

分娩後の牛子宮内の
生物学的環境に関する研究

金子一幸

分娩後の牛子宮内の
生物学的環境に関する研究

金子一幸

1995年

目次

I. 諸言	1
II. 材料および方法	3
1. 供試牛	3
2. 試験方法	3
1) 細菌学的検査	3
①子宮灌流液の採取方法	3
②細菌培養および同定方法	4
③検査後の受胎成績の調査	5
2) 細胞学的検査	5
①子宮灌流液の採取方法	5
②灌流液中の細胞の観察	5
③検査後の受胎成績の調査	5
3) 発情粘液中の好中球の検査	6
4) 統計処理	6
①主成分分析	6
②判別分析	7
③その他	7
5) 子宮内の生物学的不良環境の評価	7
III. 成績	8
1. 繁殖成績	8

1) 授精回数別にみた受胎率	8
2) 分娩後の日数別にみた受胎率	8
2. 細菌学的検査成績	8
1) 細菌分離率	8
①原液を培養した場合	9
②沈渣を培養した場合	9
2) 分離 CFU別にみた受胎率	10
①原液を培養した場合	10
②沈渣を培養した場合	10
3. 細胞学的検査成績	11
1) 灌流液中の各種細胞の出現率および受胎率への影響	11
①全ての細胞を対象とした場合	12
(a) 上皮細胞	12
(b) 好中球	12
(c) 好酸球	13
(d) リンパ球	14
(e) マクロファージ様細胞	14
②炎症細胞のみを対象とした場合	14
(a) 好中球	15
(b) 好酸球	15
(c) リンパ球	16
(d) マクロファージ様細胞	17

4. 統計処理	17
1) 主成分分析	17
①全細胞を用いた場合	17
②炎症細胞のみを用いた場合	18
2) 判別分析	18
①全ての検査項目を説明変数とし受胎の有無を目的変数とした場合	18
②それぞれの主成分を説明変数とし受胎の有無を目的変数とした場合	18
(a) 上皮細胞と炎症細胞に関する主成分	18
(b) 細菌に関する主成分	19
(c) マクロファージ様細胞に関する主成分	19
(d) リンパ球と好中球に関する主成分	19
③判別得点およびランク度別度数表	20
(a) 沈渣中の CFU	20
(b) リンパ球の割合	21
(c) 好中球の割合	21
3) その他	22
5. 子宮内の生物学的不良環境の評価	22
1) 分娩後の経過日数および授精回数と子宮内不良環境との関係	22
①細菌学的環境との関係	22
②細胞学的環境との関係	23
③細菌学的環境と細胞学的環境との関係	23
2) 不受胎牛における子宮内不良環境の評価	24

6. 発情粘液中の好中球出現と子宮内環境との関係	24
1) 細菌学的環境との関係	24
2) 細胞学的環境との関係	25
IV. 考察	27
V. 総括	37
VI. 謝辞	39
VII. 文献	40
VIII. 表	56
IX. 図	63
X. 写真説明	79

I . 緒言

乳牛において泌乳機能を適正に維持するには分娩間隔を12～13か月に保つことが必要である。しかし種々の原因による繁殖障害のため全ての牛が順調にそれを達成することは困難である。そこで繁殖を妨げる要因を排除するために様々な対策がとられているが、そのうちの一つに子宮疾患に対する対策がある。

現在一般的に行われている子宮疾患の診断法は、直腸検査による子宮の触診と子宮分泌物の肉眼的観察である。しかしこれらにより子宮疾患の診断が可能なのは分娩後1か月位までで、それ以後の繁殖期では、たとえ子宮疾患が存在したとしても肉眼的に分泌物の異常を認めることは困難であり、子宮内に膿様物が貯留しているなどの重度な異常が無い限り不可能である。その他の診断方法としては、子宮内の試験的洗浄による細菌培養と発情粘液の顕微鏡的観察および子宮内膜のバイオプシーがある。しかし発情粘液の顕微鏡的観察は子宮疾患と子宮頸管炎との鑑別が困難であり、また子宮内膜のバイオプシーは特別な器具を必要とし、費用や時間がかかり、判読に熟練を要する。

そこで臨床の現場では、数回の授精によっても不受胎の牛に対して子宮内の細菌検査や子宮内への薬液注入などの処置を行っている。しかし分娩、修復後の子宮内から細菌が分離されたとしても、それを単なる感染と、その細菌による子宮内膜炎あるいは子宮蓄膿症などの感染症の発病とを区別しなくてはならない。さらに細菌が分離されないことは子宮内に問題がないということにはならず、診断の混乱を招き対応に苦慮している。

また分娩後に数回の授精を受けたこの時期は経済的に許される空胎期間の夕

イムリミットも近く、たとえ診断が下されたとしても適切な治療を行う余裕がない。さらに近年、飼養頭数の多頭化が進む中で牛群全体としての効率的な繁殖管理を行う必要がある。そのため分娩後のどの時期に、どの様な牛に対して、どの様な検査を実施すれば効率良く問題牛を摘発し、適切な処置を施すことが可能となるかが問題である。

分娩後の牛の子宮内の生物学的環境を調べることによって臨床診断を的確にする目的で、子宮内の灌流液の細菌学的小よび細胞学的検査、発情粘液中の好中球出現の観察および子宮内の生物学的不良環境の経時的発生の調査を行った。

II. 材料および方法

1. 供試牛

南空知管内の一般酪農家で飼養されている経産ホルスタイン種乳牛217頭を対象とした。これらの産歴は初産58頭、2産58頭、3産33頭、4産22頭、5産20頭、6産9頭、7産7頭、8産5頭、9産3頭、10産1頭、11産1頭で、平均 3.0 ± 2.1 産であり、分娩後に正常性周期を反復し、子宮蓄膿症および卵巣疾患の治療歴の無い牛を供試した。また分娩後の経過日数が均等になるための目安として、分娩後の授精回数別に採材し、その内訳は第1回54頭、第2回54頭、第3回56頭、第4回以上53頭であった。採材は授精した翌日に直腸検査を行い、授精時に存在していた卵胞が消失している場合を排卵とし、その時点で行った。

2. 試験方法

1) 細菌学的検査

①子宮灌流液の採取方法

(1) 肛門および外陰部を洗浄消毒後、腔鏡を挿入し、内芯の入ったバルーンカテーテル（テルモ、Fr. 22）の先端を子宮頸管部に出来るだけ深く入れ、そのままの状態でも腔鏡を抜き、直腸腔法でバルーンカテーテルを子宮内まで挿入する。

(2) 子宮体部でバルーンに空気を約10ml入れて膨らませ、内芯を抜き取る。子宮が深くカテーテルが腔内に入り込んでしまう場合は、カテーテルの空気注

入口の部分に重りを下げ、カテーテルの先端が陰唇から出ているようにしておく。

(3) 200ml の注射筒を用い、100ml の滅菌生理食塩液を子宮内に注入し、注射筒をカテーテルにつけたまま子宮を軽く2～3回マッサージした後、生理食塩液を回収する。うまく回収できない場合は子宮角を圧迫したり、バルーン内の空気の量を調節することにより回収した。

②細菌培養および同定方法

細菌学的検査は回収した灌流液そのまま（以下原液）と、遠心した沈渣（以下沈渣）について行った。原液の場合は回収液0.1mlを5%羊血液加寒天培地に塗布した。沈渣については回収液10mlを3000回転10分間遠心後、沈殿物に生理食塩液を加えて1mlとし、その0.1mlを5%羊血液加寒天培地に塗布した。両者とも37°C48時間好気培養し、発育したコロニー数（以下CFU）を数えた。原液の場合は同一のコロニーが2個以上、沈渣の場合には同一のコロニーが10個以上発育したものについて細菌種の同定を行った。同定方法は以下に示した。

(1) グラム染色を行い、グラム陽性球菌、グラム陽性桿菌、グラム陰性桿菌に分類した。

(2) グラム陽性球菌についてはカタラーゼ試験および食塩マンニット培地上にて37°C48時間の培養を行い、カタラーゼ試験陽性、食塩抵抗性陽性のものを *Staphylococcus spp.*、カタラーゼ試験陽性、食塩抵抗性陰性のものを *Micrococcus spp.*、カタラーゼ試験陰性、食塩抵抗性陰性のものを *Streptococcus spp.*、カタラーゼ試験陰性、食塩抵抗性陽性、マンニット陽性のものを *Enterococcus spp.* とした。

(3) グラム陽性桿菌については長い大桿菌を *Bacillus spp.* とした。不定形松葉状短桿菌は、羊血液加寒天培地上での溶血性の観察およびカタラーゼ試験を行い、溶血性陽性、カタラーゼ試験陰性のものを *Actinomyces pyogenes*、溶血性陰性、カタラーゼ試験陰性のものを *Actinomyces spp.*、溶血性陰性、カタラーゼ試験陽性のものを *Corynebacterium spp.* とした。

(4) グラム陰性桿菌についてはカタラーゼ試験およびオキシダーゼ試験を行い、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性のものはエンテロチューブⅡ（日本ロシュ株式会社）を用い、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性のものはオキシファームチューブⅡ（日本ロシュ株式会社）を用い菌種を決定した。

③検査後の受胎成績の調査

授精60日以降に直腸検査により妊娠鑑定を行い、細菌学的検査の結果と受胎との関係を調査した。

2) 細胞学的検査

①子宮灌流液の採取方法

細菌学的検査の子宮灌流液の採取方法に準ずる。

②灌流液中の細胞の観察

回収液10mlを遠心し、その沈渣をスライドグラスに塗布した。それを風乾しメチルアルコールで3分間固定した後にギムザ染色を行った。作成した標本を1000倍で鏡検し、細胞を500個数え分類し、その割合を算出した。細胞が崩壊して判別が不可能なものは対象外とした。

③検査後の受胎成績の調査

授精60日以降に直腸検査により妊娠鑑定を行い、細胞学的検査の結果と受胎

との関係を調査した。

3) 発情粘液中の好中球の検査

発情時の授精直前に肛門および外陰部を洗浄後、腔鏡を挿入し、滅菌綿花を装着した子宮頸管鉗子により頸管外口に流出している発情粘液を採取した。採取した粘液をスライドガラスに薄く塗布し、風乾後ギムザ染色を行い粘液中に出現する好中球を観察した。

標本の判定は標本全体を30視野観察し、好中球が全く見られないか所々に点在しているものを-、標本全体に点在しているものを+、標本全体に密集しているものを++、+と++の間を++とした。また一か所に好中球が5個以上集合して存在するものを集塊ありとした。

4) 統計処理

①主成分分析

検査項目間に存在する主成分を抽出するため主成分分析を行った。分析に用いた検査項目は原液中の細菌数と遠心液中の細菌数のほか、全細胞に占める上皮細胞の割合、リンパ球の割合、好中球の割合、好酸球の割合、およびマクロファージ様細胞の割合を用いたものと、上皮細胞を除いた細胞（以下炎症細胞）におけるリンパ球の割合、好中球の割合、好酸球の割合、およびマクロファージ様細胞の割合を用いたものの2種類について行い、因子負荷量をコンピューターにより算出した。さらに因子負荷量を分析し、その絶対値の大きな検査項目により各因子を決定した。また主成分の数は、累積寄与率が60%になるまでのものを有効とした。

②判別分析

主成分分析により抽出された各主成分につき、受胎の有無を目的変数として判別分析を行った。変数選択法は増加法、減少法および増減法を用いた。

③その他

受胎率および子宮内不良環境の発生率の比較をカイ二乗検定により行った。また炎症細胞におけるリンパ球の割合と好中球の割合の関係および発情粘液中の好中球出現と子宮内環境との関係について、相関係数を算出した。

5) 子宮内の生物学的不良環境の評価

子宮内の細菌学的検査および細胞学的検査成績と分娩後の日数および授精回数との関係を調査した。

Ⅲ. 成績

1. 繁殖成績

1) 授精回数別にみた受胎率

授精回数別受胎率を表1に示した。授精回数1回から4回以上までに区分して受胎率を調べたところ、1回で30/54頭(55.6%)、2回で30/54頭(55.6%)、3回で32/56頭(57.1%)、4回以上では18/53頭(34.0%)、全体の受胎率は50.7%(110/217)であった。授精回数別受胎率は、授精回数が1回から3回までの群は55.6~57.1%とほぼ等しかったが、4回以上では34.0%と著しく低下し、他の群との間に5%の危険率で有意差が認められた。

2) 分娩後の日数別にみた受胎率

分娩後の日数別にみた受胎率を表2に示した。60日未満で6/11(54.5%)、60日以上90日未満で18/28(64.3%)、90日以上120日未満で22/45(48.9%)、120日以上150日未満で17/32(53.1%)、150日以上180日未満で17/33(51.5%)、180日以上210日未満で14/30(46.7%)、210日以上240日未満で6/19(31.6%)、240日以上で10/19(52.6%)であった。受胎率は最高が60日以上90日未満の64.3%、最低が210日以上240日未満の31.6%であり、両群の間にのみ5%の危険率で有意差が認められたが、全体として一定の傾向は見られなかった。

2. 細菌学的検査成績

1) 細菌分離率

①原液を培養した場合

原液から同一のコロニーが 2個以上分離された頭数は47頭であり、そのうち5頭からは2種類の細菌が分離された。分離された細菌は *Streptococcus spp.* 29株、*Staphylococcus spp.* 4株、*Bacillus spp.* 4株、*Pseudomonas spp.* 3株、*Escherichia coli* (以下 *E. coli*) 2株、*Corynebacterium spp.* 1株、*Actinomyces spp.* 1株、未同定 8株であった(表3)。

