形細胞の集塊が認められる。上皮細胞の粘液分泌化が認められる。(×300)

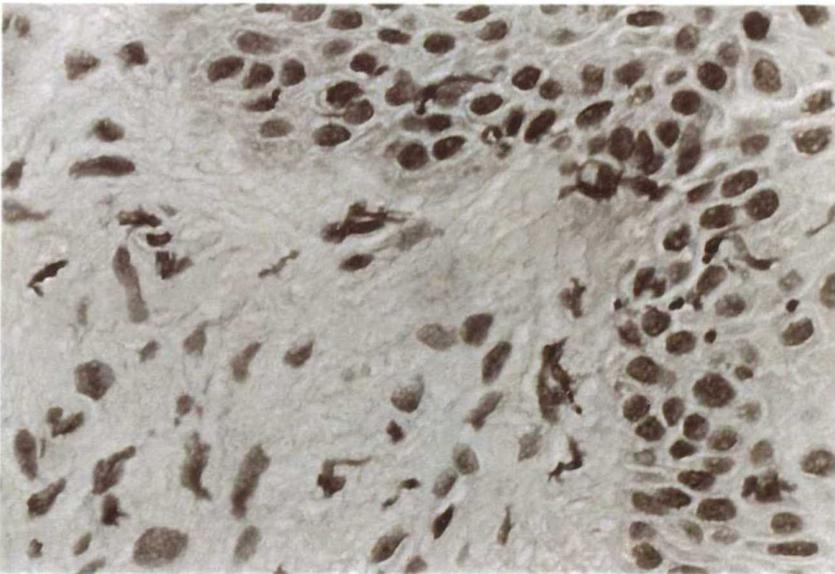


図55-2. 投与開始後4日目

基底膜部は凹凸が激しく、細胞の配列はやや不規則である。変形細胞は上皮層、下織とも多く認められる。(×600)

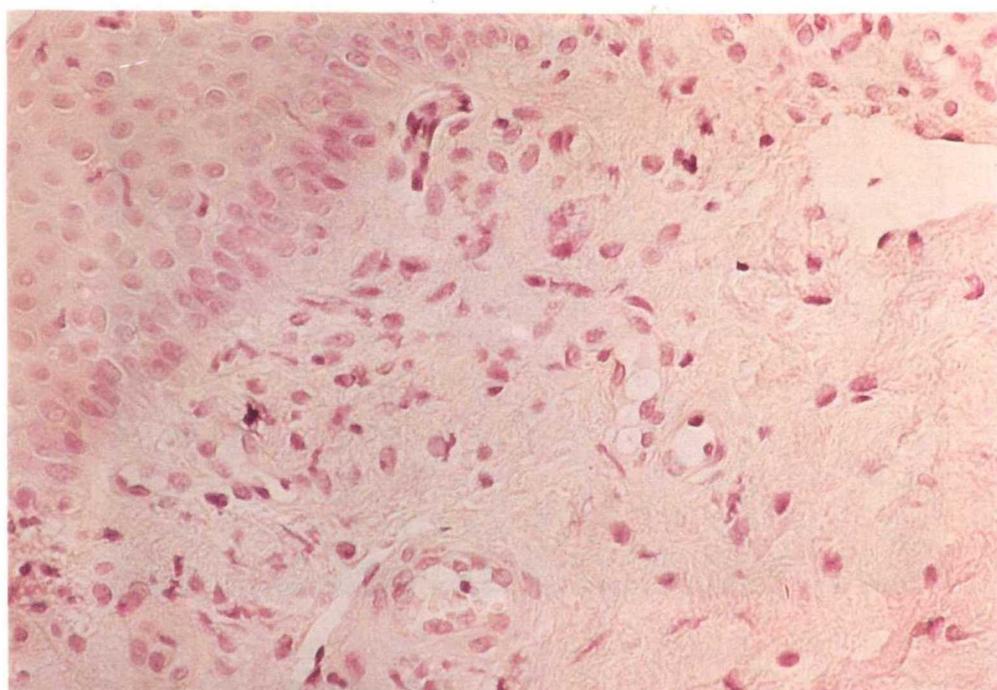


図55-3 E₂投与後2, 3, 6日目に固有層は広くなり、HE染色で無構造な桃色に染色される。(×300)

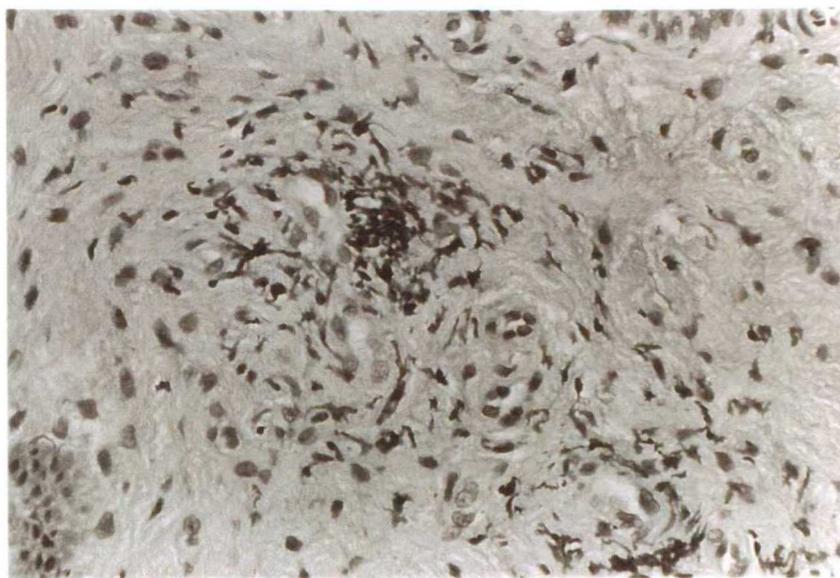


図56-1. 投与開始後5日目

各所に变形細胞が多数認められ、粘膜固有層の血管周囲にはとくに多数の細胞集塊がみられた。(×300)

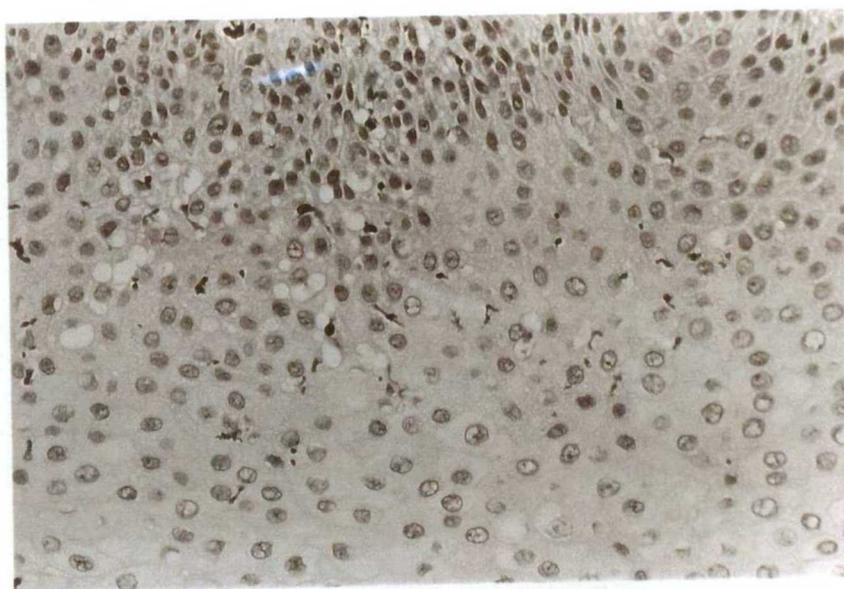


図56-2. 投与開始後5日目

基底膜部は凹凸が激しく、細胞の配列はやや不規則で増殖傾向が強く、上層になるに従い、核の膨化が認められる。变形細胞も多数認められる。(×300)

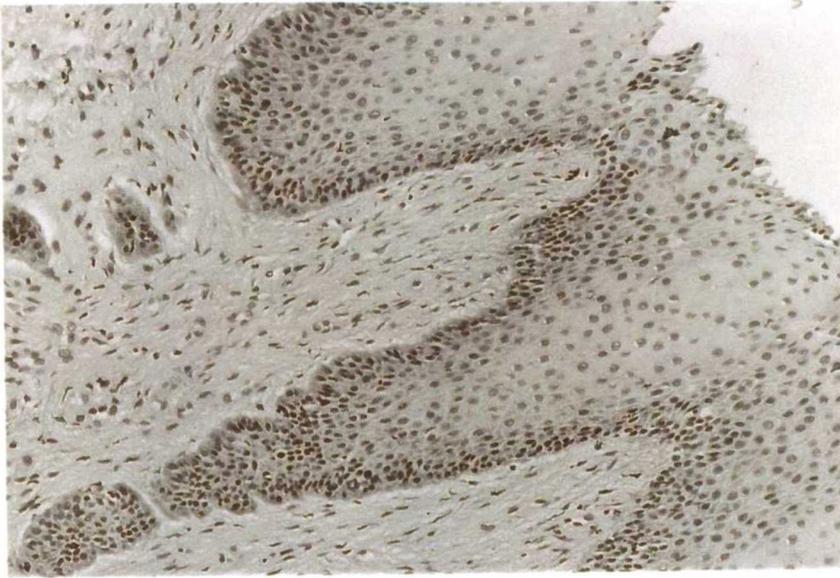


図56-3. 投与開始後5日目

上皮層の一部に乳頭状の過形成が認められ、細胞の配列はやや不規則となる。変形細胞は下織に多数認められる。血管の拡張は顕著でない。(×150)

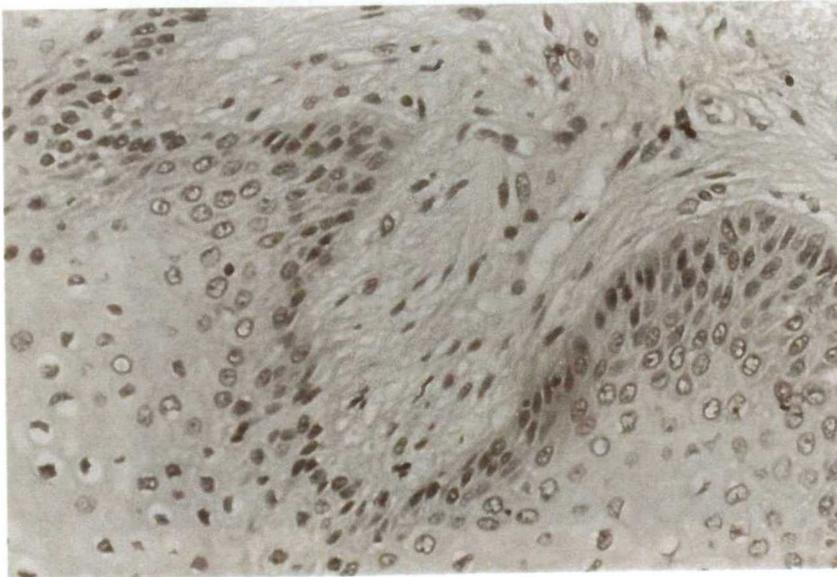


図57-1. 投与開始後9日目

上皮層の細胞の増殖がみられ、配列はやや不規則であった。下織の間質はやや疎造であった。変形細胞はわずかに認められた。(×300)

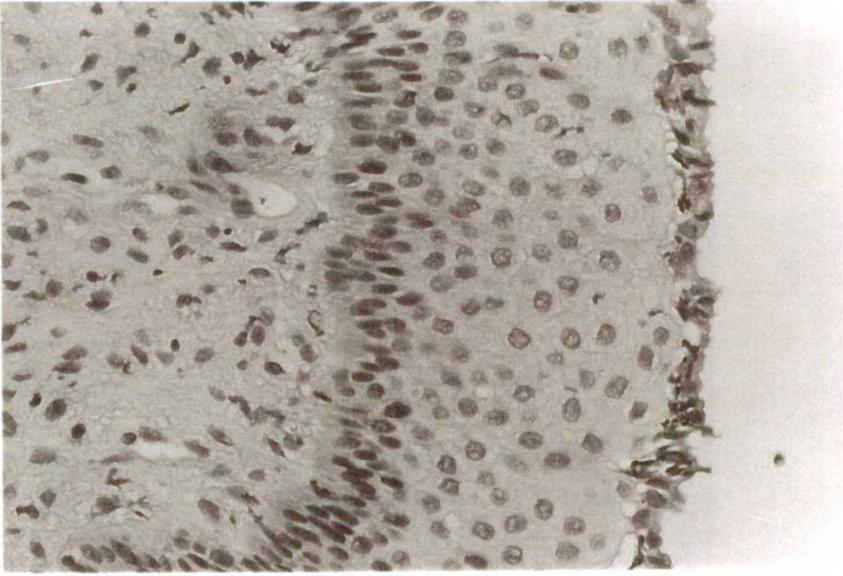


図57-2. 投与開始後9日目

上皮層の細胞の増殖がみられ、基底膜の上でその配列は縦列となり、粘膜上皮最上層には変形細胞と剥離上皮細胞の集合層が存在しているが不規則であった。(×300)

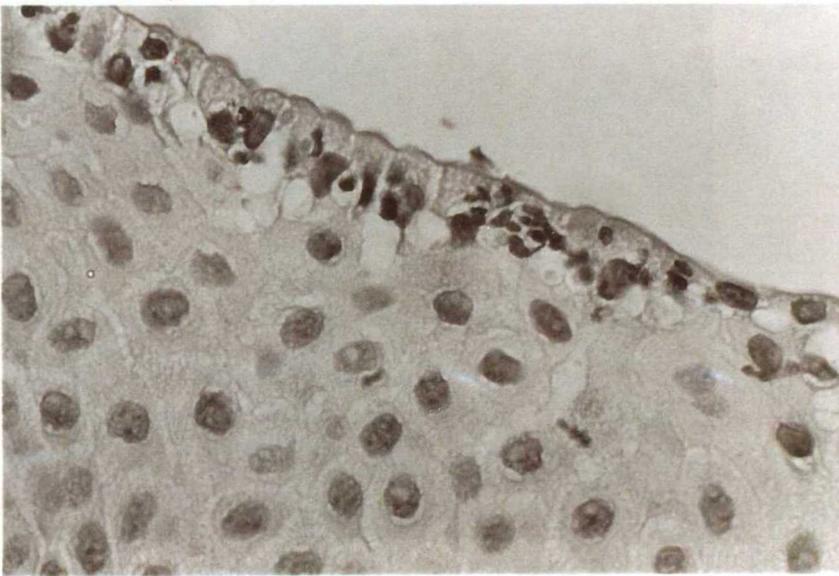


図57-3. 投与開始後9日目

上皮層の細胞の増数、上皮最上層に変形細胞の集合している像や剥離部分がみられる。(×600)