分娩後の授精回数別分離率は、1回 14/54頭 (25.9%)、2回 14/54頭 (25.9%)、3回 6/56頭 (10.7%)、4回以上 13/53頭 (24.5%) であり、3回目の授精に最も低かった(図1)。

分娩後の経過日数別分離率は、0日以上60日未満で 2/11頭 (18.2%)、60日以上90日未満で 10/28頭 (35.7%)、90日以上120日未満で 9/45頭 (20.0%)、120日以上150日未満で 5/32頭 (15.6%)、150日以上180日未満で 8/33頭 (24.2%)、180日以上210日未満で 7/30頭 (23.3%)、210日以上240日未満で 2/19頭 (10.5%)、240日以上で 4/19頭 (21.1%) であり、全期間を通じて一定の傾向は見られなかった(図2)。

②沈渣を培養した場合

沈渣から同一のコロニーが10個以上分離された頭数は46頭であり、そのうち1頭からは2種類の細菌が分離された。分離された細菌は *Streptococcus spp.* 27株、*Staphylococcus spp.* 7株、*Bacillus spp.* 4株、*Pseudomonas spp.* 3株、*E. coli* 2株、未同定 4株であった(表4)。

分娩後の授精回数別分離率は、1回 15/54頭 (27.8%)、2回 11/54頭 (20.3%)、3回 7/56頭 (12.5%)、4回以上 13/53頭 (24.5%) であり、3回

までは授精回数が増加するに従い出現割合は減少したが、4回以上では増加した(図3)。

分娩後の経過日数別分離率は、0日以上60日未満で 3/11 頭 (27.3%)、60日以上90日未満で 10/28頭 (35.7%)、90日以上 120日未満で 7/45 頭 (15.6%)、120 日以上 150日未満で 3/32 頭 (9.4%)、150 日以上 180日未満で 7/33 頭 (21.2%)、180 日以上 210日未満で 7/30 頭 (23.3%)、210日以上 240日未満で 4/19 頭 (21.1%)、240日以上で 5/19 頭 (26.3%) であり、150日までは日数が増加するに従い出現割合は減少したが、その後は20%台で経過した(図4)。

2) 分離 CFU数別にみた受胎率

①原液を培養した場合

分離 CFU数別受胎率を図5に示した。2個以上のコロニーが発育した47頭のうち、受胎牛は17頭 (36.2%)、不受胎牛は30頭 (63.8%)であった。受胎牛のうち、コロニーが2個分離されたのは 5頭/17頭 (29.4%)、3個では 5頭/17頭 (29.4%)、4個では 0頭/17頭 (0%)、5個では 2頭/17頭 (11.8%)、6個では 5頭/17頭 (29.4%) であり、7個以上分離された16頭はいずれも不受胎であった。不受胎牛のうち、コロニーが2個分離されたのは 2頭/30頭 (6.7%)、3個では 6頭/30頭 (20.0%)、4個では 1頭/30頭 (3.3%)、5個では 2頭/30頭 (6.7%)、6個では 3頭/30頭 (10.0%)、7個では 1頭/30頭 (3.3%)、10個以上では15頭/30頭 (50.0%) であった。

②沈渣を培養した場合

分離 CFU数別受胎率を図6に示した。10個以上のコロニーが発育した46頭の

うち、受胎牛は15頭 (32.6%)、不受胎牛は31頭 (67.4%) であった。受胎牛のうち、コロニーが10個以上20個未満分離されたのは 9頭/15頭 (60.0%)、20個以上30個未満では 3頭/15頭 (20.0%)、30個以上40個未満では 0頭/15頭 (0%)、40個以上50個未満では 2頭/15頭 (13.3%)、50個以上60個未満では 0頭/15頭 (0%)、60個以上70個未満では 0頭/15頭 (0%)、70個以上80個未満では 0頭/15頭 (0%)、80個以上90個未満では 0頭/15頭 (0%)、90個以上 100個未満では 0頭/15頭 (0%)、100個以上では 1頭/15頭 (6.7%) であり、50個以上分離された18頭のうち受胎したのは 1頭のみ (5.6%) であった。不受胎牛のうち、コロニーが10個以上20個未満分離されたのは10頭/31頭 (32.3%)、20個以上30個未満では 1頭/31頭 (3.2%)、30個以上40個未満では 1頭/31頭 (3.2%)、40個以上50個未満では 2頭/31頭 (6.5%)、50個以上60個未満では 1頭/31頭 (3.2%)、60個以上70個未満では 0頭/31頭 (0%)、70個以上80個未満では 2頭/31頭 (6.5%)、80個以上90個未満では 1頭/31頭 (3.2%)、90個以上 100個未満では 1頭/31頭 (3.2%)、100個以上では12頭/31頭 (38.7%) であった。

3. 細胞学的検査成績

1) 灌流液中の各種細胞の出現率および受胎率への影響

217 頭中 2頭のスメアーには細胞成分が全く観察されなかった。したがって 215 頭のスメアーについて観察を行った。灌流液中に出現する細胞は赤血球、子宮内膜上皮細胞、および炎症細胞 (好中球、好酸球、リンパ球、マクロファージ様細胞) であった (写真1~10)。

①全ての細胞を対象とした場合

上皮細胞、好中球、好酸球、リンパ球およびマクロファージ様細胞の出現率およびその受胎率への影響を調査した。

(a) 上皮細胞

全細胞中に上皮細胞が占める割合は $51.4 \pm 30.0\%$ （平均±標準偏差）であった（表5）。その分布は0%以上10%未満で30頭、10%以上20%未満で20頭、20%以上30%未満で9頭、30%以上40%未満で17頭、40%以上50%未満で19頭、50%以上60%未満で24頭、60%以上70%未満で20頭、70%以上80%未満で30頭、80%以上90%未満で27頭、90%以上で19頭であった。出現頭数は上皮細胞の割合が10%未満で最も多く、30%未満までは次第に減少し、それ以上では次第に増加する傾向にあった（図7）。

上皮細胞の割合別受胎率はその割合が0%以上10%未満で13/30頭（43.3%）、10%以上20%未満で12/20（60.0%）、20%以上30%未満で5/9頭（55.6%）、30%以上40%未満で12/17頭（70.6%）、40%以上50%未満で7/19頭（36.8%）、50%以上60%未満で12/24頭（50.0%）、60%以上70%未満で14/20頭（70.0%）、70%以上80%未満で12/30頭（40.0%）、80%以上90%未満で14/27頭（51.9%）、90%以上で9/19頭（47.4%）であった。上皮細胞の割合による受胎率には一定の傾向は見られなかった（図7）。

(b) 好中球

全細胞における好中球が占める割合は $24.8 \pm 23.2\%$ （平均±標準偏差）であった（表5）。その分布は0%以上10%未満で64頭、10%以上20%未満で55頭、20%以上30%未満で32頭、30%以上40%未満で23頭、40%以上50%未満で14頭、

50%以上60%未満で 4頭、60%以上70%未満で 8頭、70%以上80%未満で 3頭、80%以上90%未満で 5頭、90%以上で 7頭であった。出現頭数は好中球が占める割合が50%まではその割合が増加するにしたがって減少し、50%以上になるとほぼ一定になった（図8）。

好中球の割合別受胎率は 0%以上10%未満で 32/64頭（50.0%）、10%以上20%未満で 28/55頭（50.9%）、20%以上30%未満で 18/32頭（56.3%）、30%以上40%未満で 13/23頭（56.5%）、40%以上50%未満で10/14 頭（71.4%）、50%以上60%未満で 2/4頭（50.0%）、60%以上70%未満で 3/8頭（37.5%）、70%以上80%未満で 0/3頭（0%）、80%以上90%未満で 2/5頭（40.0%）、90%以上で 2/7頭（28.6%）であった。受胎率は好中球の割合が0%以上60%未満では全て50%以上でほぼ等しかったが、60%以上になると低下する傾向が見られた（図8）。

(c) 好酸球

全細胞における好酸球が占める割合は $2.7 \pm 4.8\%$ （平均±標準偏差）であった（表5）。その分布は 0%以上 5%未満で 187頭、5%以上10%未満で16頭、10%以上20%未満で10頭、20%以上で 2頭であり、ほとんどのものが5%未満であった（図9）。

好酸球の割合別受胎率は 0%以上 5%未満で94/187頭（50.3%）、5%以上10%未満で 11/16頭（68.8%）、10%以上20%未満で5/10頭（50.0%）、20%以上で 0/2頭（0%）であった。好酸球の割合による受胎率には一定の傾向は見られなかったが、20%以上の高値を示した2 頭は受胎しなかった（図9）。

(d) リンパ球

全細胞におけるリンパ球が占める割合は $20.2 \pm 14.0\%$ （平均±標準偏差）であった（表5）。その分布は 0%以上10%未満で63頭、10%以上20%未満で60頭、20%以上30%未満で45頭、30%以上40%未満で24頭、40%以上50%未満で14頭、50%以上60%未満で 5頭、60%以上で 4頭であった。出現頭数はリンパ球の割合が増加するにしたがって減少し、70%以上になるものはなかった（図10）。

リンパ球の割合別受胎率は 0%以上10%未満で 27/63頭（42.9%）、10%以上20%未満で 29/60頭（48.3%）、20%以上30%未満で 20/45頭（44.4%）、30%以上40%未満で 18/24頭（75.0%）、40%以上50%未満で11/14 頭（78.6%）、50%以上60%未満で 3/5頭（60.0%）、60%以上70%未満で 2/4頭（50.0%）であった。受胎率はリンパ球の割合が0 %以上30%未満では全て40%台でやや低値を示し、30%以上になると増加する傾向が見られた（図10）。

(e) マクロファージ様細胞

全細胞におけるマクロファージ様細胞が占める割合は $0.9 \pm 0.1\%$ （平均±標準偏差）であった（表5）。その分布は 0%以上 0.5%未満で 211頭、0.5%以上 1.0%未満で 3頭、1%以上 1頭であった（図11）。

マクロファージ様細胞の割合別受胎率は 0%以上 0.5%未満で 107/211頭（50.7%）、0.5%以上1.0 %未満で 3/3頭（100%）、1.0 %以上で 0/1頭（0%）であった（図11）。

②炎症細胞のみを対象とした場合

上皮細胞の分布には一定の傾向は見られず、0 ~100 %の間に全体に均一に

分布し、かつその割合も大きかった。また受胎との関係の一定の傾向も認められなかった(図7)。したがって他の細胞の割合およびその受胎率に及ぼす影響が大きいと考えられるため、上皮細胞を除いた炎症細胞におけるそれぞれの細胞の割合を算出した。

(a) 好中球

炎症細胞における好中球が占める割合は $44.4 \pm 20.9\%$ (平均 \pm 標準偏差)であった(表6)。その分布は0%以上10%未満で5頭、10%以上20%未満で14頭、20%以上30%未満で28頭、30%以上40%未満で61頭、40%以上50%未満で38頭、50%以上60%未満で23頭、60%以上70%未満で17頭、70%以上80%未満で8頭、80%以上90%未満で11頭、90%以上で10頭であった。出現頭数は30%までは好中球の割合が増加するにしたがって増加し、それ以降は次第に減少し、70%以上になると10%前後でほぼ一定になった(図12)。

炎症細胞における好中球の割合別受胎率はその割合が0%以上10%未満で1/5頭(20.0%)、10%以上20%未満で7/14頭(50.0%)、20%以上30%未満で14/28頭(50.0%)、30%以上40%未満で35/61頭(57.4%)、40%以上50%未満で24/38頭(63.2%)、50%以上60%未満で11/23頭(47.8%)、60%以上70%未満で10/17頭(58.2%)、70%以上80%未満で2/8頭(25.0%)、80%以上90%未満で3/11頭(27.3%)、90%以上で3/10頭(30.0%)であった。受胎率はその割合が10%以上70%未満では全て50%前後でほぼ等しかったが、10%未満および70%以上では低い傾向が見られた(図12)。

(b) 好酸球

炎症細胞における好酸球が占める割合は $4.9 \pm 6.2\%$ (平均 \pm 標準偏差)で

あった(表6)。その分布は0%以上5%未満で142頭、5%以上10%未満で43頭、10%以上15%未満で17頭、15%以上20%未満で5頭、20%以上25%未満で4頭、25%以上30%未満で02頭、30%以上で2頭であった。その分布は割合が増加するにしたがって減少したが、10%以上の高率を示すものもみられた(図13)。

好酸球の割合別受胎率は0%以上5%未満で67/142頭(47.2%)、5%以上10%未満で26/43頭(60.7%)、10%以上15%未満で12/17頭(70.6%)、15%以上20%未満で2/5頭(40.0%)、20%以上25%未満で2/4頭(50.0%)、25%以上30%未満で1/2頭(50.0%)、30%以上で0/2頭(0.0%)であった。受胎率はその割合が0%以上15%未満では好酸球の割合が増加するにつれ上昇し、15%以上ではやや低い傾向が見られた(図13)。また好酸球の割合が30%以上と著しく高値を示した2頭は受胎しなかった。

(c) リンパ球

炎症細胞におけるリンパ球の占める割合は $48.0 \pm 20.1\%$ (平均 \pm 標準偏差)であった(表6)。その分布は0%以上10%未満で12頭、10%以上20%未満で14頭、20%以上30%未満で18頭、30%以上40%未満で14頭、40%以上50%未満で50頭、50%以上60%未満で52頭、60%以上70%未満で28頭、70%以上80%未満で16頭、80%以上90%未満で10頭、90%以上で1頭であった。その分布は割合が40%未満では15%前後ではほぼ一定であったが、40%以上になると急激に増加し、50%台を頂点にその後は次第に減少した(図14)。

リンパ球の割合別受胎率は0%以上10%未満で5/12頭(41.7%)、10%以上20%未満で2/14頭(14.3%)、20%以上30%未満で9/18頭(50.0%)、30%以

上40%未満で6/14頭 (42.9%)、40%以上50%未満で30/50頭 (60.0%)、50%以上60%未満で29/52頭 (55.8%)、60%以上70%未満で13/28頭 (46.4%)、70%以上80%未満で11/16頭 (68.8%)、80%以上90%未満で5/10頭 (50.0%)、90%以上で0/1頭 (0.0%)であった。受胎率はその割合が0%以上20%未満および90%以上で低い傾向が見られ、20%以上90%未満では50%前後でほぼ一定していた (図14)。

(d) マクロファージ様細胞

炎症細胞におけるマクロファージ様細胞の占める割合は $2.7 \pm 4.7\%$ (平均±標準偏差)であった (表6)。その分布は0%以上0.5%未満で174頭、0.5%以上1.0%未満で27頭、1%以上1.5%未満で8頭、1.5%以上2.0%未満で2頭、2.0%以上で4頭であった (図15)。

マクロファージ様細胞の割合別受胎率は0%以上0.5%未満で90/174頭 (51.7%)、0.5%以上1.0%未満で14/27頭 (51.9%)、1.0%以上1.5%未満で4/8頭 (50.0%)、1.5%以上2.0%未満で1/2頭 (50.0%)、2.0%以上で1/4頭 (25.0%)であった。受胎率はその割合が2.0%未満では全てが50%以上であったが、2.0%以上になると25%に低下した (図15)。

4. 統計処理

1) 主成分分析

①全細胞を用いた場合

全細胞を用いた主成分分析の因子負荷量表を表7に示した。累積寄与率が60%以上になるまでを対象とすると3つの主成分が抽出された。

I 主成分は細菌に関する因子負荷量に比べ細胞に関する因子負荷量が全体的に大きいことから、細胞に関する主成分と考えられた。特に上皮細胞のみがプラスで、炎症細胞はすべてマイナスであることから、上皮細胞と炎症細胞に関する主成分と考えられた。

II 主成分は細菌に関する因子負荷量が高いことから細菌に関する主成分と考えられた。

III 主成分はマクロファージ様細胞に関する因子負荷量が高いことからマクロファージ様細胞に関する主成分と考えられた。

②炎症細胞のみを用いた場合

炎症細胞のみを用いた主成分分析の因子負荷量表を表8に示した。累積寄与率が60%以上になるまでを対象とすると2つの主成分が抽出された。

I 主成分は炎症細胞におけるリンパ球と好中球に関する因子負荷量が高いことからリンパ球と好中球に関する主成分と考えられた。

II 主成分は細菌に関する因子負荷量が高いことから細菌に関する主成分と考えられた。

2) 判別分析

①全ての検査項目を説明変数とし受胎の有無を目的変数とした場合

全細胞を用いた場合と炎症細胞のみを用いた場合のそれぞれにおいて、変数選択を標準全変数、変数増加法、変数減少法、変数増減法のいずれによっても受胎群と非受胎群の間の共分散行列は等しいといえないという結果が得られた。

②それぞれの主成分を説明変数とし受胎の有無を目的変数とした場合

(a) 上皮細胞と炎症細胞に関する主成分

上皮細胞、リンパ球、マクロファージ、好中球および好酸球の割合を説明変数とし、受胎の有無を目的変数として判別分析をおこなった。その結果、変数選択を標準全変数、変数増加法、変数減少法、変数増減法のいずれによっても受胎群と非受胎群の間の共分散行列は等しいといえない結果が得られた。

(b) 細菌に関する主成分

原液中の CFU および沈渣中の CFU 数を説明変数とし、受胎の有無を目的変数として判別分析をおこなった。その結果、変数選択を標準全変数にすると、受胎群と非受胎群の間の共分散行列は等しいといえないという結果となった。しかし変数選択を変数増加法、変数減少法および変数増減法にすると受胎群と非受胎群の間の共分散行列は等しいといえる結果になり、いずれにおいても残された変数は沈渣中の CFU 数であった。

また次のような判別関数式が得られた。

$$Y = 0.17966 - 0.00793803 \times \text{沈渣中のCFU}$$

(c) マクロファージ様細胞に関する主成分

マクロファージ様細胞の割合を説明変数とし、受胎の有無を目的変数として判別分析をおこなった。その結果、変数選択を標準全変数、変数増加法、変数減少法、変数増減法のいずれによっても受胎群と非受胎群の間の共分散行列は等しいといえない結果が得られた。

(d) リンパ球と好中球に関する主成分

炎症細胞におけるリンパ球と好中球の割合を説明変数とし、受胎の有無を目的変数として判別分析をおこなった。その結果、変数選択を標準全変数にすると、受胎群と非受胎群の間の共分散行列は等しいといえない結果となった。し

かし変数選択を変数増加法、変数減少法および変数増減法にすると受胎群と非受胎群の間の共分散行列は等しいといえる結果になり、残された変数は変数増加法および変数増減法ではリンパ球の割合、変数減少法では好中球の割合であった。

また次ぎのような判別関数式が得られた。

$$Y = -0.55469 + 0.01157 \times \text{リンパ球の割合}$$

$$Y = 0.48086 - 0.01077 \times \text{好中球の割合}$$

③判別得点およびランク別度数表

それぞれの主成分を説明変数とし受胎の有無を目的変数とし判別分析をおこなった結果から、沈渣中の CFU、リンパ球の割合、および好中球の割合が受胎と関係していると考えられるため、受胎率を有意に低下させる境界を明らかにするために次のような処理を行った。

(a) 沈渣中の CFU

表 9 に沈渣中の CFU 数に関する判別得点別受胎率を示した。ここで判別得点表において、カイ二乗検定で受胎率に 1% の危険率で有意差が見られる部分で 2 群に分けると、判別得点が -0.349547 と -0.614148 の間で分けることができた。これは判別得点が -0.349547 より小さければ有意に受胎率が低下することを示す。

したがって判別関数式 $Y = 0.17966 - 0.00793803 \times \text{沈渣中の CFU}$ の Y に -0.349547 以下を代入すると沈渣中の CFU が 66.7 以上となる。すなわち沈渣中の CFU が $66.7/0.1\text{ml}$ 以上になると受胎率が有意に低下することを示し、このとき摘発される頭数は 17 頭、この受胎率は 5.9% (1/17) である。

以上より沈渣 0.1ml中の CFUが66以上の場合を細菌学的環境が不良であるとした。

(b) リンパ球の割合

表10にリンパ球の割合に関する判別得点別受胎率を示した。ここで判別得点表において、カイ二乗検定で受胎率に1%の危険率で有意差が見られる部分で2群に分けると、判別得点が-0.284966と-0.404785の間で分けることができた。これは判別得点が-0.284966より小さければ有意に受胎率が低下することを示す。

したがって判別関数式 $Y = -0.55469 + 0.01157 \times \text{リンパ球の割合}$ のYに-0.284966以下を代入するとリンパ球の割合が23.3%以下となる。すなわちリンパ球の割合が23.3%以下になると受胎率が有意に低下することを示し、このとき摘発される頭数は31頭、この受胎率は29% (9/31) である。

以上よりリンパ球の割合が24%以下の場合をリンパ球に関して細胞学的環境が不良であるとした。

(c) 好中球の割合

表11に好中球の割合に関する判別得点別受胎率を示した。ここで判別得点表において、カイ二乗検定で受胎率に1%の危険率で有意差が見られる部分で2群に分けると、判別得点が-0.224786と-0.334856の間で分けることができた。これは判別得点が-0.224786より小さければ有意に受胎率が低下することを示す。

したがって判別関数式 $Y = 0.48086 - 0.01077 \times \text{好中球の割合}$ のYに-0.224786以下を代入すると好中球の割合が65.5%以上となる。すなわち好中

球の割合が65.5%以上になると受胎率が有意に低下することを示し、このとき摘発される頭数は38頭、この受胎率は34.2% (13/38) である。

以上より好中球の割合が65%以上の場合を好中球に関して細胞学的環境が不良であるとした。

3) その他

リンパ球の割合と好中球の割合の関係を表12に示した。両者は同一の主成分に含まれ、その間には相関係数が -0.9363 の大きな負の相関関係がみられた。以上のことよりリンパ球に関して細胞学的不良環境または好中球に関して細胞学的不良環境のいずれかに含まれるものを細胞学的環境が不良であるとした。

5. 子宮内の生物学的不良環境の評価

1) 分娩後の経過日数および授精回数と子宮内不良環境との関係

①細菌学的環境との関係

分娩後の経過日数と細菌学的不良環境の関係を図16に示した。細菌学的不良環境は 0日以上60日未満で 2/11 頭 (18.2%)、60日以上90日未満で4/28頭 (14.3%)、90日以上 120日未満で 2/45 頭 (4.4%)、120 日以上 150日未満で 2/32 頭 (6.3%)、150 日以上 180日未満で 2/33 頭 (6.1%)、180 以上 210日未満で 3/30 頭 (10.0%)、210日以上 240日未満で 1/19 頭 (5.3%)、240日以上で 1/19 頭 (5.3%) であった。細菌学的不良環境は分娩後早期には高いが、90日までに減少し、その後 5%前後で推移した。

分娩後の授精回数と細菌学的不良環境の関係を図17に示した。細菌学的不良環境は 1回で 7/54 頭 (13.0%)、2回で5/54頭 (9.3%)、3回で0/56頭

(0.0%)、4回以上で 5/53 頭 (9.4%) であった。細菌学的不良環境は授精回数が3 回まではその回数が増すにつれ減少し、3 回目の授精に細菌学的不良環境の牛はいなかった。しかし4 回以上では増加した。

②細胞学的環境との関係

分娩後の経過日数と細胞学的不良環境の関係を図18に示した。細胞学的不良環境は 0日以上60日未満で 3/10 頭 (30.0%)、60日以上90日未満で7/28頭 (25.0%)、90日以上 120日未満で 7/45 頭 (15.6%)、120 日以上 150日未満で 3/32 頭 (9.4%)、150 日以上 180日未満で 7/33 頭 (21.2%)、180 日以上 210日未満で 6/29 頭 (20.7%)、210日以上 240日未満で 5/19 頭 (26.3%)、240日以上で 2/19 頭 (10.5%) であった。細胞学的不良環境は分娩後 150日までは次第に減少し、150 日以降再び上昇する傾向が見られた。

分娩後の授精回数と細胞学的不良環境の関係を図19に示した。細胞学的不良環境は 1回で 10/53頭 (18.9%)、2回で 10/54頭 (18.5%)、3回で6/56頭 (10.7%)、4回以上で14/52 頭 (26.9%) であった。細胞学的不良環境は授精回数が1 回のもものと2 回のものではほぼ等しく、3 回になると減少した。しかし4 回以上になると著しく増加した。

③細菌学的不良環境と細胞学的不良環境との関係

細菌学的検査または細胞学的検査で不良環境とされたもの関係を表16に示した。細菌学的または細胞学的に不良環境とされたものは 217頭中54頭であったが、このうち細菌学的にのみ不良環境とされたものは 12/54頭 (22.2%)、細胞学的にのみ不良環境とされたものは 37/54頭 (68.5%)、両方の検査で不良環境とされたものは3/54頭 (5.6%)、および細菌学的検査で摘発され細胞成

分が見られなかったものが2/54頭 (3.7 %) であった。

2) 不受胎牛における子宮内不良環境の評価

不受胎牛107 頭のうち細菌学的検査または細胞学的検査で子宮内不良環境とされたものは40頭 (37.4%) であった。

不受胎牛のうち子宮内不良環境とされた牛の授精回数別割合を図20に示した。子宮内不良環境は 1回で 9/24 頭 (36.0%)、2回で10/24 頭 (41.7%)、3回で 5/24 頭 (20.8%)、4回以上で16/35 頭 (45.7%) であった。不受胎牛のうち子宮内不良環境の割合は授精回数が 3回のもので最も低く、4回以上のものが最も高かった。また 3回のもものと 4回のももの間に 5%の危険率で有意差が認められた。

不受胎牛のうち子宮内不良環境とされた牛の分娩後の日数別割合を図21に示した。子宮内不良環境は 0日以上60日未満で 2/5頭 (40.0%)、60日以上90日未満で7/10頭 (70.0%)、90日以上 120日未満で 6/23 頭 (26.1%)、120 日以上 150日未満で 3/15 頭 (20.0%)、150 日以上 180日未満で 7/16 頭 (43.8%)、180 以上 210日未満で 6/16 頭 (37.5%)、210日以上 240日未満で 6/13 頭 (46.2%)、240日以上で 3/9頭 (33.3%) であった。不受胎牛のうちの子宮内不良環境は分娩後 150日まで次第に減少した。しかし150 日以降に再び増加して40%前後となった。