E₃連続3日投与（1.0, 2.0, 1.0 mg）豚No.70の上皮層と下織の図示
（図 58, 59-1, 2, 3, 4, 60）

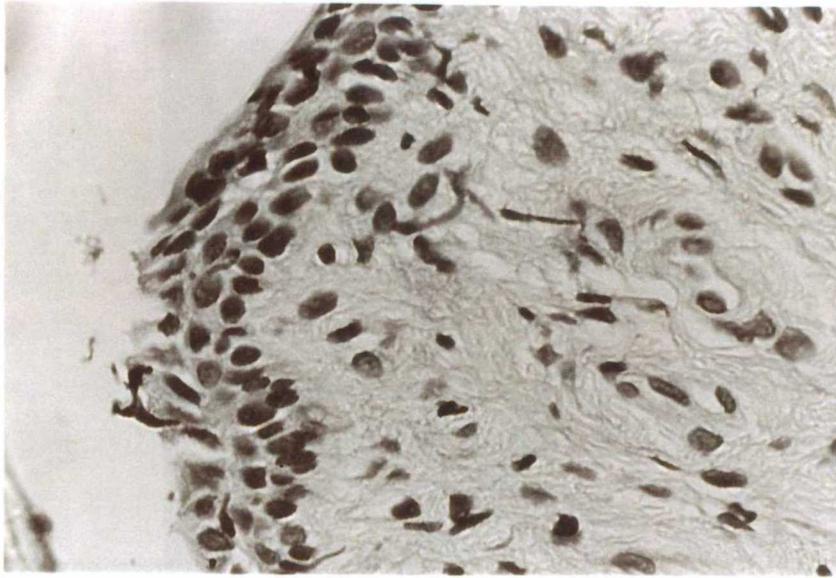


図58. 投与直前

上皮層の配列は数層で、少数の変形細胞がみられる。下織は血管拡張はなく、変形細胞も僅か認められる。（×450）



図59-1. 投与開始後4日目

上皮層の配列はやや不規則であるが肥厚が多少認められ、下織には円形細胞と変形細胞が認められる。リンパ管、血管拡張はみられない。間質は疎造感を呈している。（×300）

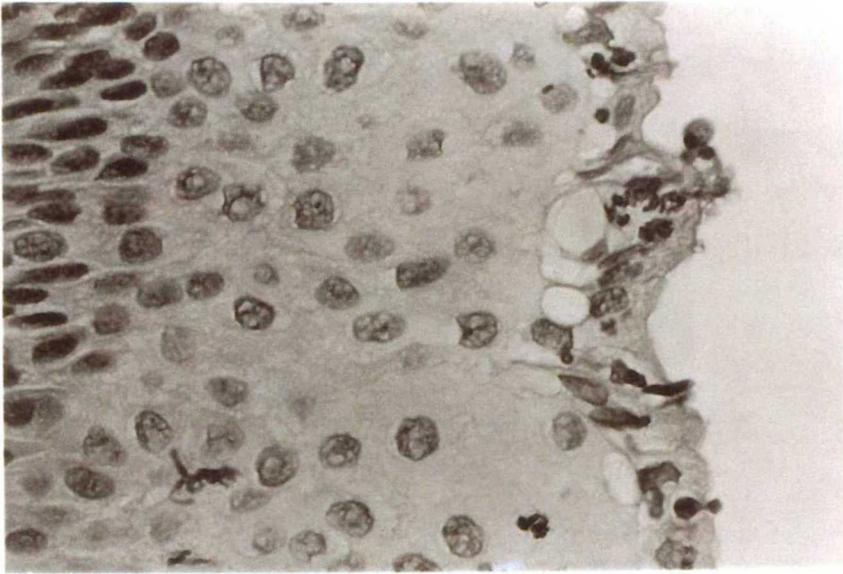


図59-2. 投与開始後4日目

上皮層の増殖が強く、基底膜近くの細胞は細い紡錘形を呈し、表層には遊走細胞が認められる。

(×600)

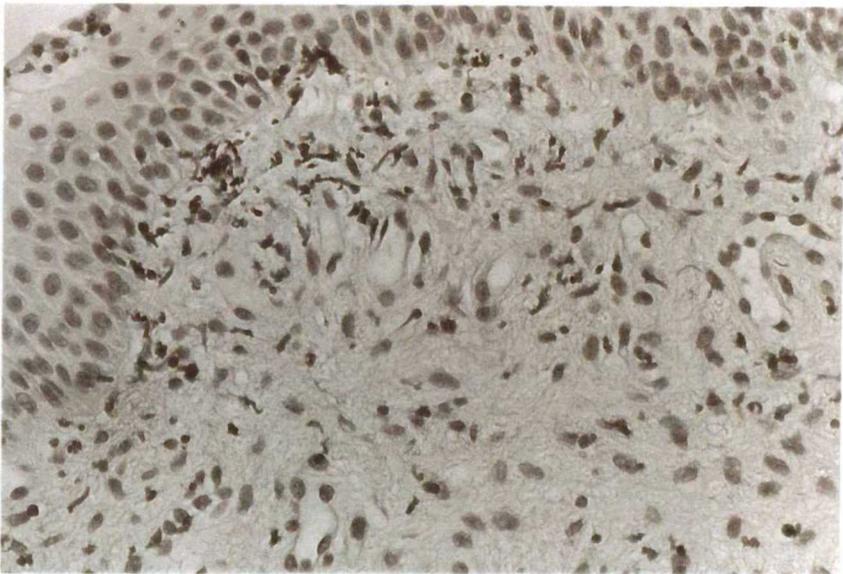


図59-3. 投与開始後4日目

上皮層の多層化が強く、基底膜近くの細胞は紡錘形を呈し、変形細胞の集合も認められる。血管拡張はみられない。

(×300)

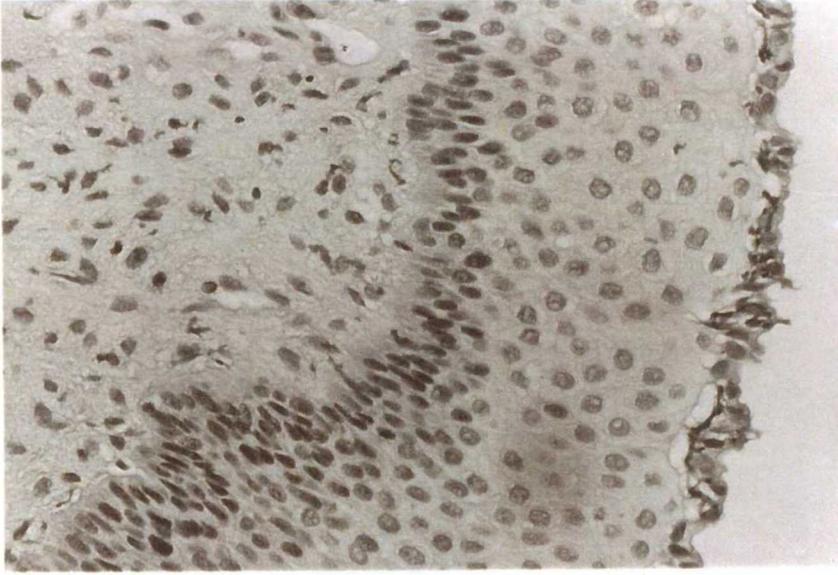


図59-4. 投与開始後4日目

上皮層は多層で、その中に変形細胞の集合したもの、あるいは散在的なものが認められる。基底膜は凹凸が激しく、細胞の配列はやや不規則である。変形細胞は基底膜のしたや下織に散在的に認められる。遊走細胞が上皮表層部に帯状に認められる。(×300)

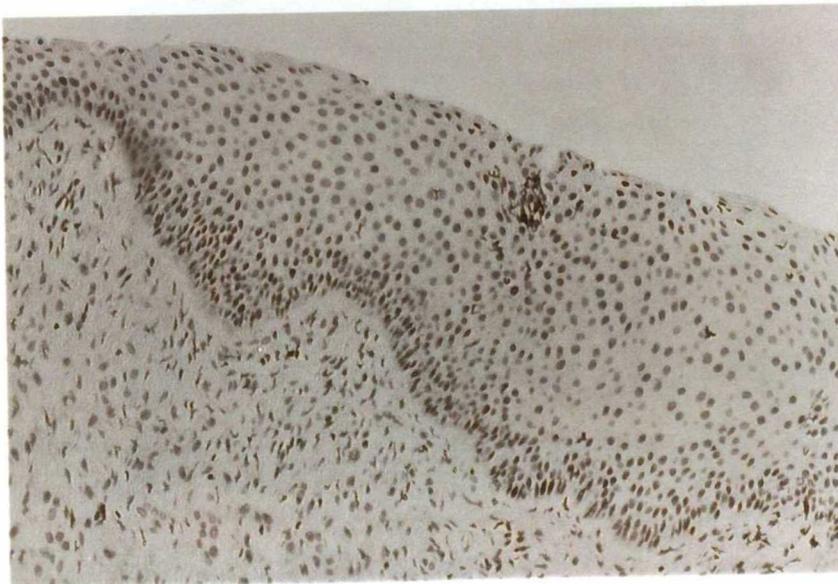


図60. 投与開始後9日目

上皮層は多層で、その中に変形細胞の集合したもの、あるいは散在的なものが認められる。血管拡張は認められない。(×150)

P連続3日投与 (40mg×3) 豚No.70の上皮層と下織の図示
(図61-1, 2, 3, 62-1, 2, 63-1, 2, 3)



図61-1. 投与直前

上皮層は不整形で表層の剥離が顕著で小嚢胞が多数認められる。
下織は変形細胞が若干みられる。血管の拡張はない。
(×150)

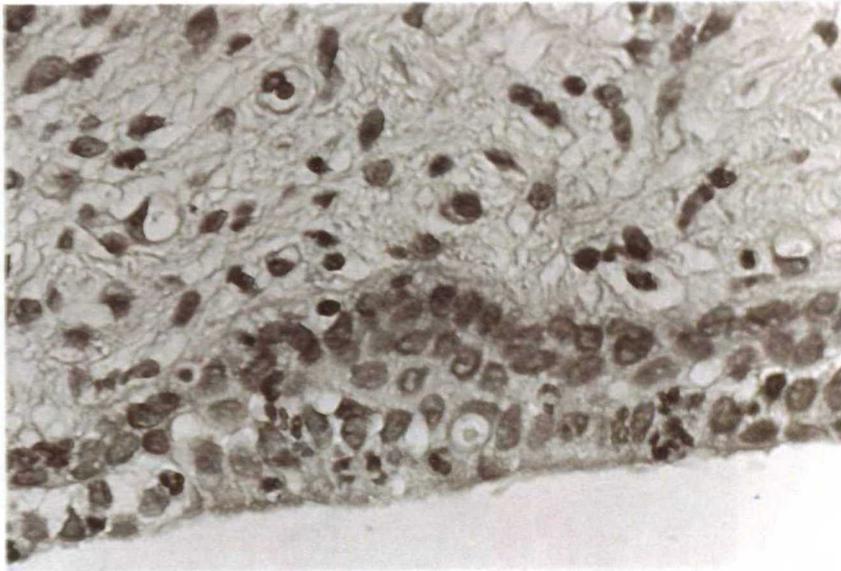


図61-2. 投与直前

上皮層の増殖はなく、細胞配列は粗である。変形細胞が一部
みられる。下織には円形細胞が散在しており、血管の拡張はない。
(×600)

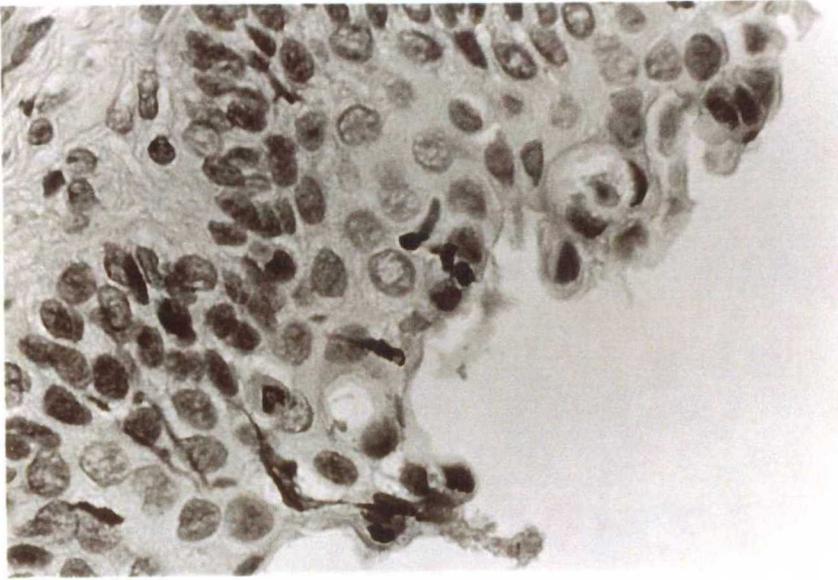


図61-3. 投与直前

上皮層の増殖はなく、細胞配列は不規則であり、変形細胞も若干みられる。下織には円形細胞が散在しており、表面は不整形を示し剥離も認められる。(×600)

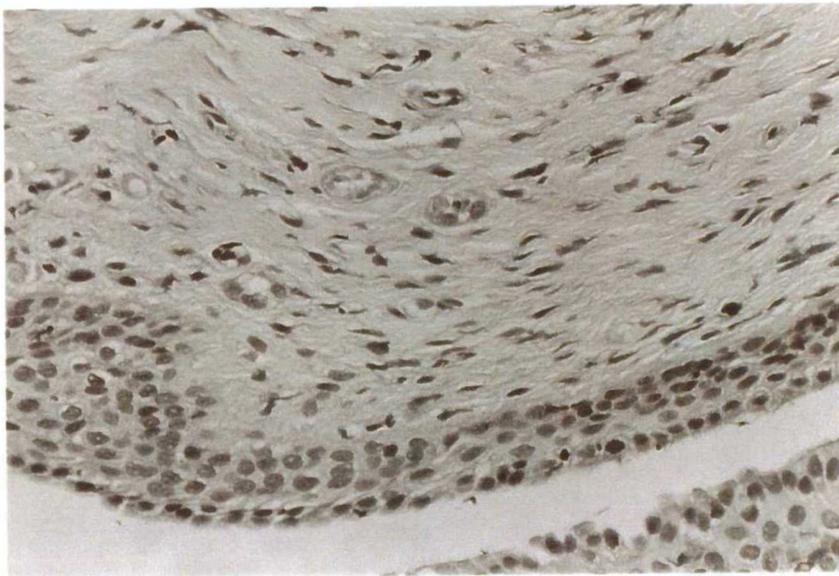


図62-1. 投与開始後4日目

上皮層は増殖像はなく、下織に散在的に少数の変形細胞がみられ、血管の拡張はない。(×300)

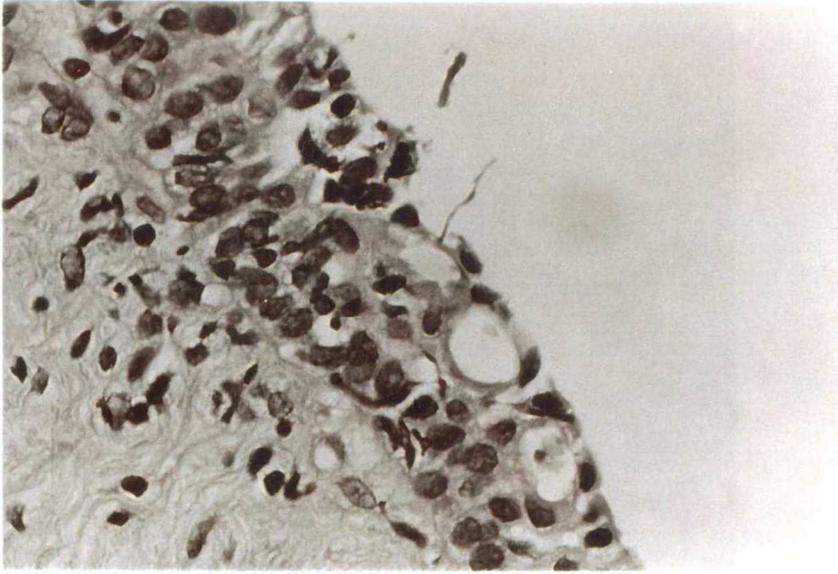


図62-2. 投与開始後4日目

上皮層は増殖像はないが、空胞箇所が存在し、局所ではあるが遊走細胞が多数認められる。下織は円形細胞、変形細胞の集合所見も認められる。(×600)

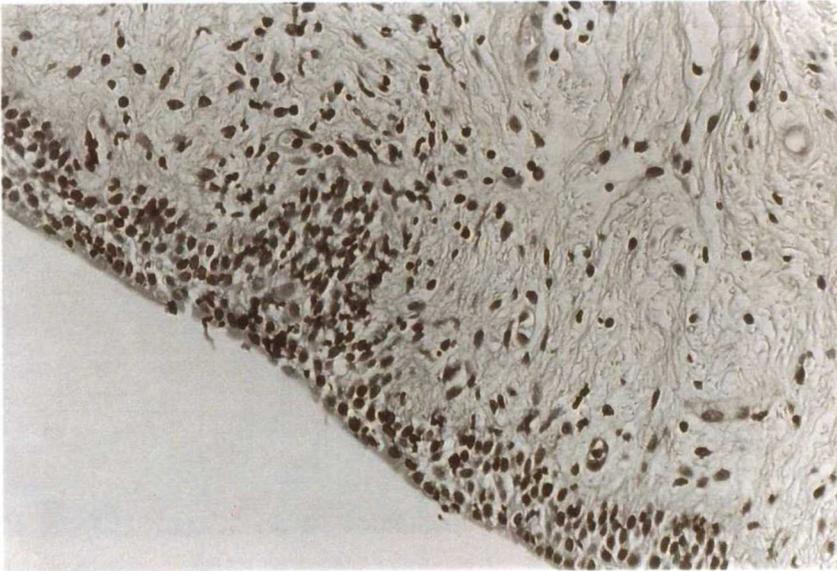


図63-1. 投与開始後9日目

上皮層は増殖像はなく、局所的に変形細胞、遊走細胞が多数みられる。下織にも円形細胞、変形細胞の集合がみられる。(×150)

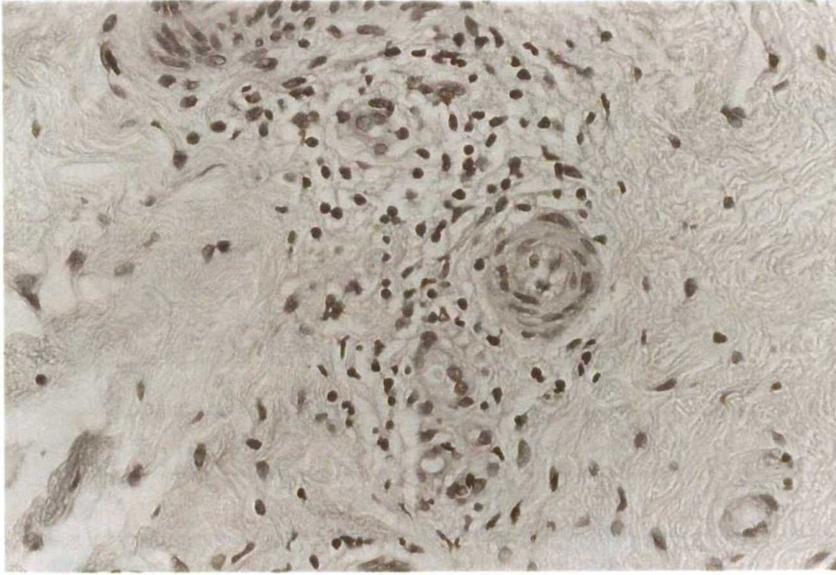


図63-2. 投与開始後9日目

下織の血管周囲に小型の細胞および円形細胞、変形細胞の集合箇所を示す。(×150)

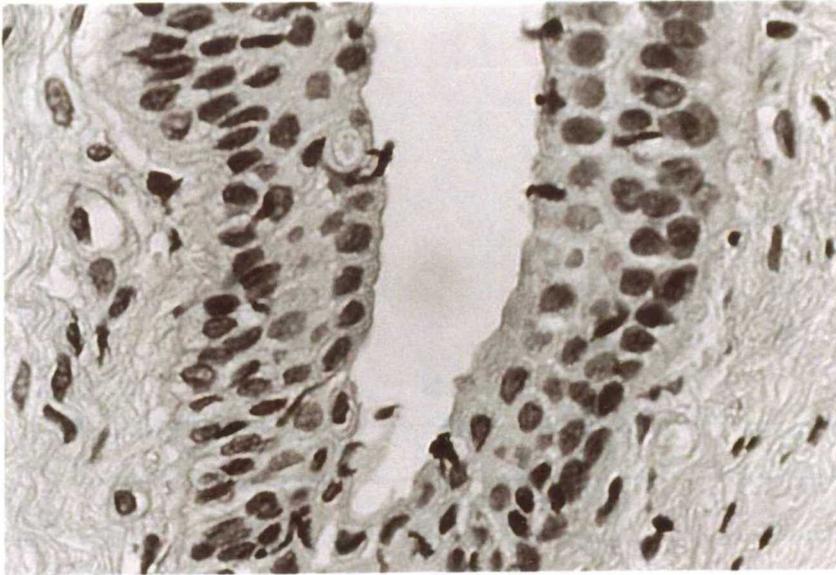


図63-3. 投与開始後9日目

上皮層内と表層部に変形細胞が少数認められる。(×400)