6. 発情粘液中の好中球出現と子宮内環境との関係

1) 細菌学的環境との関係

発情粘液中の好中球出現程度と細菌学的不良環境との関係を図22に示した。

細菌学的不良環境は－で 8/104頭（7.7%）、＋で2/54頭（3.7%）、＃で4/35頭（11.4%）、＃＃で3/24頭（12.5%）であり、発情粘液中の好中球出現程度が増すにつれ細菌学的不良環境が増加する傾向にあった。しかし各群間の細菌学的不良環境の割合には有意差は見られなかった。また好中球出現程度と沈渣中の CFUとの相関係数は0.1059で、相関関係は見られなかった（表14）。

発情粘液中の好中球集塊の有無と細菌学的不良環境との関係を表15に示した。細菌学的不良環境は、発情粘液中に好中球集塊が見られるもので4/78頭（5.1%）、好中球集塊が見られないもので13/139頭（9.4%）で、両群の間に有意差は認められなかった。また好中球集塊の有無と沈渣中の CFUとの相関係数は－0.0409で、相関関係は見られなかった（表14）。

2) 細胞学的環境との関係

発情粘液中の好中球出現程度と細胞学的不良環境との関係を図23に示した。細胞学的不良環境は－で15/103頭（14.6%）、＋で9/53頭（17.0%）、＃で10/35頭（28.6%）、＃＃で6/24頭（25.0%）であり、発情粘液中の好中球出現程度が増すにつれ細胞学的不良環境が増加する傾向にあった。しかし各群間の細菌学的不良環境の割合には有意差は見られなかった。また好中球出現程度と炎症細胞における好中球の割合との相関係数は0.1803で相関関係は見られず、また炎症細胞におけるリンパ球の割合との相関係数は－0.2074で弱い負の相関関係が見られた（表14）。

発情粘液中の好中球集塊の有無と細胞学的不良環境との関係を表16に示した。細胞学的不良環境は、発情粘液中に好中球集塊が見られるもので 20/78頭（25.6%）、集塊が見られないもので20/139頭（14.4%）で、両群の間に有意差は

認められなかった。また好中球集塊の有無と炎症細胞における好中球の割合および炎症細胞におけるリンパ球の割合との相関係数はそれぞれ0.1530および-0.1394で、相関関係は見られなかった（表14）。

IV. 考察

今回の試験において、採材時期を人工授精を受けた排卵後としたのは、子宮がエストロジェンの支配下にあるためと、授精時に最も近い時期の子宮内環境を見ることができ、かつ下降してくる胚の発育に影響が少ないと思われたためである。

子宮内の防御機構は卵巣ホルモンの作用により影響を受け、エストロジェンの作用により増強され、プロジェステロンの作用により抑制される。エストロジェンの作用による増強作用は好中球機能の促進、感染部位への食細胞の供給の増加、子宮内容物の排除、子宮内抗体生産の促進、および非細胞性殺菌物質生産の促進である [8, 28, 37, 61, 66, 83, 88]。そのため採材時に万が一子宮内に軽度の細菌汚染が生じたとしても黄体期に比較して清浄化を期待できる。子宮内膜バイオプシーを行う際も、採材時期は汚染による子宮内膜炎発生の危険が最小である発情期に行うのが良いとされている [54]。

また卵管膨大部で受精した卵子が子宮内に下降してくるには約 3~4 日必要とするため [3, 29]、採材時に万が一軽度な子宮内の損傷を生じたとしても十分修復が可能と思われる。

さらに採材に生理食塩液を使用したのは、生理食塩液は子宮内膜への刺激性が少ないと言われているためである [60, 73]。

今回の受胎率は授精回数が 1~3 回のもので 56.1% (92/164)、全体で 50.7% (110/217) であった。これは人工授精による受胎率の目標値や [49, 54] 報告されている受胎率 [21, 72, 75] と同程度である事から、今回用いた採材方

法および採材時期は受胎に影響しなかったものと考えられる。

受胎には細菌数、リンパ球の割合、および好中球の割合が影響することが考えられたので、それらの要因を明らかにするために主成分分析を行った。その結果、上皮細胞と炎症細胞に関する主成分、細菌に関する主成分、マクロファージ様細胞に関する主成分、および炎症細胞に関する主成分が抽出された。

子宮内の細菌について、細菌に関する主成分が抽出されたが、この事については多くの報告がある。産褥期の子宮内にはほとんどの牛に様々な種類の細菌が存在し、これは分娩後数日でピークに達するが、その後次第に減少し30日目には全牛の10%前後となる [19, 20, 25, 41, 42, 59, 62, 79]。この時期に分離されるおもな細菌は *Actinomyces pyogenes* (以下 *A. pyogenes*)、*Streptococcus spp.*、*Staphylococcus spp.*、腸内細菌などである [14, 25, 59, 61]。一方、繁殖期の子宮内の細菌については意見が分かれている。健康な子宮は無菌であり、子宮内に細菌が存在することは受胎の妨げになり、低受胎の原因は非特定細菌の「Low grade infection」であるとする意見 [14, 18, 23, 27, 31, 36, 39, 48, 49, 50, 61, 70, 82] と、健康な子宮にも *Streptococcus spp.*、*Staphylococcus spp.*、*Bacillus spp.* などの細菌が存在するが、これらの受胎への影響は少ないという意見 [12, 23, 25, 26, 27, 32, 34, 35, 38, 59, 69, 78, 85] である。子宮内の細菌を分離した報告は多くあるが、細菌数を定量し受胎率との関係を見た報告は見当たらない。今回の細菌学的検査と受胎率との関係を見ると、繁殖期の子宮内に一定数以上の細菌 (66CFU/0.1ml) が存在すると受胎率が著しく低下した。

A. pyogenes は産褥期の子宮から頻繁に分離され、その重度で長期間の感染

は後の繁殖成績に悪影響を及ぼすが [16, 26, 59, 67, 79]、通常は速やかに子宮から排除される [25, 32, 33, 49]。今回も *A. pyogenes* が分離されるものはいなかった。また産褥期の子宮からは *Bacteroides spp.*、*Clostridium spp.* および *Fusobacterium spp.* などの嫌気性菌も分離され、これらの嫌気性菌が *A. pyogenes* と同時感染すると病原性は相乗的に増強されるといわれている [53, 56, 57, 61, 67, 68]。しかしこれらもまた分娩後自然に排除され繁殖期には分離されず [53, 77]、さらに単独での病原性は否定的である [68]。今回は嫌気性培養を実施しなかったが、今後の検討課題である。

感染症とは病原微生物が宿主の体内に侵入し、その抵抗に打ち勝って増殖し、一定の症状を示すことであり、子宮内に細菌が存在するだけでは子宮が細菌感染してはいるが、発症しているとはいえない。したがって子宮内に細菌が存在する場合は、それを感染と感染症とに区別する必要がある。本研究では沈渣中の CFU が 66/0.1ml 以上になると受胎率が有意に低下したことから、これを感染と感染症を区別するための指標にすることが可能である。また子宮内の細菌学的検査はその採材方法により結果が異なるため [27, 53]、繁殖期の子宮内の細菌が繁殖性に及ぼす影響の意見の違いは細菌分離のための採材方法の違いによるのかもしれない。今回用いた採材方法では膣や子宮頸管からの汚染が少なく、細菌を定量することができるため、子宮内の細菌学的環境を客観的に評価することが可能であった。

スメアー中に見られる子宮内の細胞が馬で報告されており [1, 7, 11, 15, 47, 63, 64, 87]、赤血球、円柱上皮細胞、好中球、リンパ球およびマクロファージである。今回の牛での観察でもこれらの細胞とさらに好酸球が観察された。そ

の中で赤血球をのぞくと、上皮細胞、好中球、およびリンパ球が主なものであった。

上皮細胞と炎症細胞に関する主成分が抽出されたが、この主成分の判別分析の結果、変数選択を標準全変数、変数増加法、変数減少法、変数増減法のいずれによっても受胎群と非受胎群の間の共分散行列は等しいといえないという結果が得られた。このことは、上皮細胞と炎症細胞の比率と受胎率の間には関係が認められないことを示す。

上皮細胞の出現割合に影響を及ぼす要因は採材の難易度であり、注入した生理食塩液が容易に回収できない場合、子宮角への圧迫を繰り返して回収したため、そのような場合には上皮細胞の出現割合が高くなるものと思われた。したがって上皮細胞の出現割合で子宮内環境を評価することは不可能である。

炎症細胞に関する主成分が抽出された。上皮細胞以外の細胞の出現割合に影響を及ぼす要因は出血であると思われた。これは採材が排卵後であったため生理的な子宮内出血があったためである。しかし循環血液中の好中球とリンパ球の割合は一定の範囲内にあり、循環血液からと子宮内から回収された白血球における好中球の割合はほぼ等しい [2]。したがって子宮内のこれらの割合の一定範囲からの逸脱は子宮内環境の異常を反映するものと思われた。

子宮内に細菌が侵入すると生体はそれを排除しようとし、その主役をなすのは好中球による食作用 [10, 22, 37, 61]、好中球に由来すると思われる非細胞性殺菌物質 [6, 37] および免疫グロブリンであり [10, 32, 61]、子宮内膜バイオプシー所見において急性炎症時には好中球が増加する [17, 33]。また牛の子宮内にエンドトキシンを注入すると、スメアー中の細胞は好中球が95%を占

めた [40] 。今回の成績では炎症細胞における好中球の割合が65.5%以上になると受胎率が有意に低下した。また馬の子宮内の好中球は急性炎症時に増加する [1, 11, 15, 47, 63, 64, 87] 。以上のことから牛子宮内の好中球割合の増加は子宮内不良環境の診断的指標になるものと思われた。

子宮内膜や子宮腔内の好中球は発情期に生理的に増加する [13, 22, 25] 。さらに子宮内に侵入してきた精子に反応して増加する [52] 。したがって授精後に排卵した子宮内には正常であればある程度の好中球が存在するであろう。逆に好中球が極度に少ない事は子宮防御機構の欠陥を示すかもしれない。頭数が少なかったため有意差は認められなかったが、炎症細胞における好中球の割合が10%未満ではその受胎率が20% (1/5) と低かった。また細菌が無限大に分離されたもののうち2頭は細胞成分が全く見られなかった。このことも子宮防御機構の欠陥と関係しているのかもしれない。

子宮内膜中のリンパ球は慢性炎症時に増加するといわれているが [17]、今回の成績ではリンパ球の割合が23.3%以下になると受胎率が有意に低下し、その増加よりも減少が受胎率と関係していた。しかし好中球の割合とリンパ球の割合の間には相関係数が-0.9363という大きな負の相関関係が見られた。また細胞学的不良環境として摘発された40頭中29頭 (72.5%) は好中球の割合とリンパ球の割合の両方で摘発されている。したがってリンパ球の割合の減少は好中球割合の増加によるものと考えられた。

子宮内の好酸球の意義については明らかにされていない。バイオブシー所見において馬に出現するという報告や [76] 、ビブリオ感染牛に出現し [17]、これは不妊と関係した子宮内膜の異常であるという報告がある [79] 。また馬

の炎症の経過中に出現し [11, 46, 58]、この存在は免疫システムの崩壊を示し、細菌の持続的存在に寛容となり予後が良くないとする意見もある [7]。一方、牛の子宮内膜組織中の好酸球の重度な浸潤は繁殖性を妨げないという意見もある [74]。今回の成績では炎症細胞における好酸球の割合が30%以上と著しく高値を示すものが2頭いた。これらの2頭はいずれも不受胎であり、好酸球の著しい増加は子宮内環境の異常を示すものかもしれない。しかし頭数が少ないためさらに検討が必要である。

牛子宮内の細胞学的検査の報告が僅かにある [78, 85]。Williamsら [85] は授精直前の発情期の子宮内スワブの細菌学的検査、細胞学的検査および受胎との関係を調べ、この報告ではこれらの間には有意な関係は見られなかったが、細胞学的検査と受胎との間は有意なものに近かったと述べている。そこでの細胞診による炎症の分類は好中球の割合によるもので、5%以下を正常、5～25%を軽度、25～75%を中度、75%以上を重度としている。今回の成績では炎症細胞における好中球の割合が65.5%以上になると受胎率が低下し、これはWilliamsら [85] の報告の中度に相当するものであった。

細菌学的検査または細胞学的検査のいずれかで不良と診断されたものは54頭であったが、このうち両方の検査で摘発されたものは3頭(5.6%)と低率であった。Easleyら [18] も細菌学的検査結果と子宮組織の細胞学的変化には関係がないことを報告している。しかし、子宮内の防御機構において好中球が重要な役割を果たしているので [8, 28, 37, 61, 66, 83, 88]、両者の間に全く関係がないと考えることは困難である。

細菌学的検査で摘発されたものの受胎率は5.9% (1/17)、細胞学的検査で

摘発された受胎率は32.5% (13/40) で、細菌学的検査で摘発されものでは受胎する可能性がほとんど無く細胞学的検査よりも重度な子宮内環境の異常を示しているものと思われる。

細胞診で子宮内膜炎と診断された牛の多くから細菌が分離されなかったとの報告があり、その原因は細菌が排除された後も炎症が残り、子宮内膜炎の治癒経過において微生物が最初に消失し、後に炎症が消失するためであると言われている [32, 33, 35, 54, 78] 。