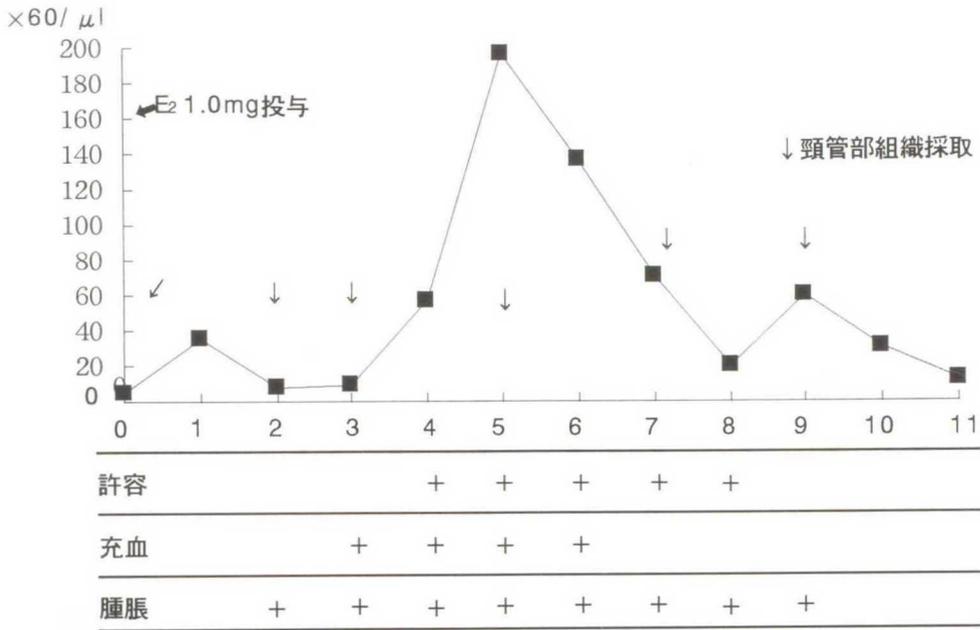


図64. No.138 への E₂ 1.0mg 投与による頸管粘液中の好中球数と外部徴候

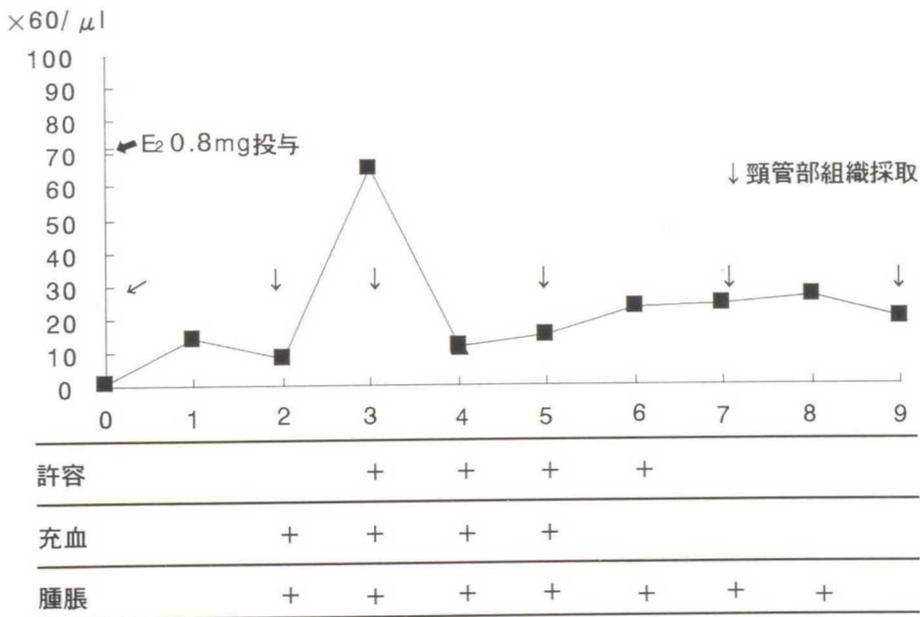


図65. No.154 への E₂ 0.8mg 投与による頸管粘液中の好中球数と外部徴候

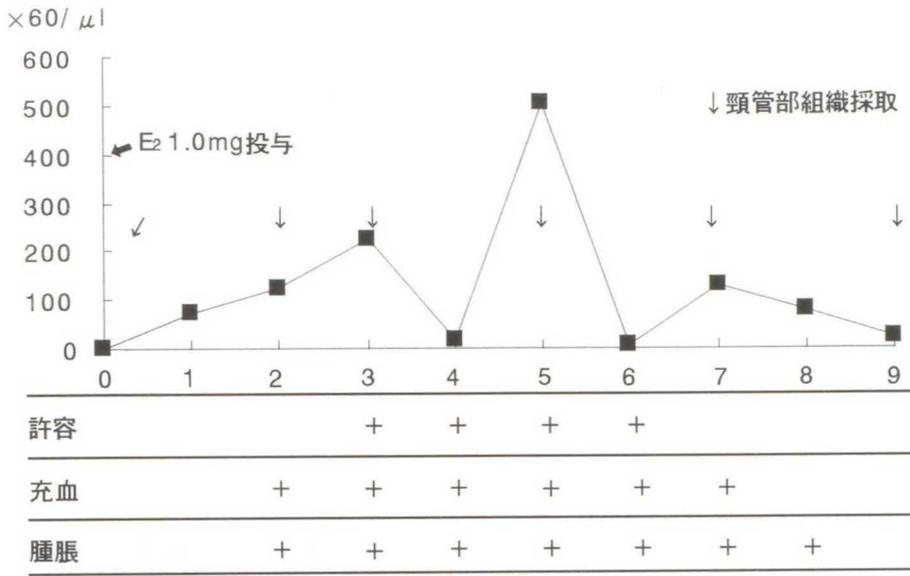


図66. No.164への E2 1.0mg 投与による頸管粘液中の好中球数と外部徴候

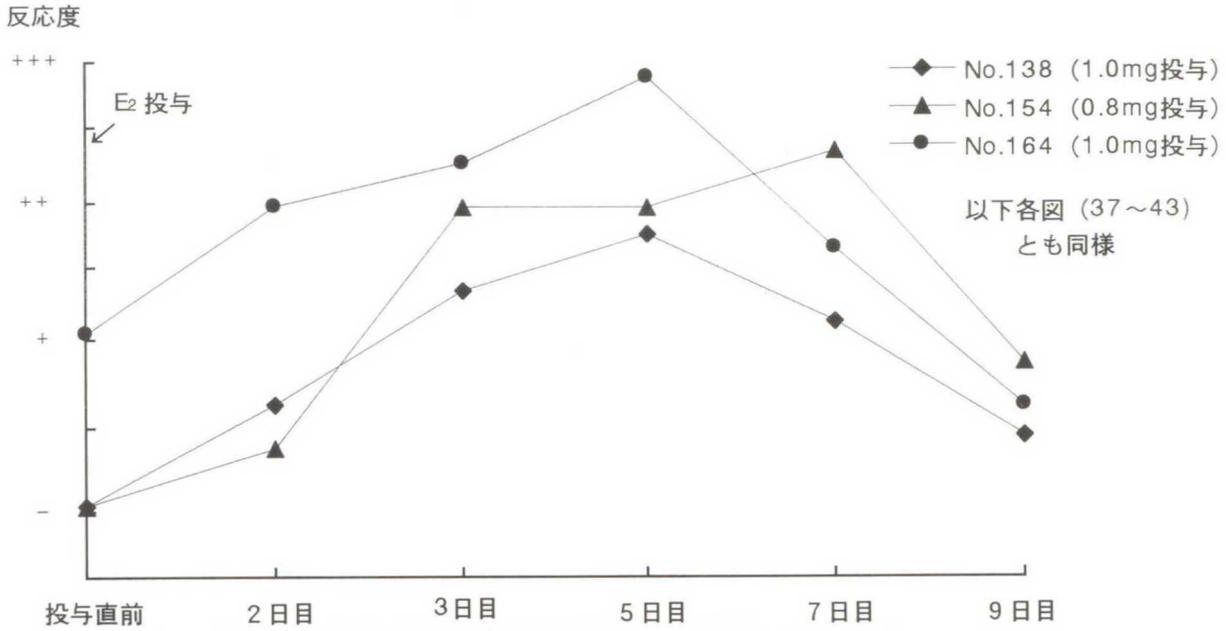


図67. E₂投与による頸管部粘膜上皮細胞層の増殖度

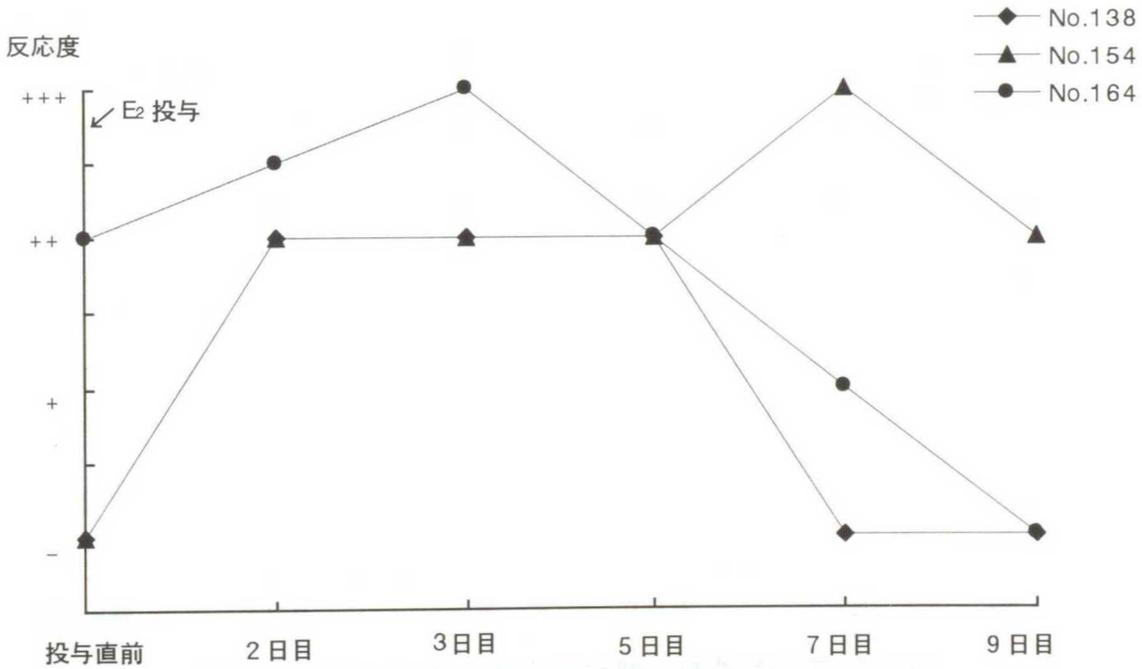


図68. E₂投与による頸管部粘膜上皮細胞層への変形細胞の侵入度

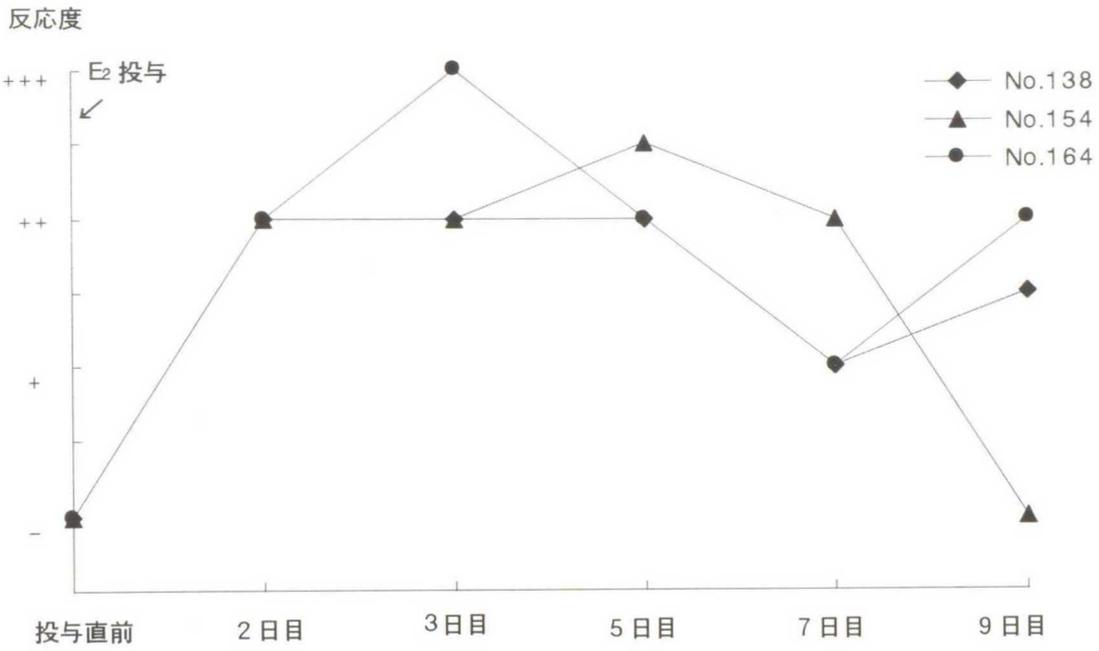


図69. E₂投与による頸管部粘膜下織層への変形細胞の浸潤度

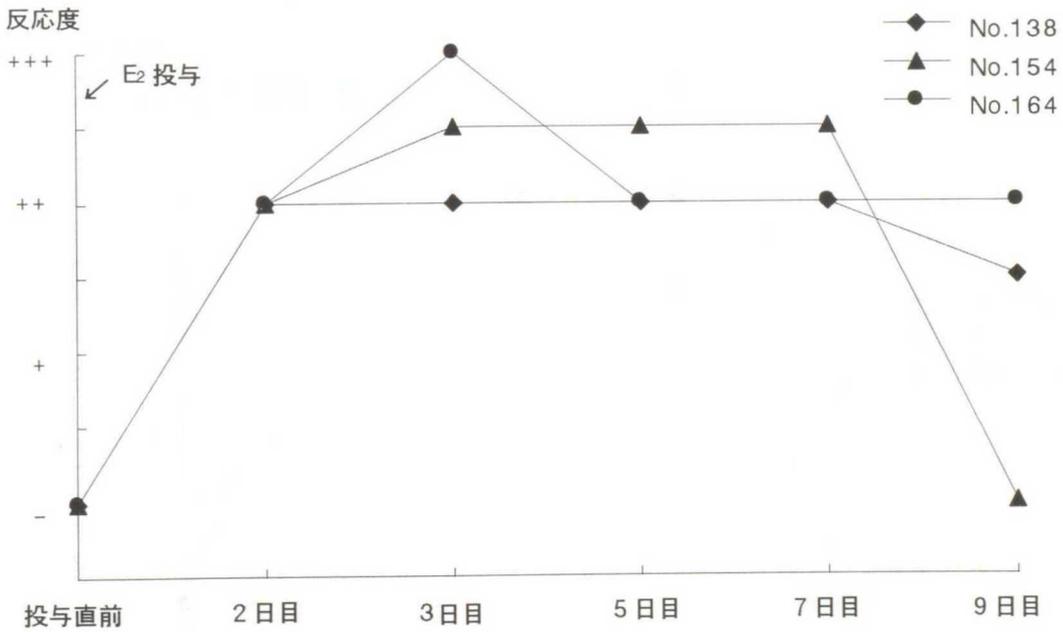


図70. E₂投与による頸管部粘膜下織層の血管拡張度

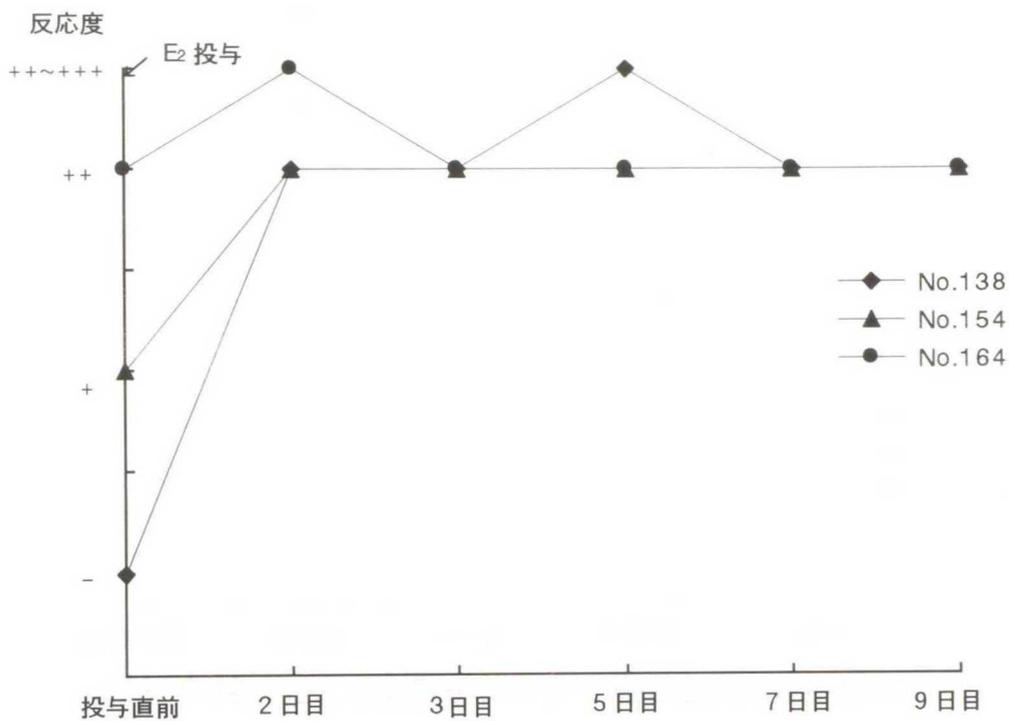