馬では細菌学的検査で結論に達しない場合、子宮内の好中球が増加していることを見ることは子宮感染の良い指標である [87] 。

今回の分娩後の経過日数と子宮内不良環境の関係を見てみると、細菌学的環境は分娩後90日までに発生が多くその後は低下するのに対し、細胞学的環境は分娩後90日以降一旦低下した後、150日以降に再び増加する傾向にあった。

以上の報告および今回の成績から、子宮内の軽度な細菌感染 ——> 好中球出現 ——> 細菌の消失 ——> 好中球の消失 ——> 治癒という経過をとることが推測できる。

一般に臨床獣医師は数回の授精で受胎しない場合、子宮内膜炎の正確な診断が困難であるため、診断的治療として機械的に子宮内に薬液の注入を行う。しかしその効果を疑問視する報告が多くある [9, 24, 28, 45, 55, 59, 61, 65, 81] 。

今回の成績では子宮内不良環境の発生は分娩後90日未満で高かった。また分娩後の授精回数との関係をみると、細菌学的不良環境は授精回数が3回まではその回数が増すにつれ減少した。

分娩後受胎率に最も影響するのは分娩から授精までの日数および授精までの

発情回数であり、それらが増加するにつれ受胎率は上昇する [72, 75, 84]。これらのことは、今回の子宮内不良環境が分娩後一定の期間はその日数が経過するにつれ減少し、授精回数が 3 回目までは授精回数が増すにつれ減少する経時変化と一致している。以上のことから子宮内不良環境の多くは分娩後の清浄化の遅れであり、それらは時間の経過や発情周期を繰り返す事により自然に清浄化されるという説 [88] を裏付けるものである。

一方、分娩後一定期間以上経過したものや、授精回数が 4 回目以上のものにも子宮内不良環境が多かった。特に授精回数が 4 回以上のものの受胎率は他に比べてやや低く、その時不受胎であったものや分娩後 210 日以降の授精で不受胎であったものに子宮内不良環境が多かった (表13)。授精回数が 4 回以上のものの受胎率が低い事は Fonseca ら [21] も報告している。これらのものについて、正常な子宮の防御機構が備わっているならば長期間同一の細菌感染が持続するとは考えにくい。むしろ、馬でいわれている易感染性馬のような子宮の防御機構に欠陥のあるものがあり [4, 5, 30, 43, 51, 86]、このため長期間子宮内不良環境が清浄化されずに維持されたり、または感染が繰り返し生じているものと推測される Hartigan [32] もこのことを指摘している。

現在最も一般的に行われている子宮の検査方法に腔や発情粘液の肉眼的および顕微鏡的検査がある。発情粘液中の好中球の出現は子宮内膜炎の存在を示唆するとの報告があるが [44, 48, 71, 80]、子宮内膜炎の存在やその程度を正確に知ることは困難であるとも言われている [14, 28, 59, 61, 77, 78]。

今回の成績では、発情粘液中の好中球出現程度が増したり好中球集塊が出現するものに子宮内不良環境が多い傾向にあったが、各群間で有意差は認められ

なかった。また、発情粘液中の好中球出現程度と沈渣中の CFU数、炎症細胞における好中球の割合、および炎症細胞におけるリンパ球の割合との相関関係は認められなかった。この事は、発情粘液の検査では子宮内の異常を子宮頸管炎や腔炎と鑑別することが不可能なことを示す。したがって発情粘液の好中球の出現状況を検査することにより、子宮内不良環境をある程度推測することは可能かもしれないが、その精度は限られたものと思われる。

今回の調査で不受胎であったもの107 頭のうち、細菌学的環境または細胞学的環境が不良とされたものは40頭で、不受胎牛の37.4%にあたった。このことは子宮内不良環境は不受胎の原因の重要な位置を占めると言うことを示すかもしれない。このうち初回授精で不受胎であったものは分娩後の清浄化の遅れであり自然治癒する可能性が大きい、4回以上の授精や分娩後210 日以降の授精で不受胎であったものは子宮その他の欠陥が考えられ、これらについては正確な診断および適切な治療が必要と思われる。授精回数が4回以上で、とくに子宮内環境が正常で不受胎の場合はRepeat breederとして子宮以外の欠陥を考慮する必要もある。

現在、子宮内膜炎の客観的な診断方法が確立されていないため、治療方法として多くの方法が報告されているにも拘らず [14, 28, 49, 55, 77, 89]、その効果の比較は困難である。したがって、どの時期にどの様な治療を行うことが最も効果的であり、かつ経済的であるかは不明である。

今回、子宮の灌流液を検査することにより子宮内の細菌学的環境および細胞学的環境を客観的に評価することができた。今後一定の評価方法を用いた子宮内環境の評価の下で、効果的かつ経済的な子宮内治療を確立する必要があると

思われる。

V. 総括

分娩後の牛子宮内の生物学的環境を把握するために、ホルスタイン種経産牛217頭を用い授精後に排卵確認をし、子宮を生理食塩液で灌流し、灌流液の細菌学的検査および細胞学的検査をおこなった。また子宮内不良環境の発生要因を調べるために、分娩から検査までの期間および分娩後に受けた授精回数を調査した。さらに、発情粘液中の好中球の出現と子宮内環境との関係を検討した。その結果以下の結論を得た。

1. 多変量解析の結果、受胎に影響する要因として子宮内灌流液の沈渣中のCFU、炎症細胞におけるリンパ球の割合、および炎症細胞における好中球の割合が抽出された。

2. 分離された細菌は *Streptococcus spp.*、*Staphylococcus spp.*、*Bacillus spp.*、*Pseudomonas spp.* および *E. coli* であり、これらは菌種にかかわらず一定数以上分離されると受胎を妨げた。

3. 沈渣を培養した場合66CFU/0.1 ml以上の同一のコロニーが分離された場合は受胎する可能性が低く、本試験においては17頭中受胎したのは1頭(5.9%)のみであった。

4. 灌流液中に出現する細胞は赤血球、上皮細胞、好中球、好酸球、リンパ球、およびマクロファージ様細胞であり、赤血球以外では上皮細胞、好中球およびリンパ球で96.4%を占めた。

5. 灌流液中の上皮細胞の出現割合と受胎率の間には関係が見られず、上皮細胞の出現割合で子宮内環境を評価することは不可能であった。

6. 灌流液中の上皮細胞、好中球、リンパ球、好酸球およびマクロファージ様細胞 500個を数え、好中球、リンパ球、好酸球およびマクロファージ様細胞における好中球の出現割合が65.5%以上になるか、またはリンパ球の割合が23.3%以下になると受胎率が有意に低下した。

7. 子宮内不良環境は分娩後比較的早期に多く、また授精を反復（4回以上）することにより分娩後 150日以降に再び増加した。

8. 発情粘液中の好中球の出現により、子宮内不良環境をある程度予測することは可能であったが、その精度は低かった。

9. 子宮の灌流液の細菌学的検査および細胞学的検査により子宮内不良環境を客観的に評価することができ、不受胎牛 107頭のうち40頭（37.4%）を子宮内環境不良として摘発することができた。

以上の事から、灌流液の細菌学的検査および細胞学的検査は牛子宮内の生物学的環境の診断に有効と思われる。

VI. 謝辞

本論文の作成に当たり、終始懇篤なる御指導と御校閲を賜った麻布大学内科学第二講座小林好作教授、内科学第三講座松浦健二教授、家畜衛生学第二講座芦田浄美教授に深甚の謝意を表します。また学位取得にあたり多大なる御助言をいただいた国際協力事業団佐藤輝夫先生に厚く感謝致します。さらに日常業務に多大なるご協力をいただいた南空知農業共済組合家畜診療所の各位に感謝致します。

VII. 文献

1. Adams, G. P., and Ginther, O. J. 1989. Efficacy of intrauterine infusion of plasma for treatment of infertility and endometritis in mares. *J. A. V. M. A.* 194:372-378.
2. Anderson, K. L., Hemeida, N. A., Frank, A., and Whitmore, H. L. 1985. Collection and phagocytic evaluation of uterine neutrophilic leukocytes. *Theriogenology.* 24:305-317.
3. Arthur, G. E. 1975. *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 4th ed., Bailliere Tindall, London, 32-48.
4. Asbury, A. C., Haliwell, R. E. W., Foster, G. W., and Longino, S. J. 1980. Immunoglobulines in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis. *Theriogenology.* 14:299-308
5. Asbury, A. C., Schultz, K. T., Klesius, P. H., Foster, G. W., and Washburn, S. M. 1982. Factors affecting phagocytosis of bacteria by neutrophils in the mare's uterus. *J. Reprod. Fert., Supple.* 32:151-159.
6. Black, W. G., Simon, J., and Kidder, H. E. 1954. Bactericidal activity of

- the uterus in the rabbit and the cow. *Am. J. Vet. Res.* 15:247-251.
7. Bowen, J. M. , Ley, W. B. , Jones, L. , Sutherland, J. , de Barros, C. , Bergeron, H. , Petrites-Murphy, M. , Bollinger, D. , Kloppe, L. , and Pugh, D. G. 1987. Dynamic changes which accompany acute and chronic uterine infection in the mare. *J. Reprod. Fert., Supple.* 35:675-677.
8. Carson, R. L. , Wolfe, D. F. , Klesius, P. H. , Kempainen, R. J. and Scanlan, C. M. 1988. The effects of ovarian hormones and on uterine defense to *corynebacterium pyogenes* in cows. *Theriogenology.* 30:91-97.
9. Casida, L. E. 1961. Present status of the repeat-breeder cow problem. *J. Dairy Sci.* 44:2323-2329.
10. Corbel, L. B. , Corbel, R. R. , and Winter, A. J. 1975. Bovine venereal vibriosis: Activity of inflammatory cells in protective immunity. *Am. J. Vet. Res.* 36:403-406.
11. Couto, M. A. , and Hughes, J. P. 1984. Technique and interpretation of cervical and endometrial cytology in the mare. *J. Equine Vet. Sci.* 4: 265-272.

12. Dawson, F. L. M. 1950. The microbial content and morphological character of the normal bovine uterus and oviduct. J. Agric. Sci. 40: 150-157.
13. Dawson, F. L. M. 1959. The normal bovine uterus physiology, histology and bacteriology. Vet. Rev. Anat. 5:73-89.
14. Dawson, F. L. M. 1960. Bovine endometritis: A review. Br. Vet. J. 116: 448-466.
15. Digby, N. J. W. and Ricketts, S. W. 1982. Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice 1978-1981. J. Reprod. Fert., Supple. 32:181-185.
16. Dobson, D. P., and Noakes, D. E. 1990. Use of a uterine pessary to prevent infection of the uterus of the cow after parturition. Vet. Rec. 127:128-131.
17. Dozsa, L., Olson, N. O., and Campbell, A. 1960. The uterine biopsy technique for following the histologic changes caused by *Vibrio fetus* in the uterine mucosa. Am. J. Vet. Res. 21:878-883.

18. Easley, G. T. , Leonard, R. H. , and Trotter, D. M. 1951. Bacteriological, pathological and clinical studies of the reproductive tract of the hereford cow and a bacteriological study of hereford bull semen. North Am. Vet. 32:258-266.
19. Eduvie, L. O. , Osori, D. I. K. , Addo, P. B. , and Njoku, C. O. 1984. Bacteriological investigation of the postpartum uterus: Relationship to involution and histopathological findings. Theriogenology. 21: 733-745.
20. Elliott, L. , McMahon, K. J. , Gier, H. T. , and Marion, G. B. 1968. Uterus of the cow after parturition: Bacterial content. Am. J. Vet. Res. 29: 77-81.
21. Fonseca, F. A. , Brtt, J. H. , McDaniel, B. T. , Wilk, J. C. , and Rakes, A. H. 1983. Reproductive traits of Holsteins and Jerseys. Effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrus cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. J. Dairy Sci. 59:1128-1147.
22. Frank, T. , Anderson, K. L. , Smith, A. R. , Whitmore, H. L. , and Gustafsson, B. K. 1983. Phagocytosis in the uterus: A review. Theriogenology. 20:

23. Gibbons, W. J., Attleberger, M. H., Kiesel, G. K., and Dacres, W. G. 1959. The bacteriology of the cervical mucus of cattle. *Cornell Vet.* 49: 255-265.
24. Gilbert, R. O. 1992. Bovine endometritis: The burden of proof. *Cornell Vet.* 82:11-14.
25. Griffin, J. F. T., Hartigan, P. J. AMD Nunn, W. R. 1974. Non-specific uterine infection and bovine fertility. I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks post-partum. *Theriogenology.* 1:91-106.
26. Griffin, J. F. T., Hartigan, P. J., and Nunn, W. R. 1974. Non-specific uterine infection and bovine fertility. II. Infection patterns and endometritis before and after service. *Theriogenology.* 1:107-114.
27. Gunter, J. J., Collins, W. J., Owen, J., Sorensen, A. M., Scales, J. W., and Alford, J. A. 1955. A study of bacteria in the reproductive tract of dairy animals and their relationship to infertility. *Am. J. Vet. Res.* 16:282-285.

28. Gustafsson, B. K. 1984. Therapeutic strategies involving antimicrobial treatment of the uterus in large animals. *J. A. V. M. A.* 185: 1194-1198.
29. Hafez, E. S. E. 1974. *Reproduction in Farm Animals*, 3rd ed., Lea and Febiger, Philadelphia, 123-142.
30. Hansen, P. J., and Asbury, A. C. 1987. Opsonins of *Streptococcus* in uterine flushings of mares susceptible and resistant to endometritis: Control of secretion and partial characterization. *Am. J. Vet. Res.* 48: 646-650.
31. Hardenbrook, H. 1958. The diagnosis and treatment of nonspecific infections of the bovine uterus and cervix. *J. A. V. M. A.* 132:459-464.
32. Hartigan, P. J. 1978. The role of non-specific uterine infection in the infertility of clinically normal repeat-breeder cows. *Vet. Sci. Commun.* 1:307-321
33. Hartigan, P. J., Griffin, J. F. T., and Nunn, W. R. 1974. Some observations on *corynebacterium pyogenes* infection of the bovine uterus. *Theriogenology.* 1:153-167.

34. Hartigan, P.J., Murphy, J. A., Nunn, W. R., and Griffin, J. F. T. 1972. An investigation into the causes of reproductive failure in dairy cows. I. Gross and microscopic observations on the genitalia of slaughtered non-pregnant cows. *Irish Vet. J.* 26:225-228.
35. Hartigan, P. J., Murphy, J. A., Nunn, W. R., and Griffin, J. F. T. 1972. An investigation into the causes of reproductive failure in dairy cows. II. Uterine infection and endometrial histopathology in clinically normal repeat-breeder cows. *Irish Vet. J.* 26:245-247.
36. Hatch, R. D., Feenstra, E. S., and Jennings, L. F. 1949. A bacteriologic survey of the reproductive tract of infertile cows. *J. A. V. M. A.* 114: 131-133.
37. Hawk, H. W., Brinsfield, T. H., Turner, G. D., Whitmore, G. W., and Norcross, M. A. 1965. Effect of ovarian status on induced acute inflammatory responses in cattle uteri. *Am. J. Vet. Res.* 25:362-365.
38. Hawk, H. W., Kiddy, C. A., Wilson, J. B., Esposito, M., and Winter, A. J. 1958. Bacteriological studies of uteri of clinically normal cows of low fertility. *J. Dairy Sci.* 41:120-128.

39. Hinze, P. M. 1959. Diagnosis and treatment of nonspecific infertility in the dairy cow. J. A. V. M. A. 134:302-307.
40. Hussain, A. M., and Daniel, R. C. W. 1992. Effects of intrauterine infusion of *Escherichia coli* endotoxin in normal cows and in cows with endometritis induced by experimental infection with *Streptococcus agalactiae*. Theriogenology. 37:791-810.
41. Hussain, A. M., Daniel, R. C. W., and O'Boyle, D. 1990. Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows. Theriogenology. 34:291-302.
42. Johanns, C. J., Clark, T. L., and Herrick, J. B. 1997. Factors affecting calving interval. J. A. V. M. A. 151:1692-1704.
43. 鎌田正信. 1990. 易感染性雌馬と子宮の感染防御機構. 獣医畜産新報. 43: 9-12.
44. 金子一幸, 吉原進平. 1983. 発情期の子宮頸管粘液中の白血球による子宮内膜炎の診断について. 家畜診療. 237:31-35.
45. 金子一幸, 吉原進平, 山中栄. 1989. 低受胎牛に対する 2%ポビドンヨー

ド溶液の子宮注入効果について. 家畜診療. 307:43-45.

46. Kenney, R. M. 1978. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J. A. V. M. A.* 172:241-262.
47. Knudsen, O. 1964. Endometrial cytology as a diagnostic aid in mares. *Cornell Vet.* 54:415-422.
48. Kumakura, T., Kaneda, Y., Miyake, Y., Goto, T., and Kanematsu, S. 1989. Ovarian function and fertility after timed insemination following the treatment with PGF_{2α} and LH-RH analogue in the cow. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 35:185-191.
49. Laing, J. A. 1979. Fertility and infertility in domestic animals, 3rd ed., Bailliere Tindall, London, 1-4.
50. Lindley, D. C., and Hatfield, R. C. 1952. Observations on the bacterial flora of infertile dairy cows. *J. A. V. M. A.* 120:12-15.
51. Liu, I. K. M., Cheung, A. T. W. 1986. Immunoglobulin and neutrophil defense against uterine infection in mares resistant and susceptible to

chronic endometritis: A review. J. A. V. M. A. 189:700-702.

52. Mahajan, S. C. , and Menge, A. C. 1967. Influence of reproductive phase on the inflammatory response and rate of sperm removal in the uterus and oviduct of the cow. Am. J. Vet. Res. 28:1037-1041.
53. Messier, S. , Higgins, R. , Couture, Y. , and Morin, M. 1984. Comparison of swabbing and biopsy for studying the flora of the bovine uterus. Canadian Vet. J. 25:283-288.
54. Morrow, D. A. 1986. Current Therapy in Theriogenolgy, 2nd ed. , Saunders, Philadelphia, 383-394, 723, 422
55. Murray, R. D. , Allison, J. D. , and Gard, R. P. 1990. Bovine endometritis: Comparative efficacy of alfaprostol and intrauterine therapies, and other factors influencing clinical success. Vet. Rec. 127:86-90.
56. Noakes, D. E. , Till, D. , and Smith, G. R. 1989. Bovine uterine flora post partum: A comparison of swabbing and biopsy. Vet. Rec. 124:563-564.
57. Olson, J. D. , Ball, L. , Mortimer, R. G. , Farin, W. , Adney, W. S. and Huffman, E. M. 1984. Aspects of bacteriology and endocrinology of cows with

- pyometra and retained fetal membranes. *Am. J. Vet. Res.* 45:2251-2255.
58. Olsen, L. M. , Al-Bagdadi, F. K. , Richardson, G. F. , Godke, R. A. , Titkemeyer, C. W. , and Thompson, D. L. 1992. A histological study of the effect of saline and povidone-iodine infusions on the equine endometrium. *Theriogenology.* 37:1311-1325.
59. 小野浩臣. 1989. 大中動物における子宮用薬とその応用. 獣医畜産新報. 817:484-488.
60. Oxender, W. D. and Seguin, B. E. 1976. Bovine intrauterine therapy. *J. A. V. M. A.* 168:217-219.
61. Paisley, L. G. , Mickelsen, W. D. , and Anderson, P. B. 1986. Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: A review. *Theriogenology.* 25:353-381.
62. Rasbech, N. O. 1950. Den normale involutio uteri hos koen. *Nord. Vet. Med.* 2:655-687.
63. Ricketts, S. 1989. The barren mare. Diagnosis, prognosis, prophylaxis and treatment for genital abnormality. *Vet. Rec. In Practice.* 119-125.

64. Ricketts, S. W., and Mackintosh, M. E. 1987. Role of anaerobic bacteria in equine endometritis. *J. Reprod. Fert., Supple.* 35:343-351.
65. Roberts, S. J. 1956. An evaluation of uterine infusions for the treatment of infertility in cattle. *Cornell Vet.* 46:21-38.
66. Roth, J. A., Kaeberle, M. L., Appell, L. H., and Nachreiner, R. F. 1983. Association of increased estradiol and progesterone blood values with altered bovine polymorphonuclear leukocyte function. *Am. J. Vet. Res.* 44:247-253.
67. Ruder, C. A., Sasser, R. G., Williams, R. J., Ely, J. K., Bull, R. C., and Butler, J. E. 1981. Uterine infections in the postpartum cow. I. Effect of dietary crude protein restriction. *Theriogenology.* 15:561-572.
68. Ruder, C. A., Sasser, R. G., Williams, R. J., Ely, J. K., Bull, R. C. and Butler, J. E. 1981. Uterine infections in the postpartum cow II. Possible synergistic effect of *fusobacterium necrophorum* and *corynebacterium pyogenes*. *Theriogenology.* 15:573-580.
69. Rowson, L. E. A., Lamming, G. E., and Fry, R. M. 1953. The relationship between ovarian hormones and uterine infection. *Vet. Rec.* 65:

335-340.

70. Sagartz, J. W., and Hardenbrook, H. J. 1971. A clinical and histologic survey of infertile cows. *J. A. V. M. A.* 158:619-622.
71. 澤向豊. 1979. ウシ発情期子宮頸管粘液の白血球出現度と受胎との関係について. *家畜診療.* 189:25-28.
72. Shannon, F. P., Salisbury, G. W., and VanDemark, N. L. 1952. The fertility of cows inseminated at various intervals after calving. *J. Anim. Sci.* 11:355-360.
73. Seguin, B. E., Morrow, D. A. and Oxender, W. D. 1974. Intrauterine therapy in the cow. *J. A. V. M. A.* 164:609-612.
74. Simon, J, and McNutt, S. H. 1957. Histopathological alterations of the bovine uterus II. Uterine tissue from cows of low fertility. *Am. J. Vet. Res.* 18:241-245.
75. Slama, H., Wells, N. E., Adams, G. D., and Morrison, R. D. 1977. Factors affecting calving interval in dairy herds. *J. Dairy Sci.* 59: 1334-1339.

76. Slusher, S. H. , Freeman, K. P. , and Roszel, J. F. 1984. Eosinophils in equine uterine cytology and histology specimens. J. A. V. M. A. 184: 665-670.
77. Steffan, J. , Adriamanga, S. , Thibier, M. 1984. Treatment of metritis with antibiotics or prostaglandin F_{2α} and influence of ovarian cyclicity in dairy cows. Am. J. Vet. Res. 45:1090-1094.
78. Stephens, L. R. , Slee, K. J. , Poulton, P. , Larcombe, M. , and Kosior, E. 1986. Investigation of purulent vaginal discharge in cows, with particular reference to *Haemophilus somnus*. Australian Vet. J. 63:182-185
79. Studer, E. , and Morrow, D. A. 1978. Postpartum evaluation of bovine reproductive potential: Comparison of findings from genital tract examination per rectum, uterine culture, and endometrial biopsy. J. A. V. M. A. 172:489-494.
80. 高田秀文, 中尾敏彦, 森好政晴, 河田啓一郎. 1989. 乳牛の人工授精時における子宮頸管粘液性状ならびに乳汁中progesterone濃度と受胎との関係繁殖技術. 9:27-32.
81. Ulberg, L. C. , Black, W. G. , Kidder, H. E. , McDonald, L. E. , Casida, L. E. , and

- McNutt, S. H. 1952. The use of antibiotics in the treatment of low fertility cows. *J. A. V. M. A.* 121:436-440.
82. Vigue, R. F., Fitzgerald, W. H., and Castrucci, R. F. 1959. Management of bovine genital infections. I. Intravaginal therapy. *J. A. V. M. A.* 134: 308-311.
83. Watson, E. D. 1985. Oponising ability of bovine uterine secretions during the oestrous cycle. *Vet. Rec.* 117:274-275.
84. Whitmore, H. L., Tyler, W. J., and Casida, L. E. 1974. Effects of early postpartum breeding in dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 11:339-346.
85. Williams, B. L., Senger, P. L., Stephens, L. R., and Ward, A. C. S. 1988. Relationships between days post partum, observed estrus and uterine microflora in commercial dairy cows. *Theriogenology.* 30:555-561.
86. Williamson, P., Dunning, A., O'Connor, J., and Penhale, W. J. 1983. Immunoglobulin levels, protein concentrations and alkaline phosphatase activity in uterine flushings from mares with endometritis. *Theriogenology.* 19:441-448

87. Wingfield-Digby, N. J. 1978. The technique and clinical application of endometrial cytology in mares. *Equine Vet. J.* 10:167-170
88. 山内亮, 芦田浄美, 三船亮介, 中原達夫. 1955. 牛の子宮内膜炎の発生機転に関する研究 I. 病牛子宮内細菌の病原性の検討並びに人工発生試験. *Jpn. J. Anim. Rerod.* 1. : 45-48.
89. Young, I. M., Anderson, D. B., Plenderleith, R. W. J. 1984. Increased conception rate in dairy cows after early post partum administration of prostaglandin F_{2α} THAM. *Vet. Rec.* 115:429-431.