図71. E2投与による頸管部粘膜固有層への変形細胞の浸潤度

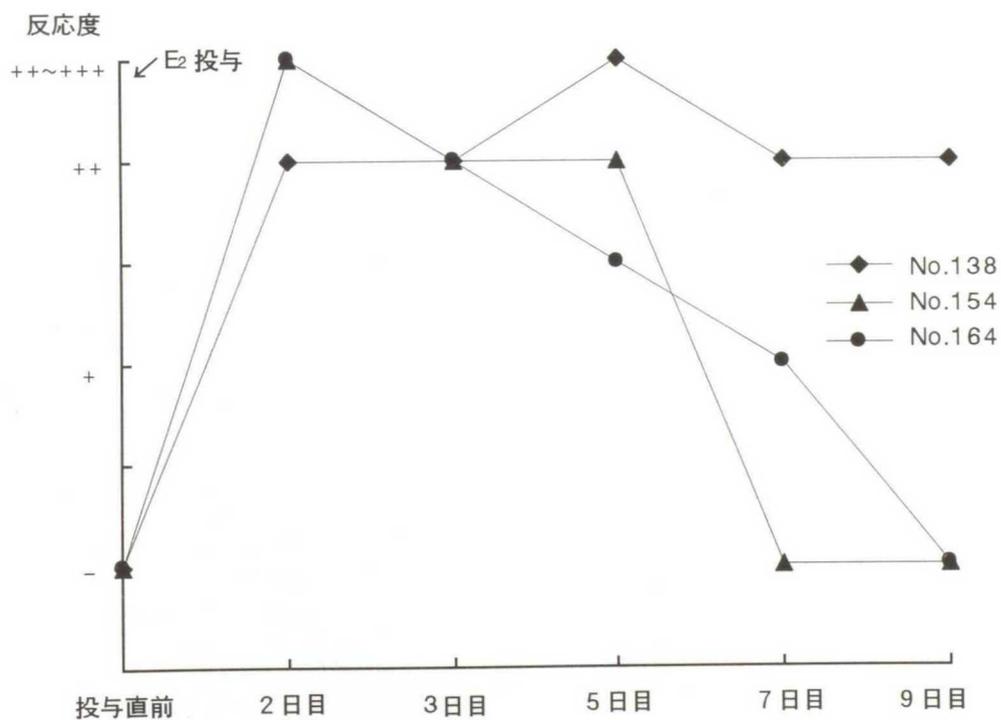


図72. E2投与による頸管部粘膜固有層の血管内腔の拡張度

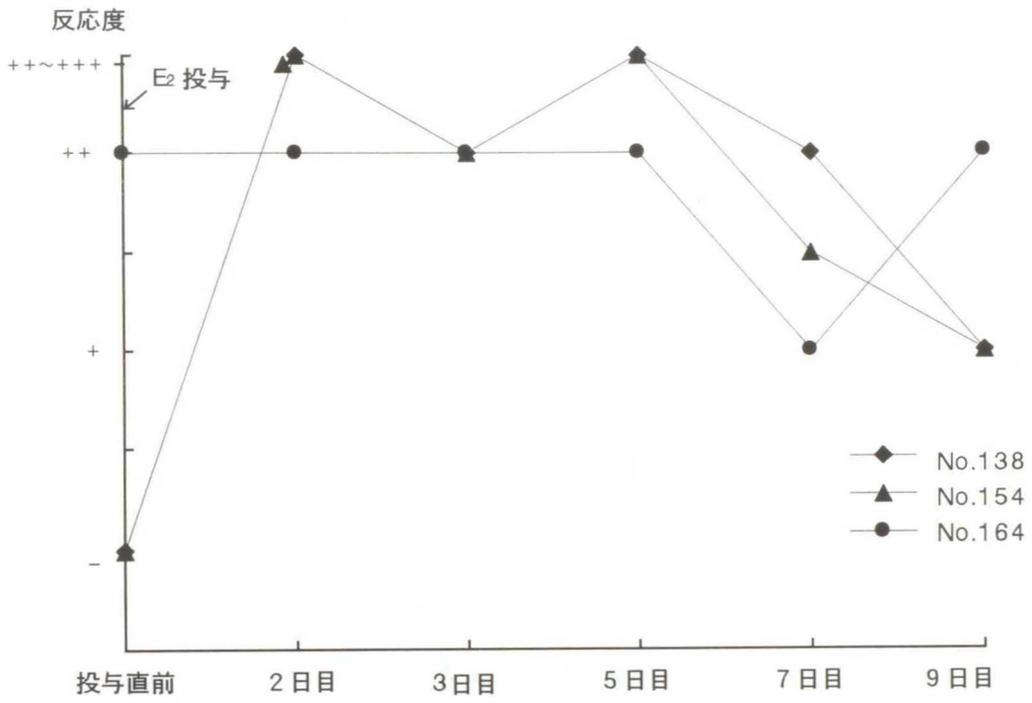


図73. E₂投与による頸管部粘膜固有層の血管内好中球の出現度

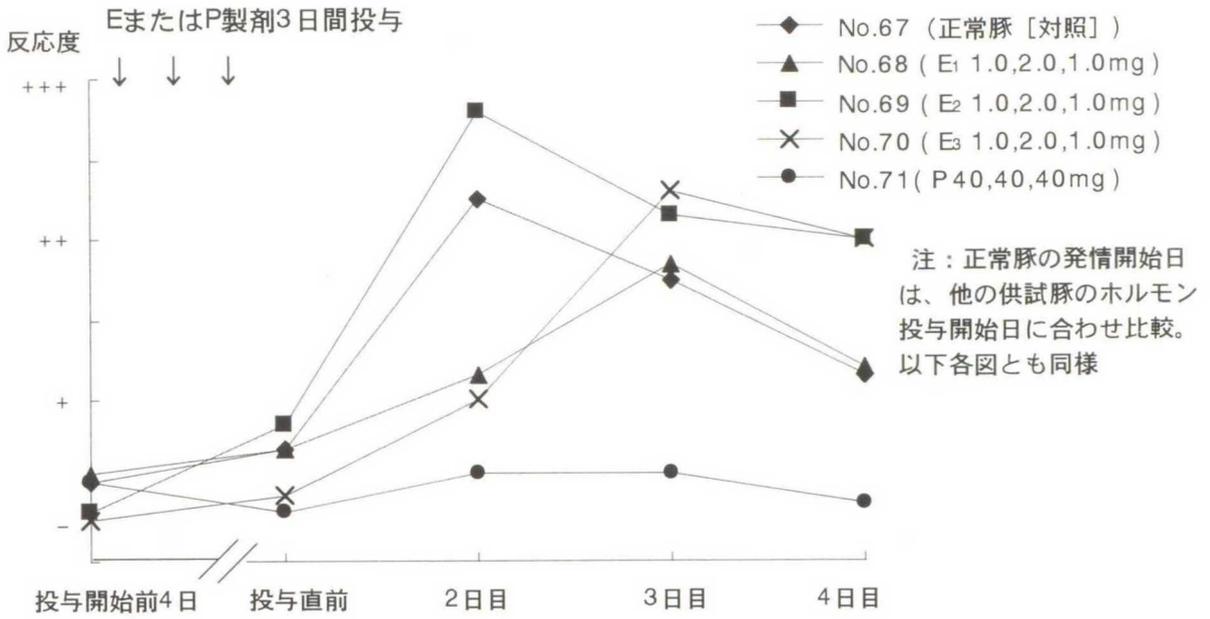


図74. EまたはP投与による頸管粘膜上皮細胞層の増殖度

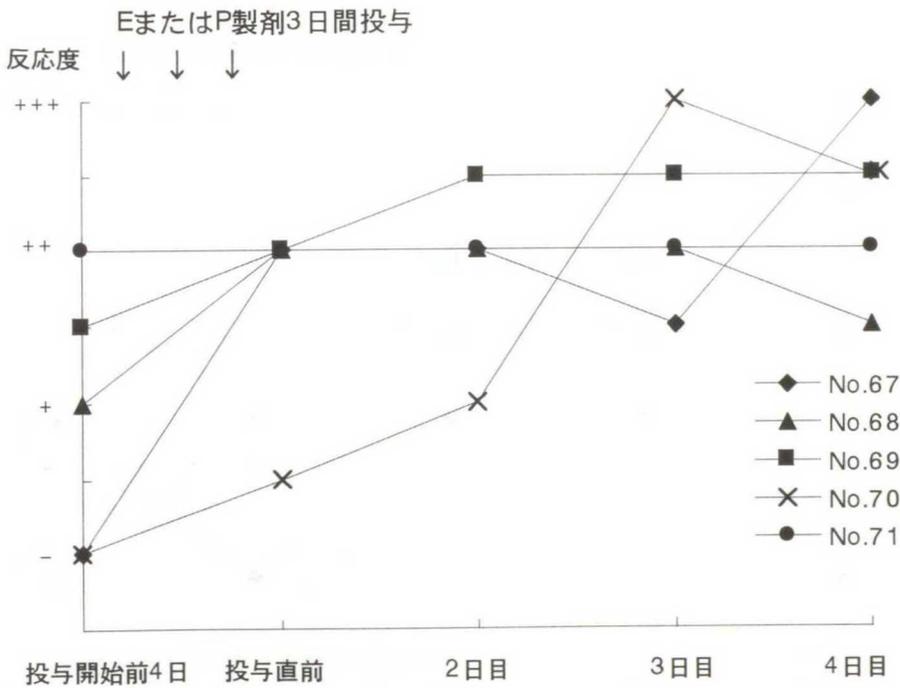


図75. EまたはP投与による頸管部粘膜上皮細胞層への変形細胞の侵入

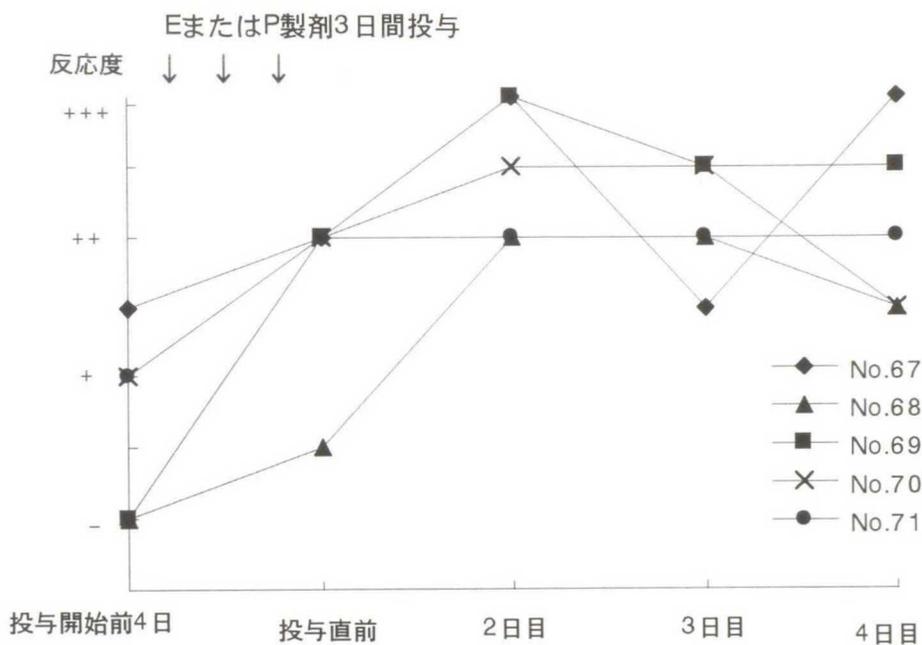


図76. EまたはP投与による頸管部粘膜下織層への変形細胞の浸潤度

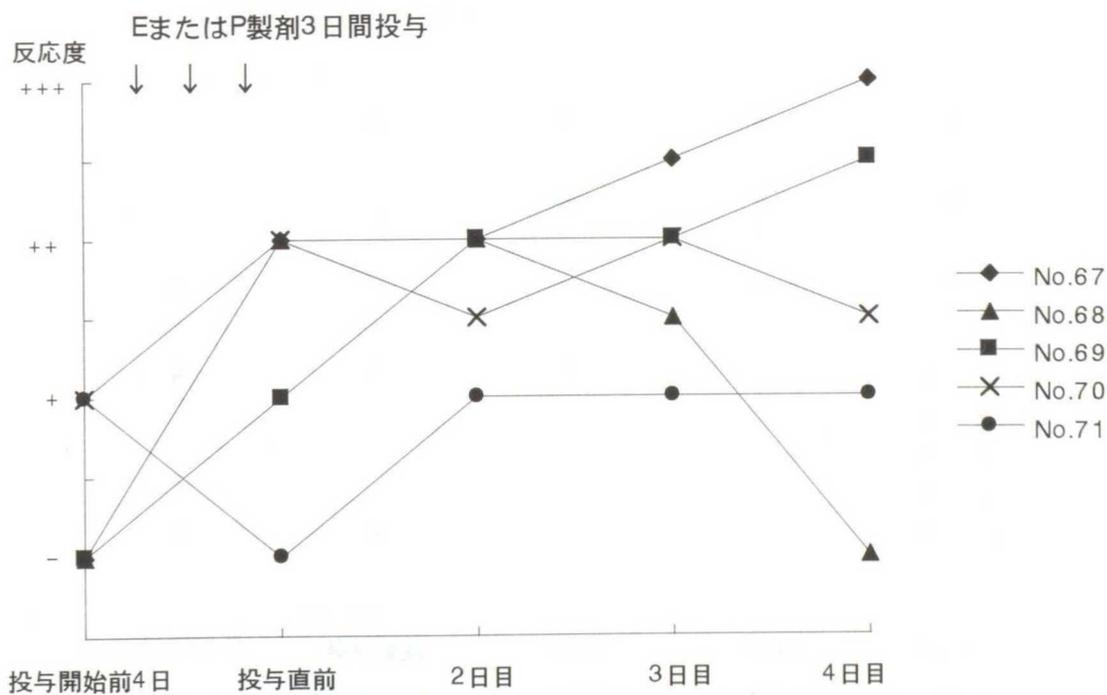


図77. EまたはP投与による頸管部粘膜下織層の血管内腔の拡張度

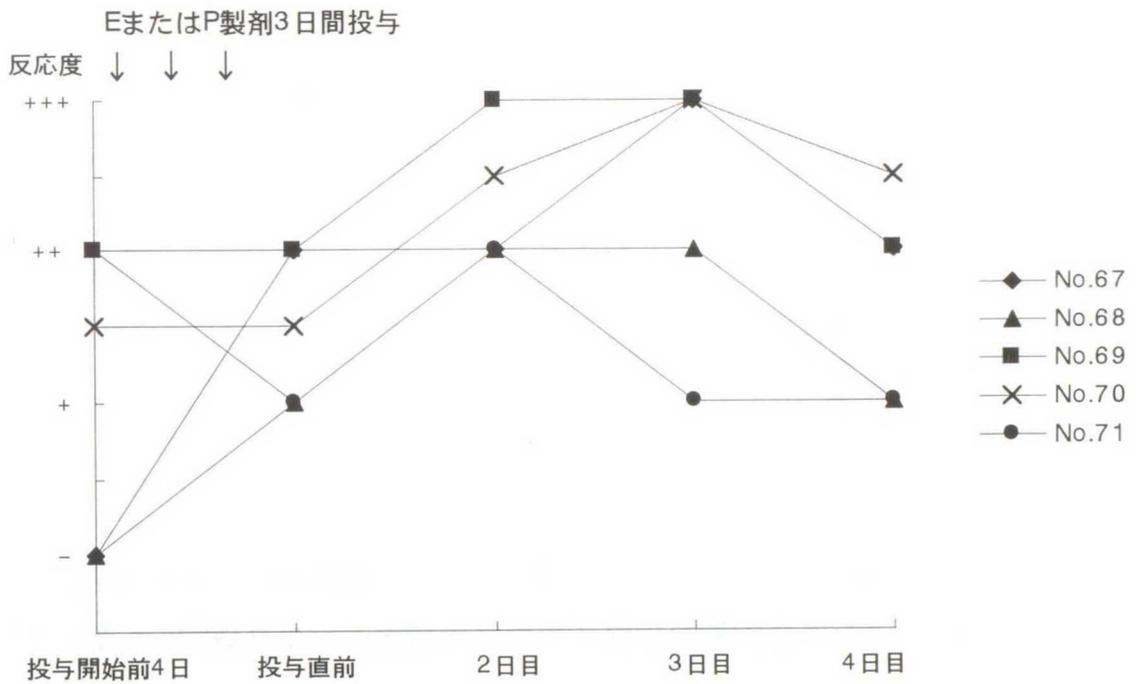


図78. EまたはP製剤投与による頸管部粘膜固有層への変形細胞の浸潤度

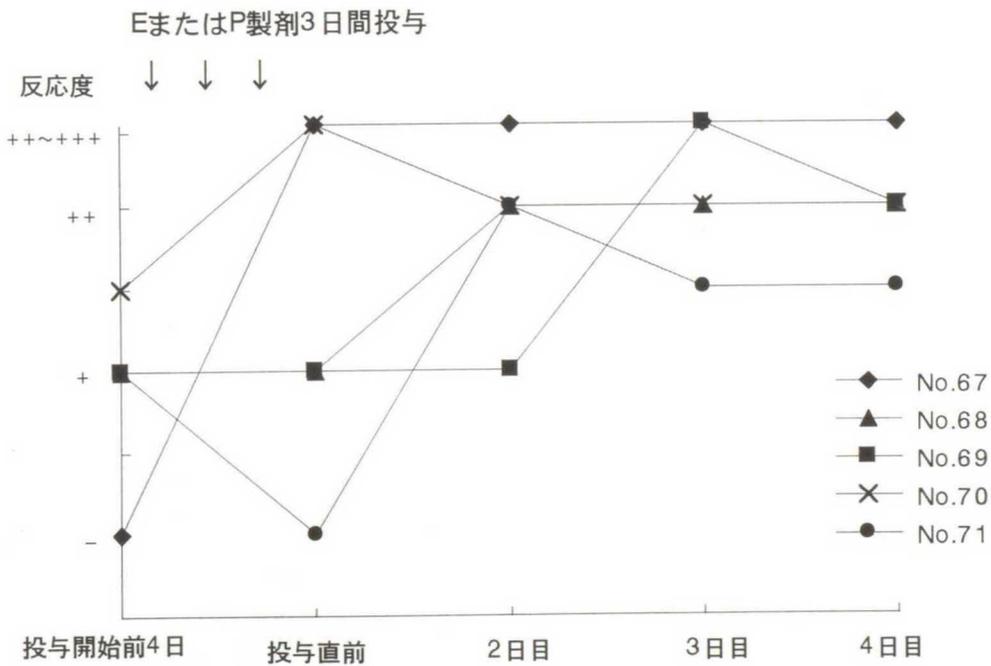


図79. EまたはP製剤投与による頸管部粘膜固有層の血管内腔の拡張度

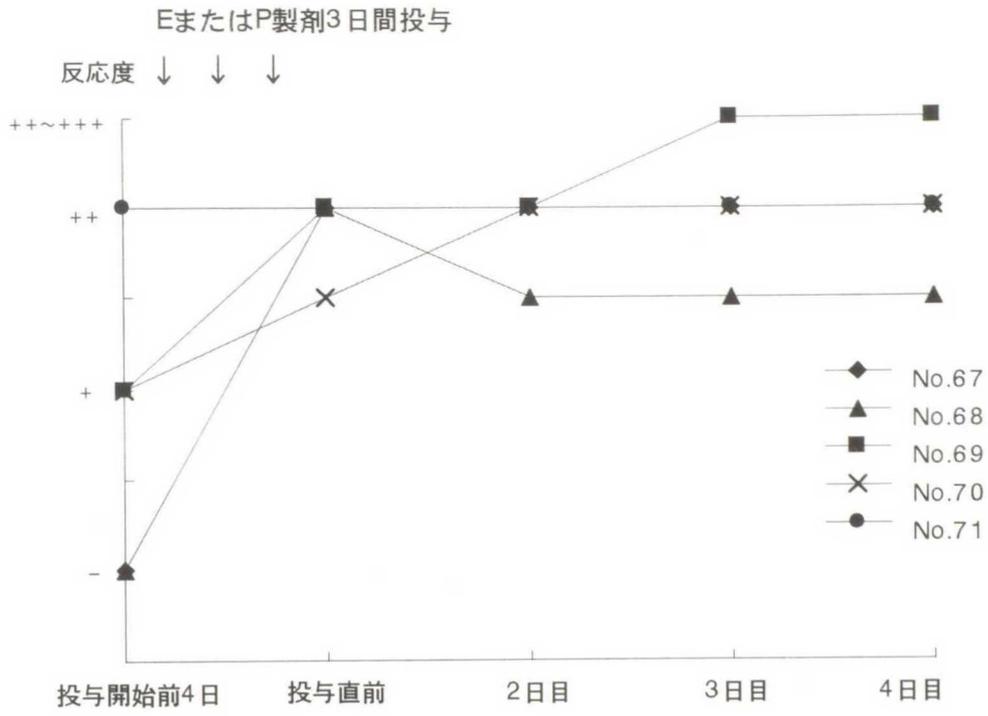


図80. EまたはP投与による頸管部粘膜固有層の血管内白血球の出現の程度

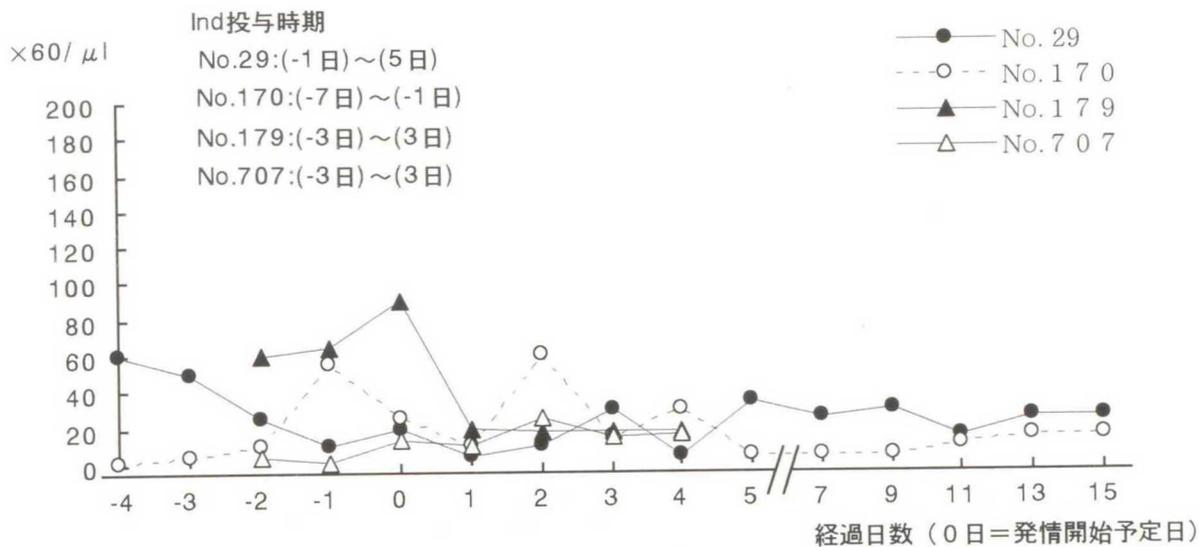


図 81. Ind 投与豚群の頸管粘液中の好中球数の推移

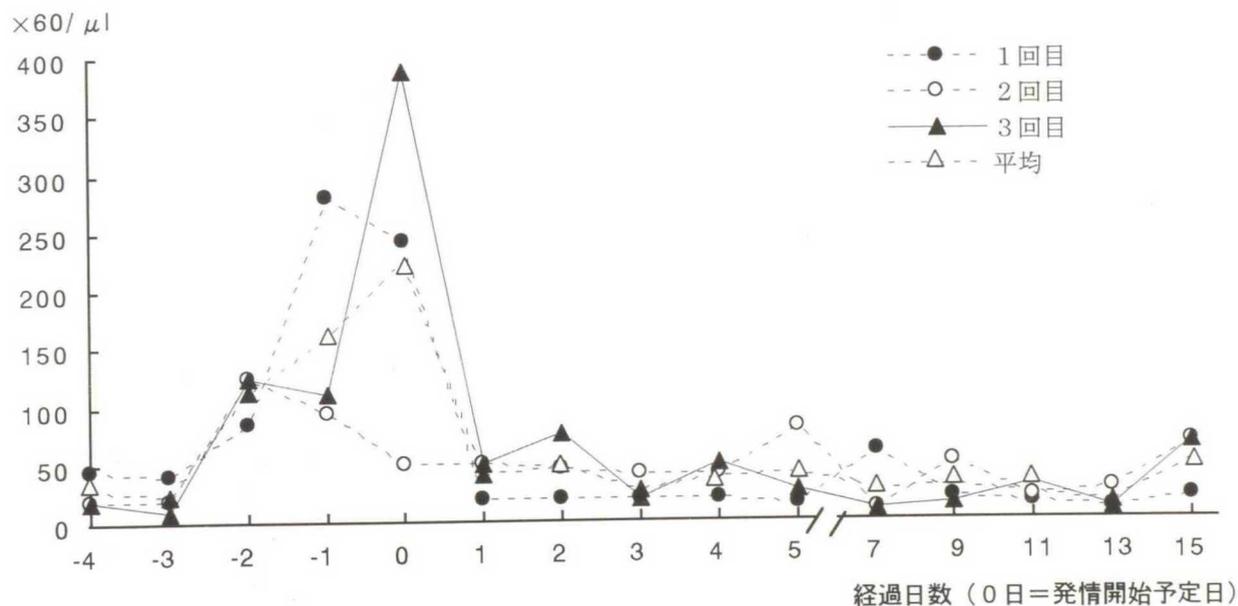


図 82. Ind 無投与豚 (No.631)の頸管粘液中の好中球数の推移 (3 発情周期)

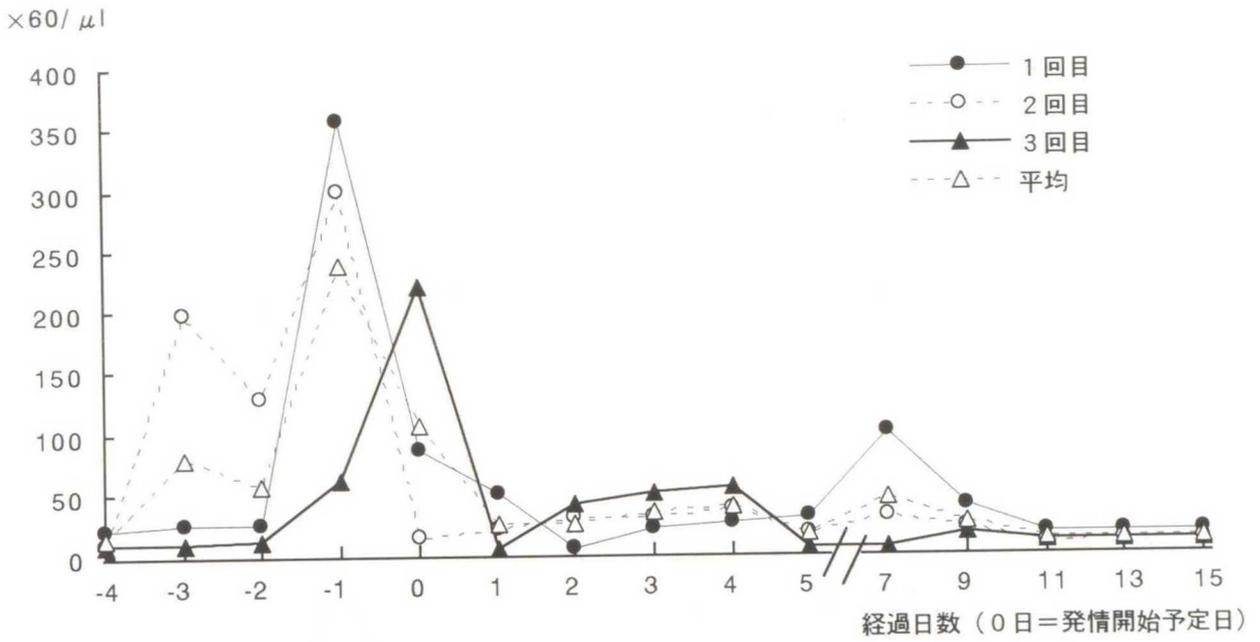
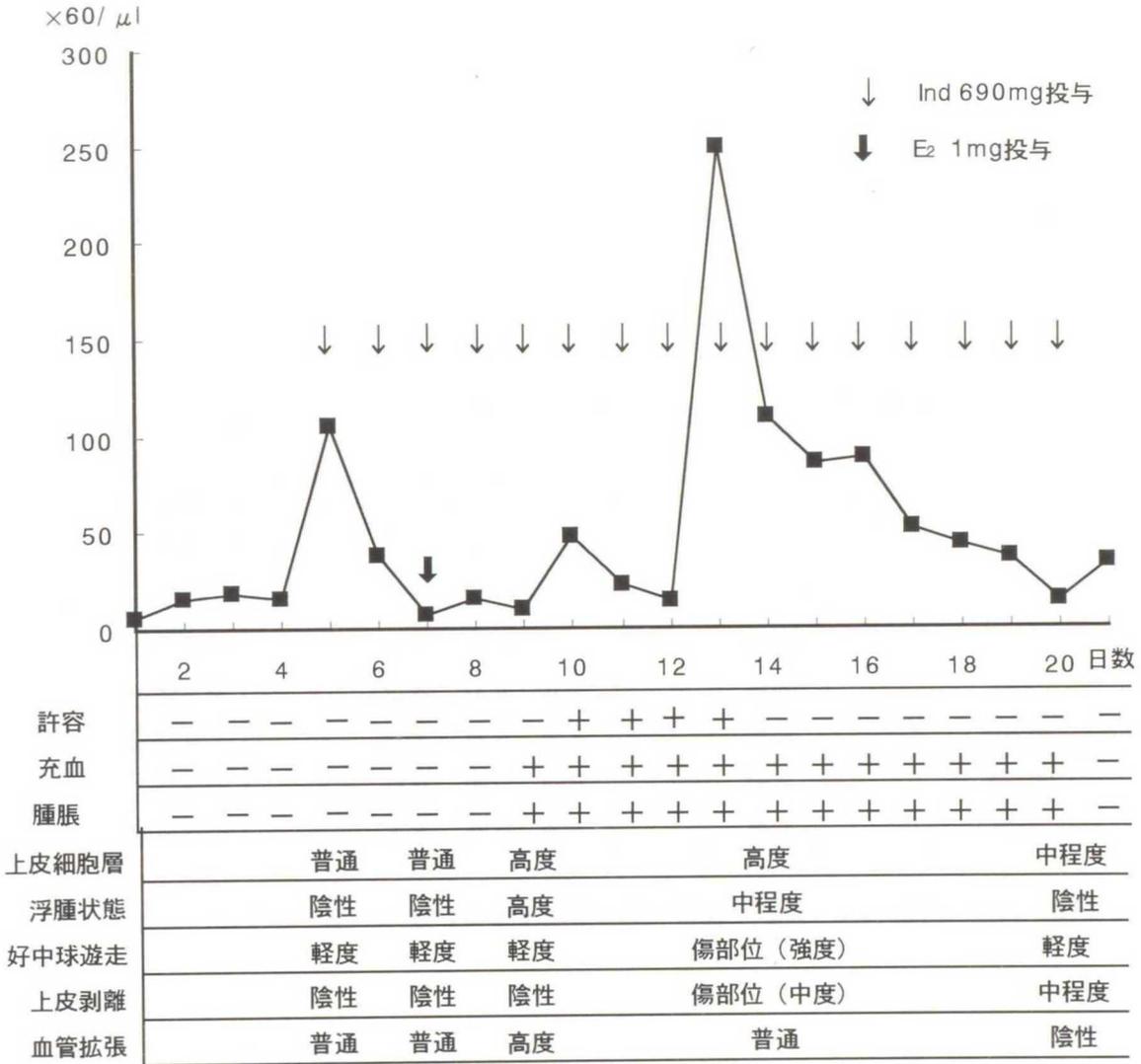


図 83. Ind 無投与豚 (No.846) の頸管粘液中の好中球数の推移 (3 発情周期)



傷部位：バイオプシー痕と推定

図 84. No.196 へのInd 投与による頸管粘液中の好中球数、外部徴候と組織学的変化

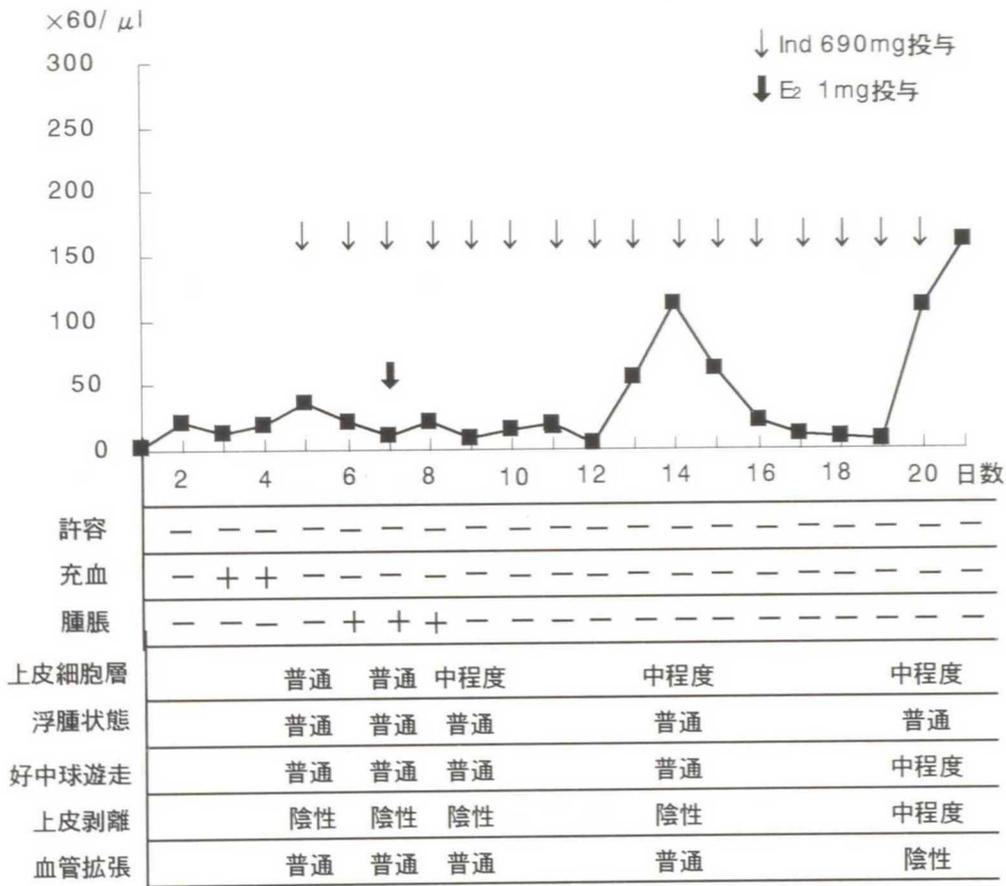
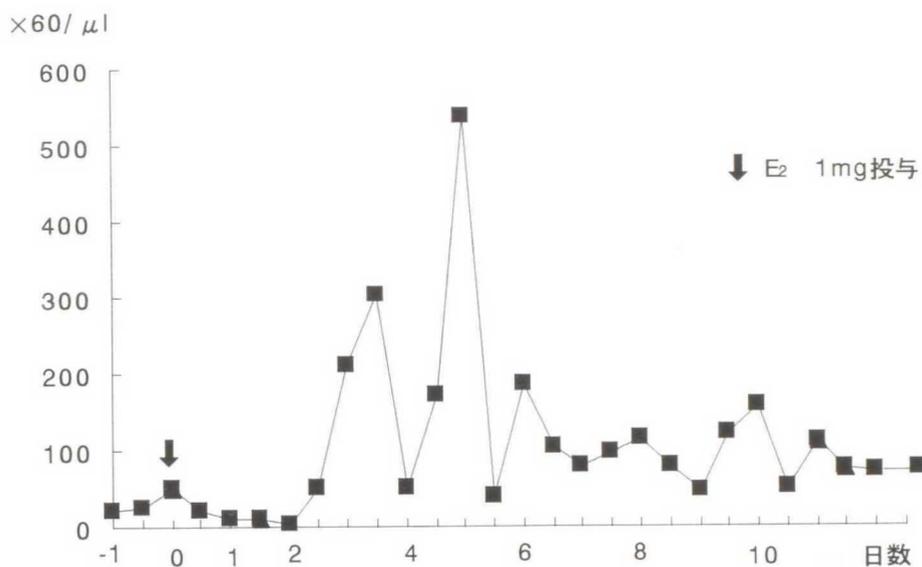
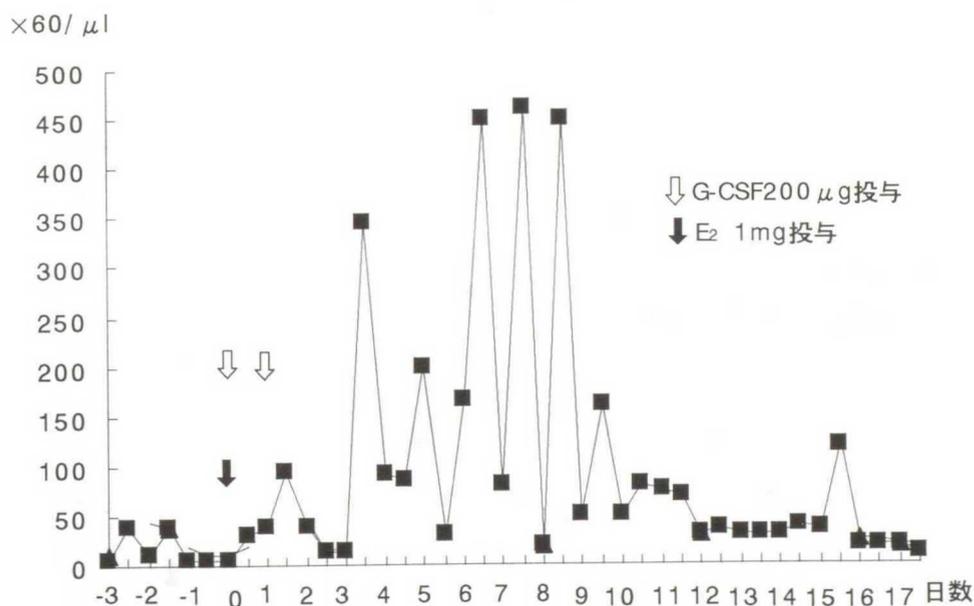