表1 授精回数別受胎率

授精回数 (回)	1	2	3	4 ≤	合計
頭 数 (頭)	54	54	56	53	217
受胎頭数 (頭)	30	30	32	18	110
受胎率 (%)	55.6a	55.6a	57.1a	34.0b	50.7

a-b の間に 5%の危険率で有意差あり

表2 分娩後の日数別にみた受胎率

分娩後の日数	<60	60 ≤	90 ≤	120 ≤	150 ≤	180 ≤	210 ≤	240 ≤
頭 数 (頭)	11	28	45	32	33	30	19	19
受胎頭数 (頭)	6	18	22	17	17	14	6	10
受胎率 (%)	54.5	64.3a	48.9	53.1	51.5	46.7	31.6b	52.6

a-b の間に 5%の危険率で有意差有り

表3 灌流液の原液0.1ml 中に 2個以上コロニーが分離された細菌

<i>Streptococcus spp.</i>	29株
<i>Staphylococcus spp.</i>	4株
<i>Bacillus spp.</i>	4株
<i>Pseudomonas spp.</i>	3株
<i>Escherichia coli</i>	2株
<i>Corynebacterium spp.</i>	1株
<i>Actinomyces spp.</i>	1株
未 同 定	8株

表4 沈渣 0.1ml中に10個以上コロニーが分離された細菌

<i>Streptococcus spp.</i>	27株
<i>Staphylococcus spp.</i>	7株
<i>Bacillus spp.</i>	4株
<i>Pseudomonas spp.</i>	3株
<i>Escherichia coli</i>	2株
未 同 定	4株

表5 灌流液中の全細胞における各種細胞の出現割合

上 皮 細 胞	51.4±30.0%
好 中 球	24.8±23.2%
好 酸 球	2.7± 4.8%
リ ン パ 球	20.2±14.0%
マクロファージ様細胞	0.9± 1.4%
平均±標準偏差	

表6 灌流液中の炎症細胞における各種細胞の出現割合

好中球	44.4±20.9%
好酸球	4.9± 6.2%
リンパ球	48.0±20.1%
マクロファージ様細胞	2.7± 4.7%
平均±標準偏差	

表7 灌流液中の全細胞を対象にした主成分分析における因子負荷量表

	I 主成分	II 主成分	III 主成分
原液中の C F U	0.212299	0.913734	-0.057138
沈渣中の C F U	0.211630	0.920682	-0.032405
好酸球の割合	-0.523736	0.226083	-0.136871
好中球の割合	-0.769381	0.070642	-0.303256
リンパ球の割合	-0.627203	0.111910	0.450512
マクロファージの割合	-0.009724	0.096414	0.879270
上皮細胞の割合	0.973414	-0.148901	0.005236
寄与率 (%)	32.8	25.5	15.6
累積 (%)	32.8	58.3	73.9

表8 灌流液中の炎症細胞を対象にした主成分分析における因子負荷量表

	I 主成分	II 主成分
原液中の C F U	0.403190	0.840805
沈渣中の C F U	0.440718	0.825330
好酸球の割合	0.068206	0.212028
好中球の割合	-0.910875	0.373252
リンパ球の割合	0.849344	-0.470580
マクロファージの割合	0.312599	0.071869
寄与率 (%)	33.5	30.0
累積 (%)	33.5	63.5

表9 沈渣中の CFUに関する判別得点別受胎率

判別得点	頭数	受胎頭数	受胎率
-2.201754以上	12	0	0.0
-1.937153 "	0	0	0.0
-1.672552 "	0	0	0.0
-1.407951 "	0	0	0.0
-1.143350 "	0	0	0.0
-0.878749 "	1	1	100.0
-0.614148 "	4	0	0.0
-0.349547 "	6	2	33.3
-0.084946 "	141	82	58.2
0.179655 "	53	25	47.2
合計	217	110	50.7

表10 リンパ球に関する判別得点別受胎率

判別得点	頭数	受胎頭数	受胎率
-0.524605以上	17	6	35.3
-0.404785 "	14	3	21.4
-0.284966 "	20	11	55.0
-0.165146 "	23	11	47.8
-0.045327 "	54	33	61.1
0.074493 "	49	27	55.1
0.194313 "	19	10	52.6
0.314132 "	14	7	50.0
0.433952 "	4	2	50.0
0.553771 "	1	0	0.0
合計	215	110	51.2

表11 好中球に関する判別得点別受胎率

判別得点	頭数	受胎頭数	受胎率
-0.554995以上	14	4	28.6
-0.444925 "	10	4	40.4
-0.334856 "	14	5	35.7
-0.224786 "	14	7	50.0
-0.114716 "	30	16	53.3
-0.004646 "	63	39	61.9
0.105424 "	37	17	45.9
0.215494 "	21	13	61.9
0.325563 "	11	5	45.5
0.435633 "	1	0	0.0
合 計	215	110	51.2

表12 好中球の割合とリンパ球の割合の関係

相関係数 -0.9363

検査結果	頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
好中球 +			
リンパ球 +	29	9	31.0
好中球 +			
リンパ球 -	9	4	44.4
好中球 -			
リンパ球 +	2	0	0.0
合 計	40	13	32.5

表13 細菌学のおよび細胞学的不良環境の関係

検査結果	頭数(頭)	割合(%)
細菌学的環境 +		
細胞学的環境 +	3	5.6
細菌学的環境 +		
細胞学的環境 -	12	22.2
細菌学的環境 -		
細胞学的環境 +	37	68.5
細菌学的環境 +		
細胞は観察されず	2	3.7
合計	54	100.0