図85. No.207へのInd投与による頸管粘液中の好中球数、外部徴候と組織学的変化



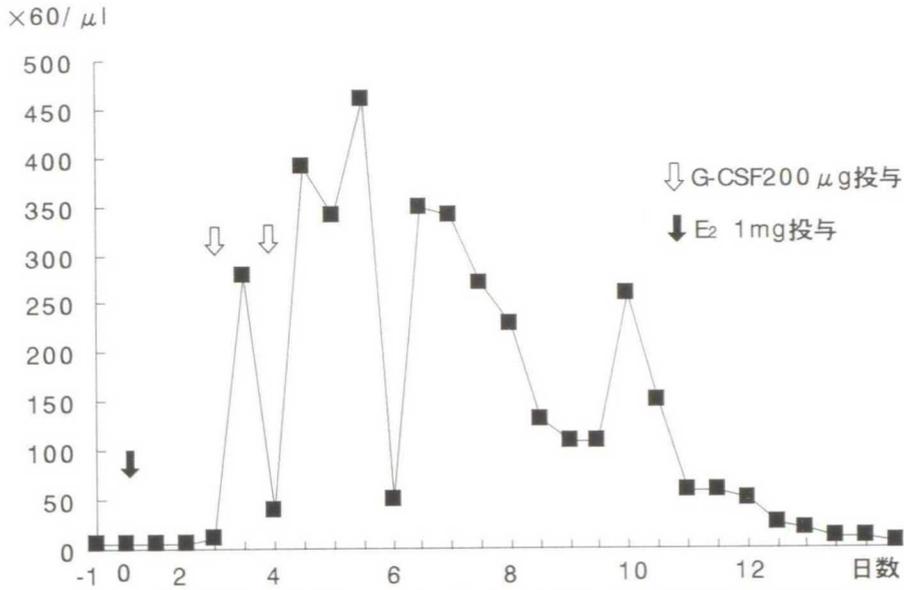
許容		+	+	+				
充血		+	+	+	+	+	+	
腫脹		+	+	+	+	+	+	+

図 86. No.138へのE2投与による頸管粘液中好中球数と外部徴候の推移



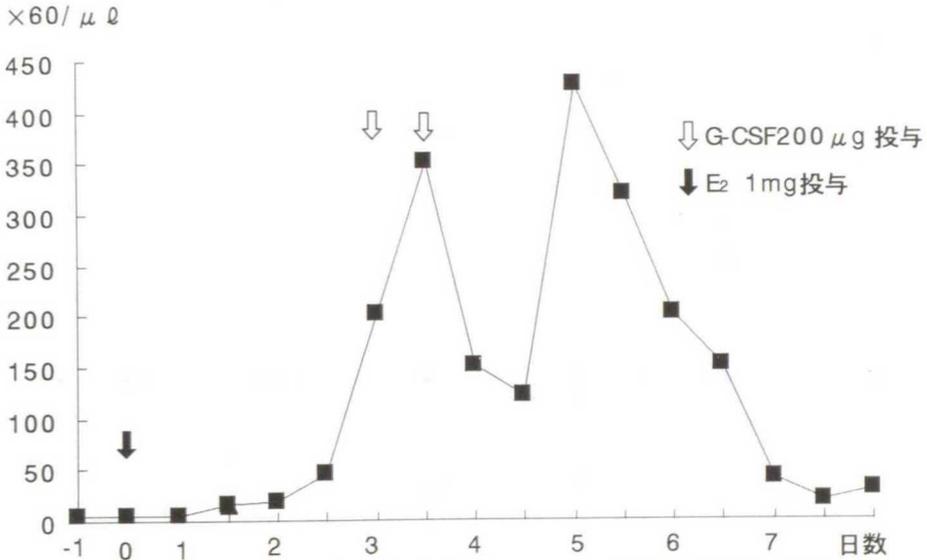
許容		+	+	+	+	+	+
充血		+	+	+	+	+	+
腫脹		+	+	+	+	+	+

図 87. No.138へのE2とG-SCF併用投与による頸管粘液中好中球数と外陰部徴候の推移



許容				+	+	+	+	+			
充血		+	+	+	+	+					
腫脹		+	+	+	+	+	+				

図 88. No.138 への E₂ と G-SCF 併用投与による頸管粘液中好中球数と外部徴候の推移



許容					+	+	+	+		
充血		+	+	+	+	+	+	+	+	+
腫脹		+	+	+	+	+	+	+	+	

図 89. No.138 への E₂ と G-CSF 併用投与による頸管粘液中好中球数と外陰部徴候の推移

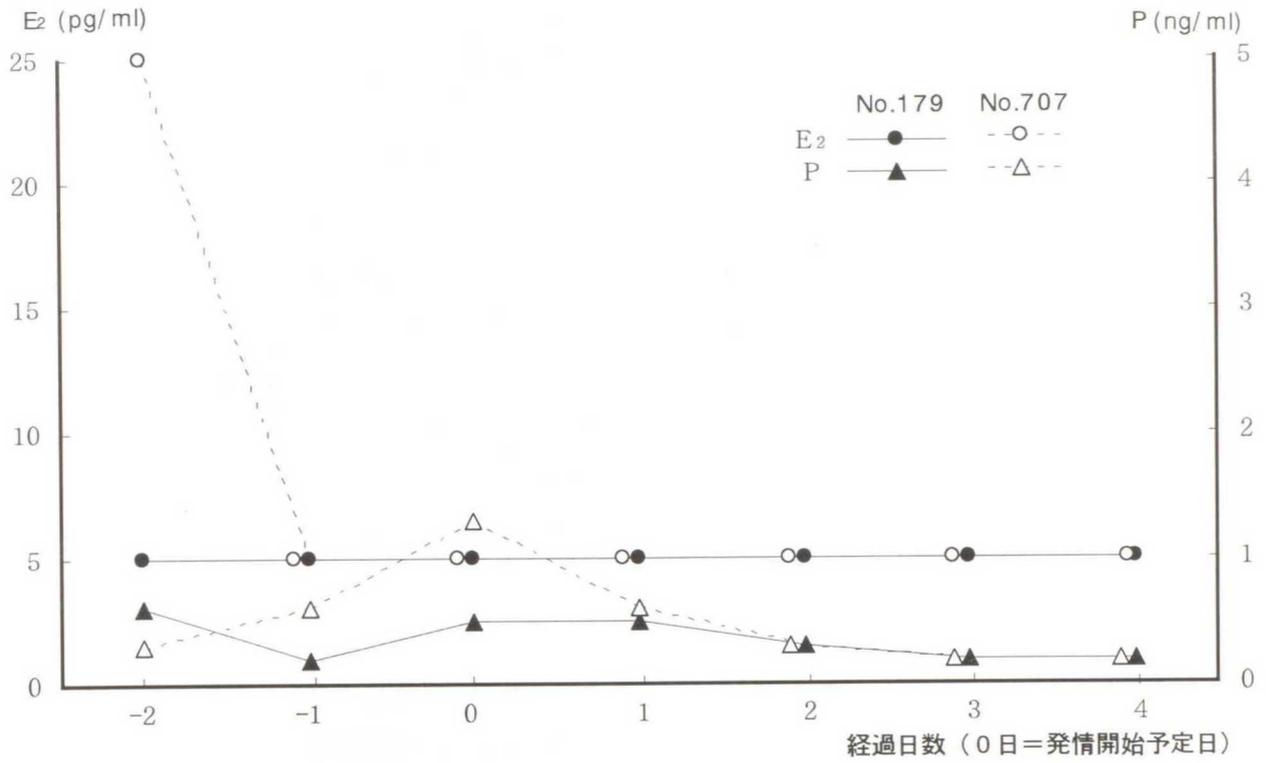


図 90. Ind 投与豚 (-6日~-1日の間連続投与) の血中 E₂、P 濃度の推移

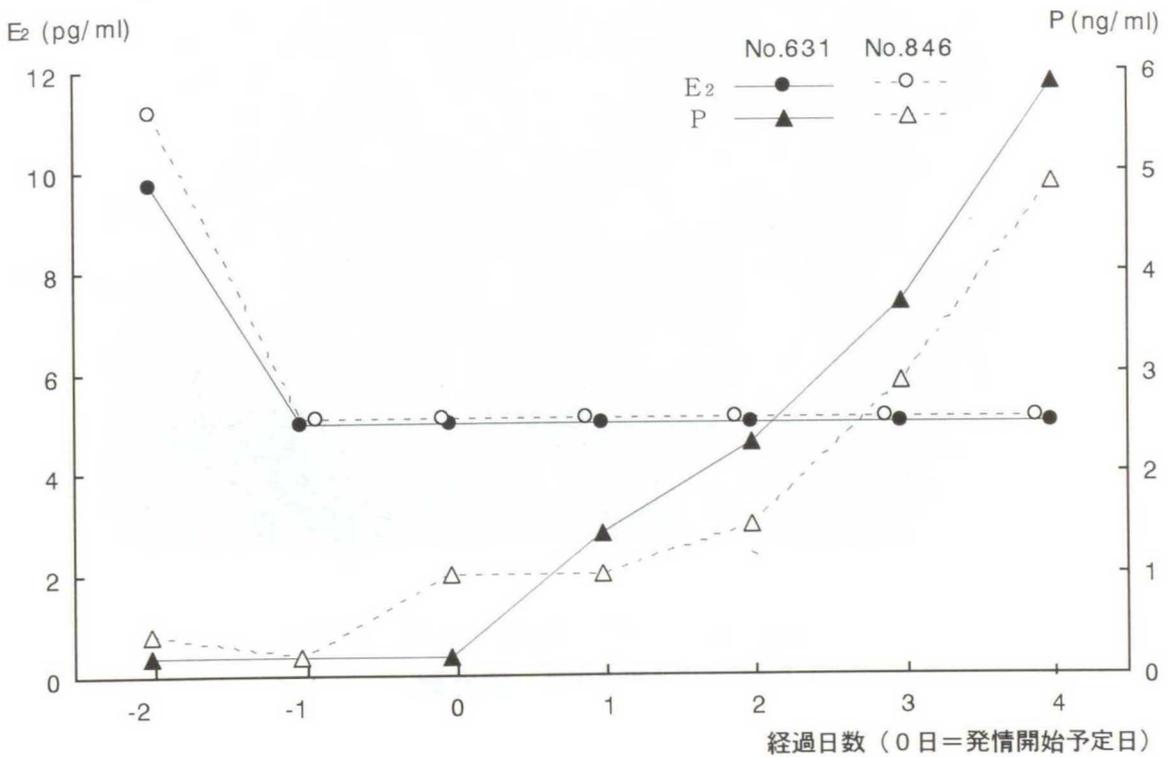


図 91. Ind 無投与対照豚の血中 E₂、P 濃度の推移

発情期頸管粘液中好中球の精子捕食所見

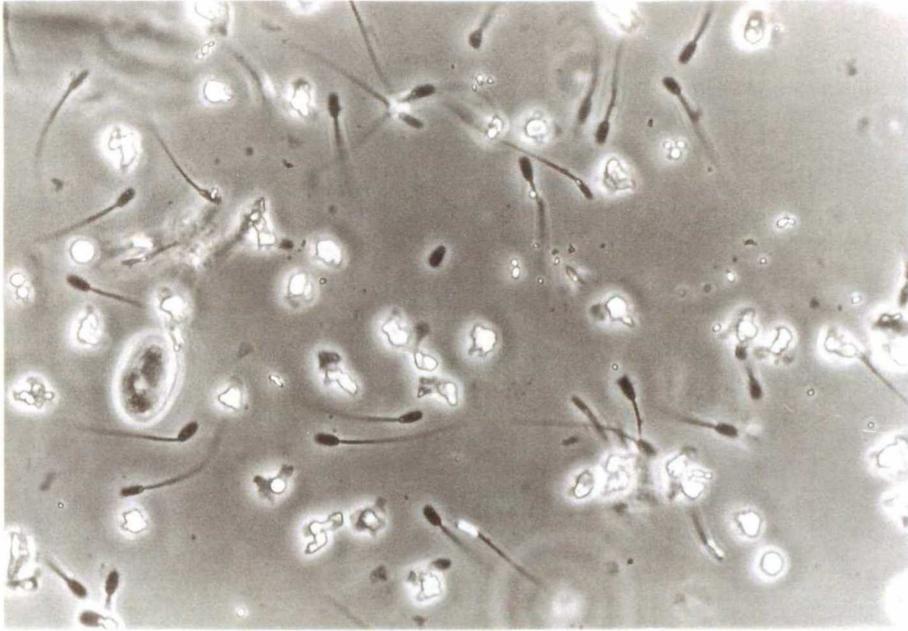


図92. PBS液中での好中球と5%NaCl液処理による
死滅精子との混合（感作：38℃，30分）
捕食率 約15%



図93. 同上（感作：38℃，60分）
捕食率 約65%

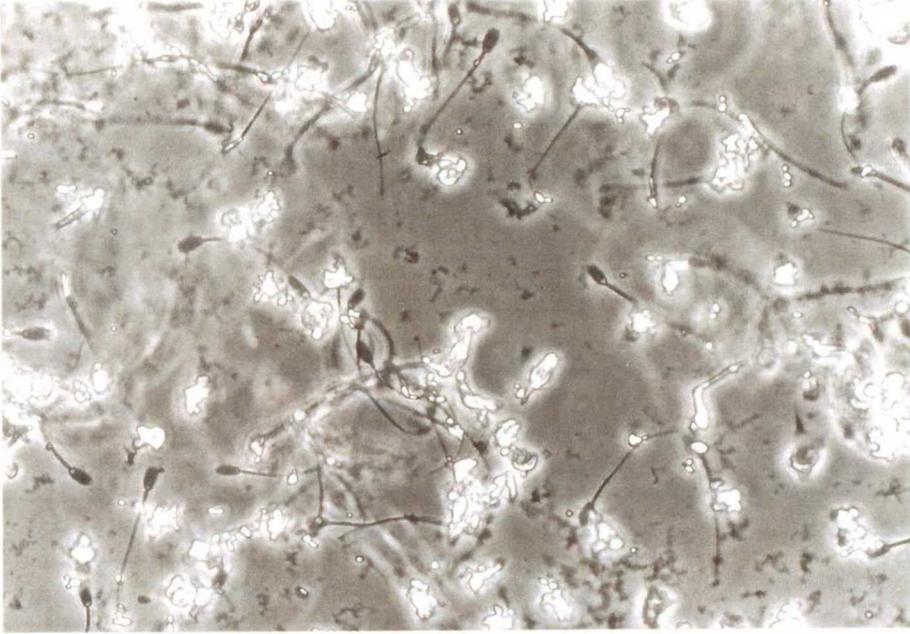


図94. 同上 (感作 : 38°C, 90分)
捕食率 約95%

表1. 繁殖周期中の各期における頸管粘液中の好中球

区分 番号	区分	好中球採取期間		好中球数(M±SD)	
				供試豚	
				No.64	No.65
1	発情期	発情日±3日 ¹		77.3±95.6	136.4±61.6 ³
2	妊娠初期	発情日から21日±3日 ²		31.6±21.1	14.7±9.5
3	初期～中期	"	42日 "	25.7±24.8	10.6±5.0
4	中期	"	63日 "	11.6±14.1	11.1±6.6
5	中期～後期	"	84日 "	3.7±1.0	9.4±10.1
6	後期	"	105日 "	9.6±6.6	8.9±4.3
7	分娩期	分娩	0日 "	49.1±87.8	239.3±343.0
8	哺乳期	分娩後	10日 "	28.6±11.5	14.0±4.0

1) : 発情日の前3日と後3日 計7日間

2) : 発情日から21日目の前3日と後3日 計7日間 (以下同様)

3) : ×60/μl はPBS洗浄液中の好中球数 (以下同様)

表2. 開腹手術による排卵時間, 卵巢所見, 受精卵(胚)の確認

NO	交配回数	許容開始後経過 交配時間	開腹手術	許容開始後 手術まで	卵巢所見			受精卵数
					卵胞 直径	卵胞	黄体	
61-84	1回目	24時間						
	2回目	35時間20分						
			1回目	51時間55分	右	0.8cm 0.7cm	4 3	-
					左	0.8cm 0.7cm	4 2	5

灌流液中の受精卵所見 : 右卵管に受精卵は認められず、左卵管に4細胞胚3個と3細胞胚2個が認められた

表 3 . 開腹手術による排卵時間, 卵巢所見, 受精卵 (胚) の確認

NO	交配回数	許容開始後経過 交配時間	開腹手術	許容開始後 手術まで	卵巢所見			受精卵数							
					卵胞 黄体 直径	卵胞	黄体								
61-85	1回目	23時間35分													
									第1回目	38時間51分	右	1.0cm	9	-	-
											左	1.0cm	5	-	-
									第2回目	48時間23分	この時は第1回開腹手術時の 卵巢所見と同じであった				
									屠殺処理	53時間40分	右	0.8cm 0.6cm	1	8	6
左	0.6cm		5	2											

灌流液中の受精卵所見：右卵管に8~16細胞期・6個と左卵管に8~16細胞期・2個が認められた

表 4 . 開腹手術による排卵時間, 卵巢所見, 受精卵 (胚) の確認

NO	交配回数	許容開始後経過 交配時間	開腹手術	許容開始後 手術まで	卵巢所見			受精卵数
					卵胞 黄体 直径	卵胞	黄体	
61-88	1回目	0時間						
	第1回目	27時間15分	右	1.0cm	5	-	-	
			左	1.0cm 0.8cm	4 3	-	-	
	第2回目	37時間50分	右	1.0cm 0.6cm 0.5cm	3 3 1	9	1	
		左	1.0cm	5	9	-		

灌流液中の受精卵所見：左側卵管に卵子が1個が認められ、受精卵とは確認はできなかつた

表 5. No. 67 の自然発情前後における頸管部粘膜組織層の変化

所 見	発情開始4日前	発情当日	2日目	3日目	4日目
粘膜上皮細胞層の状態	5	7	20~25	12~23	10~13
細胞層数	-	+	++	+	++
細胞層全体の密度	-	+	++	+	++
最上層細胞の形態	立方円柱型	扁平型	扁平型	扁平型	扁平型
最上層細胞層の剥離	-	-	+~++	+	+
最上層への変形細胞進入	-	+	+	±~+	++
粘膜下織層の状態	紡錘型	扁平型、紡錘型	円型、紡錘型	紡錘型	扁平型、紡錘型
細胞の形態	紡錘型	紡錘型	円型、紡錘型	紡錘型	扁平型、紡錘型
変形細胞の浸潤程度	±~+	+	++	±~+	++
血管内腔拡張の程度	-	+	+	+~++	++
粘膜固有層の状態	-	+	+	++	+
変形細胞の浸潤程度	-	+	+	++	+
血管内腔拡張の程度	-	+~++	+~++	+~++	+~++
血管内白血球の出現	-	+	+	+	+

表 6. No.138 へのE2投与による頸管部粘膜組織層の変化

所 見	投与0日目	2日目	3日目	5日目	7日目	9日目
粘膜上皮細胞層の状態	2~3	4~8	5~11	8~18	7~11	4~6
細胞層数	-	+	+	+	+	+
細胞層全体の密度	-	+	+	+	+	+
最上層細胞の形態	紡錘型	圧べん状	紡錘状	核濃縮、扁平、短立方型	空胞、扁平、無核化	空胞、扁平、無核化
最上層細胞層の剥離	-	-	-	±	+	+
最上層への変形細胞進入	-	+	+	+	-	-
粘膜下織層の状態	楕円圧べん状	扁平、紡錘	圧べん状	紡錘	紡錘	紡錘
細胞の形態	楕円圧べん状	扁平、紡錘	圧べん状	紡錘	紡錘	紡錘
変形細胞の浸潤程度	-	+	+	+	±	-
血管内腔拡張の程度	-	+	+	+	+	±~+
粘膜固有層の状態	-	+	+	+	+	+
変形細胞の浸潤程度	-	+	+	+	+	+
血管内腔の拡張の程度	-	+	+	+~++	+	+
血管内白血球の出現	-	+~++	+	+~++	+~++	±~+

注：E2 1.0mg 1回投与

表 7. No.154 へのE₂ 投与による頸管部粘膜組織層の変化

所見	投与0日目					投与9日目				
	2~3	3~6	5~20	8~15	10~20	7日目	5日目	3日目	2日目	1日目
粘膜上皮細胞層の状態	2~3	3~6	5~20	8~15	10~20	7日目	5日目	3日目	2日目	1日目
細胞層数	-	+	++	++	++	++	++	++	+	+
細胞層全体の密度	類円型	やや大、類円型	紡錘型、類円型	紡錘型、類円型	類円型	類円型	類円型	類円型	類円型	類円型
最上層細胞層の形態	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
最上層細胞層の剥離	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
最上層への変形細胞進入	紡錘型	紡錘型、扁平型	扁平型、紡錘型	紡錘型、扁平型	紡錘型	紡錘型	紡錘型	紡錘型	紡錘型	紡錘型
細胞の状態の形態	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
変形細胞の浸潤程度	-	+	強い	中程度以上	+	+	+	+	+	+
血管内腔拡張の程度	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
変形細胞の浸潤程度	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
血管内腔の拡張の程度	-	++	+	+	-	-	-	-	-	-
血管内白血球の出現	-	+++	+	+++	±	±	±	±	±	±

注：E₂ 0.8mg 1回投与

表 8. No.164 へのE₂ 投与による頸管部粘膜組織層の変化

所見	投与0日目					投与9日目				
	7~10	10~16	11~18	12~23	6~15	7日目	5日目	3日目	2日目	1日目
粘膜上皮細胞層の状態	7~10	10~16	11~18	12~23	6~15	7日目	5日目	3日目	2日目	1日目
細胞層数	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
細胞層全体の密度	豊円型	円型	円型	上層部長楕円型	円型、中層以上は半月濃縮	円型、紡錘型	円型、紡錘型	円型、紡錘型	円型、紡錘型	円型、紡錘型
最上層細胞層の形態	±	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+
最上層細胞層の剥離	小形円型細胞	+++	+++	+	±	±	±	±	±	±
最上層への変形細胞進入	扁平型	円型、扁平型	円型、楕円型一部扁平	扁平、紡錘型	変形圧円型	変形圧円型	変形圧円型	変形圧円型	変形圧円型	変形圧円型
細胞の状態の形態	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-
変形細胞の浸潤程度	なし	+	++	-	-	-	-	-	-	-
血管内腔拡張の程度	+	+++	+	+	+	+	+	+	+	+
変形細胞の浸潤程度	-	+++	+	±	±	±	±	±	±	±
血管内腔の拡張の程度	+	+++	+	±	±	±	±	±	±	±
血管内白血球の出現	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注：E₂ 1.0mg 1回投与

表 9. NO. 68 へのE1 投与による頸管部粘膜組織層の変化

所見：E1 投与	投与開始前4日目		投与直前		3日目	6日目
	4~7	5~9	5~9	9~14	14~23	14~10
粘膜上皮細胞層の状態						
細胞層数	-	±~+	±~+	+	++	+
細胞層全体の密度						
最上層細胞の形態	紡錘型、扁平型	扁平型	扁平型	扁平型	扁平型	扁平型
最上層細胞の剥離	-	±~-	±~-	+	+	+
最上層への変形細胞進入	±	+	+	+	+	±~+
粘膜下織層の状態						
細胞の形態	小型紡錘型、扁平型	類円型、扁平型	類円型、扁平型	紡錘型、扁平型	紡錘型	紡錘型、扁平型
変形細胞の浸潤程度	-	±	±	+	+	±~+
血管内腔拡張の程度	-	+	+	+	±~+	-
粘膜固有層の状態						
変形細胞の浸潤状態	-	±	±	+	+	±
血管内腔拡張の程度	±	±	±	+	+	+
血管内白血球の出現	-	+	+	±~+	±~+	±

注：E1 投与 第1日目1.0mg、第2日目2.0mg、第3日目1.0mg

表 10. No.69 へのE2 投与による頸管部粘膜組織層の変化

所見：E2 投与	投与開始前4日目		投与直前		3日目	6日目
	3	6-11	6-11	28	13-30	10-30
粘膜上皮細胞層の状態						
細胞層数	±~-	±~-	±~-	++	+++	+++
細胞層全体の密度						
最上層細胞の形態	類円型、扁平型	扁平型	扁平型	類円型	紡錘型	円型、紡錘型
最上層細胞層の剥離	±~-	±~-	±~-	+	+	++
最上層への変形細胞進入	±~+	+	+	±~++	±~++	±~++
粘膜下織層の状態						
細胞の形態	紡錘型	紡錘型、類円型	紡錘型、類円型	紡錘型、類円型	大型紡錘型、扁平型	大型円型、扁平型
変形細胞の浸潤	-	+	+	++	+++	+++
血管内腔の拡張	-	±	±	+	+	±
粘膜固有層の状態						
変形細胞の浸潤	+	+	+	++	++	±~++
血管内腔拡張の程度	±	±	±	±	±~++	+
血管内白血球の出現	±	+	+	+	±~++	+

注：E2 投与 第1日目1.0mg、第2日目2.0mg、第3日目1.0mg

表11. No.70へのE3 投与による頸管部粘膜組織層の変化

所見	投与直前				6日目
	投与開始前4日目	2日目	3日目	6日目	
粘膜上皮細胞層の状態	2~3 -	2~16 +	14~29 ++	15~25 ++	
細胞層数	扁平型	立方型	扁平型	扁平型	
細胞層全体の密度	+	+	++	++	
最上層細胞層の形態	紡錘型	紡錘型	紡錘型	紡錘型	
最上層細胞層の剥離	-	+	++	++	
最上層細胞層の浸潤	-	+	++	++	
最上層への変形細胞進入	-	±	+	++	
細胞の形態	紡錘型、円型	紡錘型、円型	紡錘型、扁平型	紡錘型、扁平型	
変形細胞の浸潤程度	+	++	++	++	
血管内腔拡張の程度	+	±	+	±	
変形細胞の浸潤程度	±	±	++	++	
血管内腔の拡張の程度	±	±	+	+	
血管内白血球の出現	±	±	+	+	

注：E1 投与 第1日目1.0mg、第2日目2.0mg、第3日目1.0mg

表12. No.71のP 投与による頸管部粘膜組織層の変化

所見：P投与	投与直前				6日目
	投与前4日目	2日目	3日目	6日目	
粘膜上皮細胞層の状態	2~8 -	4~7 ±	3~8 ±	3~4 ±	
細胞層数	紡錘型	類立方型	類立方型	類円型	
細胞層全体の密度	+	+	++	++	
最上層細胞層の形態	紡錘型	紡錘型	紡錘型	紡錘型	
最上層細胞層の剥離	±	±	±	±	
最上層への変形細胞進入	+	+	+	+	
細胞の形態	類円型、扁平型	類円型、扁平型	類円型、扁平型	類円型、扁平型	
変形細胞の浸潤程度	±	+	+	+	
血管内腔拡張の程度	±	±	±	±	
変形細胞の浸潤程度	+	+	±	±	
血管内腔拡張の程度	±	+	±	±	
血管内白血球の出現	+	+	+	+	

注：P 投与 第1日目40mg、第2日目40mg、第3日目40mg