表14 発情粘液中の好中球出現と子宮内環境の相関係数

	細菌数	好中球の割合	リンパ球の割合
好中球集塊	-0.0409	0.1530	-0.1394
好中球出現	0.1059	0.1803	-0.2074

表15 発情粘液中の好中球集塊と細菌学的子宮環境の関係

	好中球集塊有り	好中球集塊無し
検査頭数	78頭	139頭
子宮環境が不良な頭数	4頭	13頭
子宮環境が不良な割合	5.1%	9.4%

表16 発情粘液中の好中球集塊と細胞学的子宮環境の関係

	好中球集塊有り	好中球集塊無し
検 査 頭 数	78頭	139頭
子宮環境が不良な頭数	20頭	20頭
子宮環境が不良な割合	25.6%	14.4%

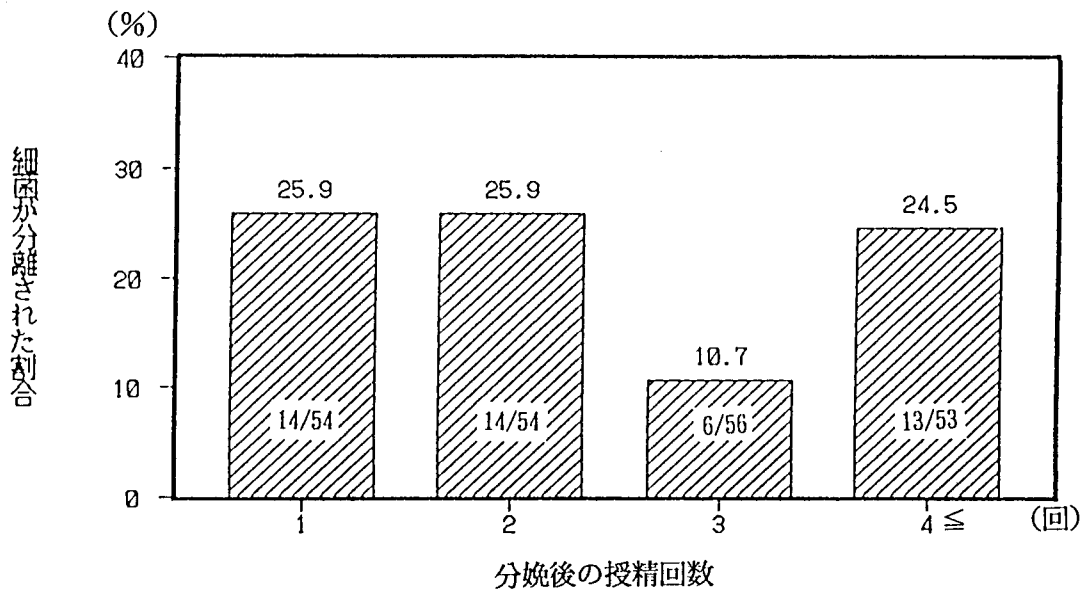


図1 授精回数別の原液における細菌分離率

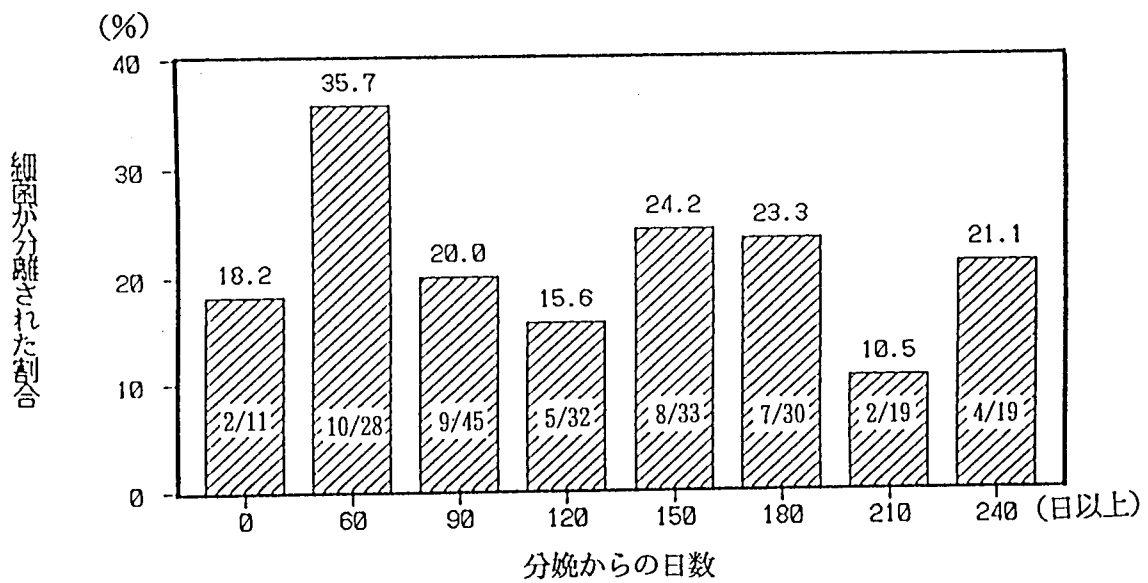


図2 経過日数別の原液における細菌分離率

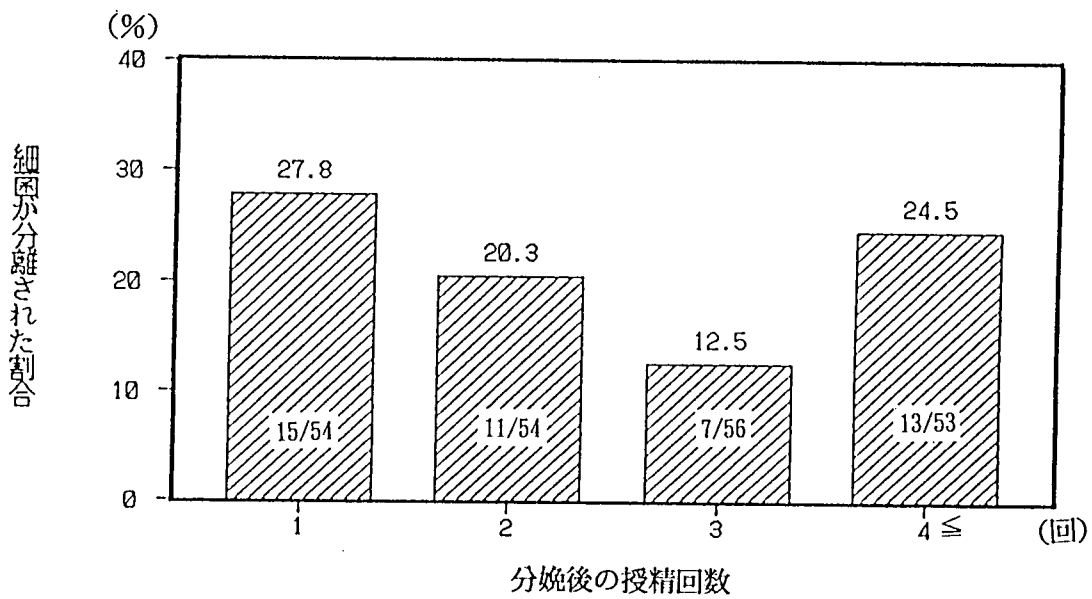


図3 授精回数別の沈渣における細菌分離率

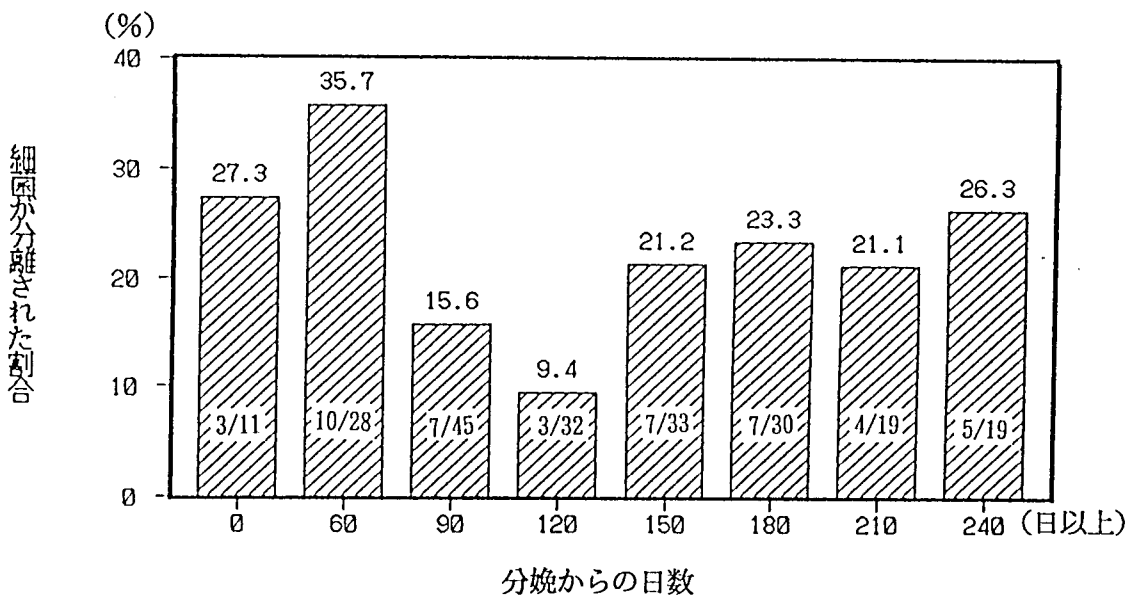


図4 経過日数別の沈渣における細菌分離率

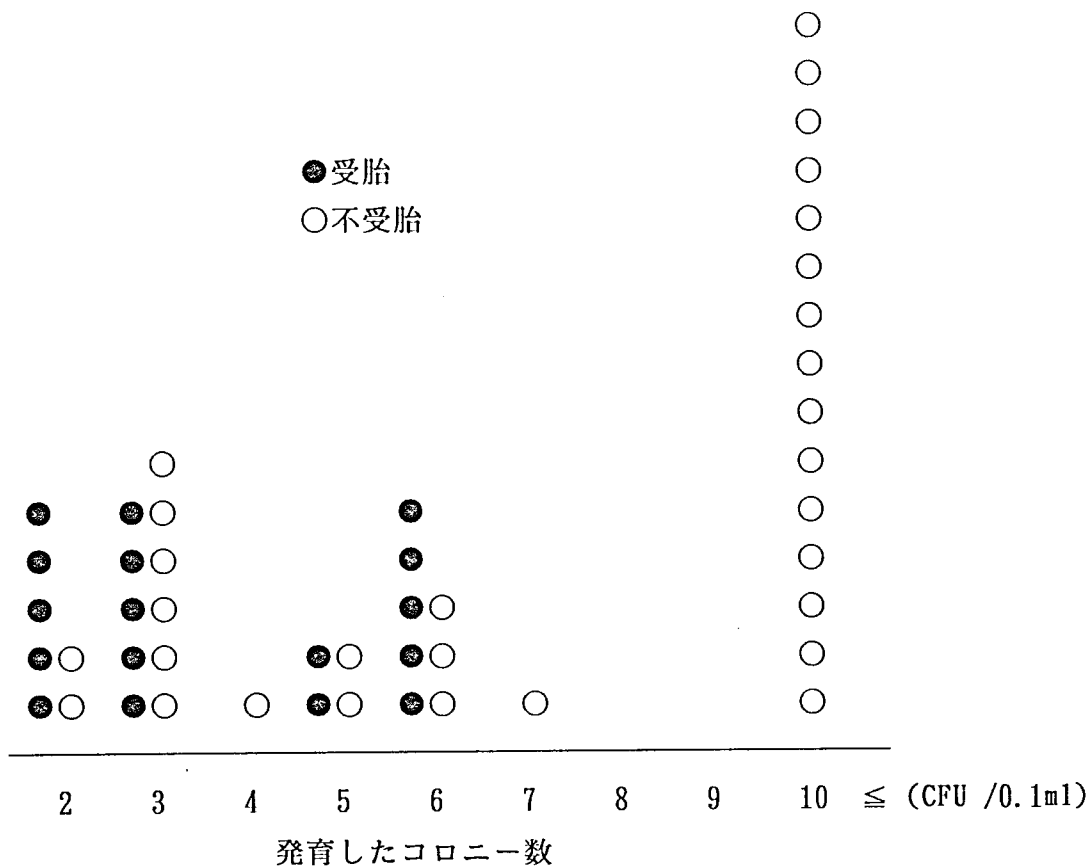


図5 原液を培養した場合の細菌分離および繁殖成績

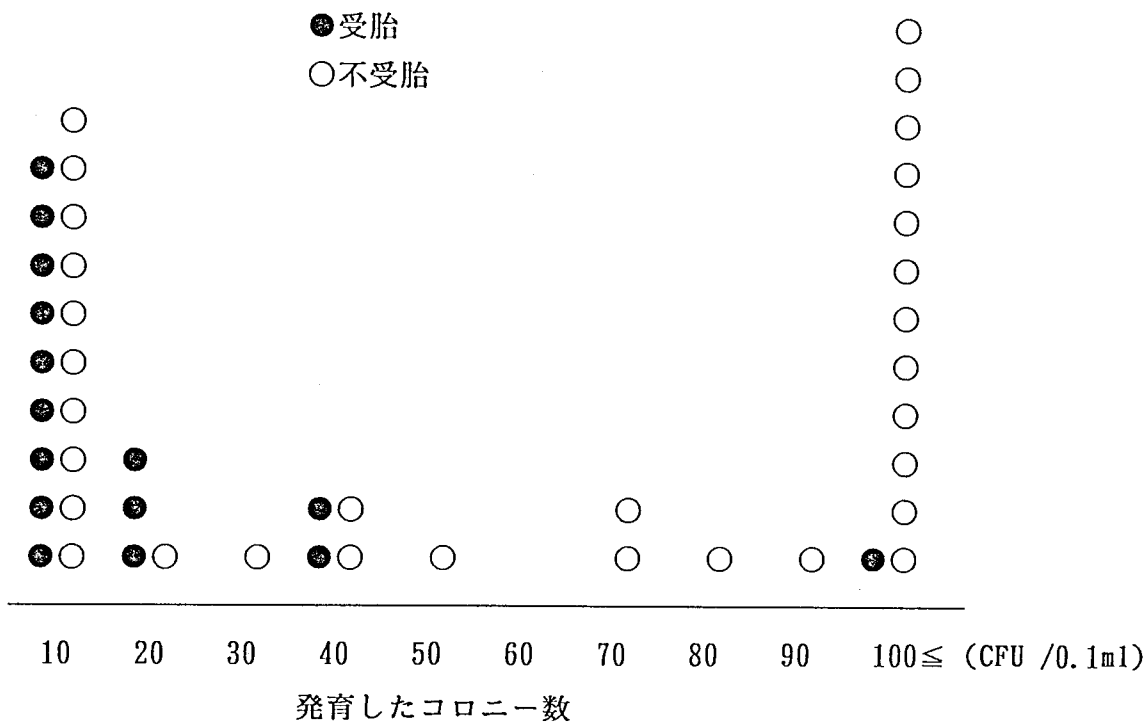


図6 沈渣を培養した場合の細菌分離および繁殖成績

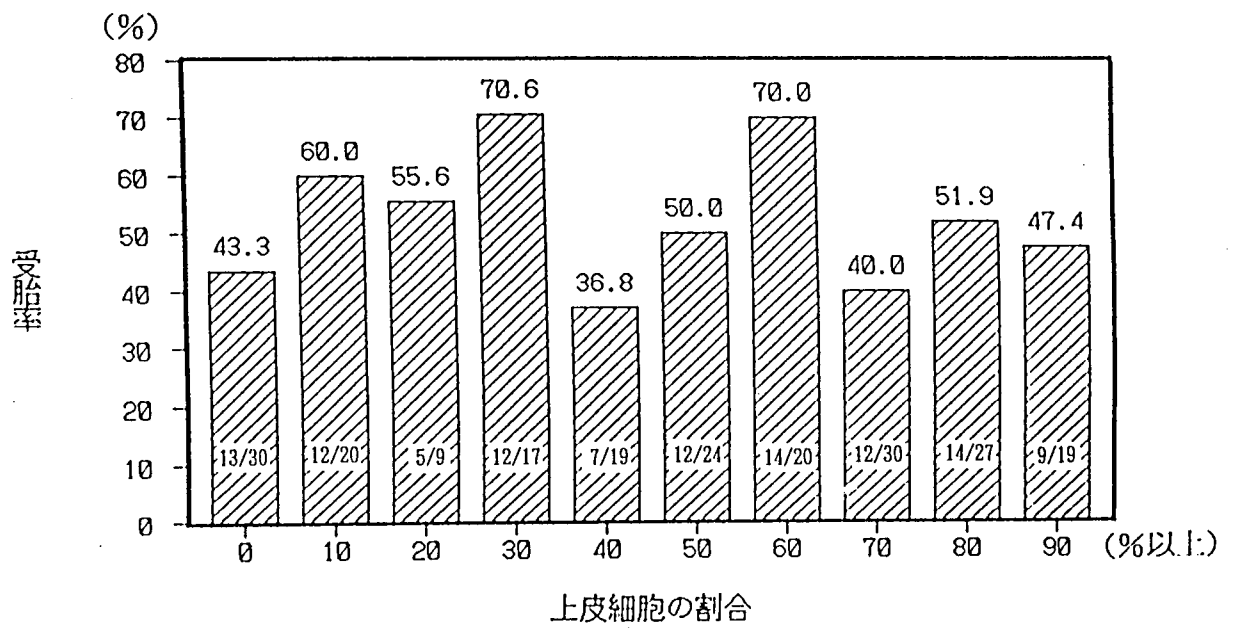
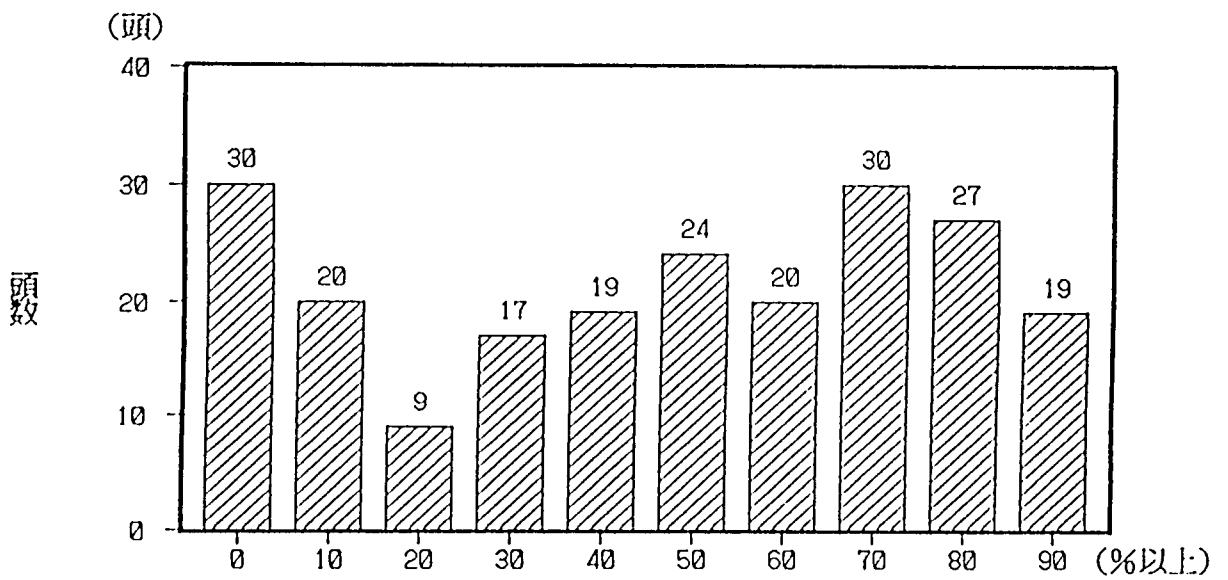


図7 全細胞における上皮細胞の出現および受胎率

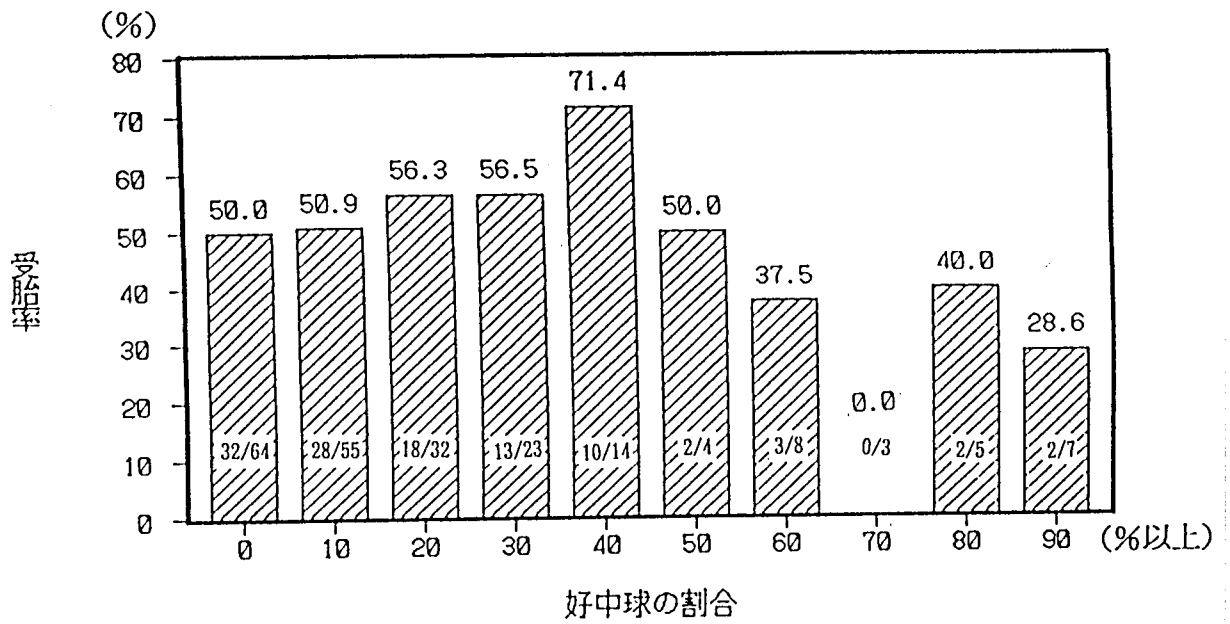
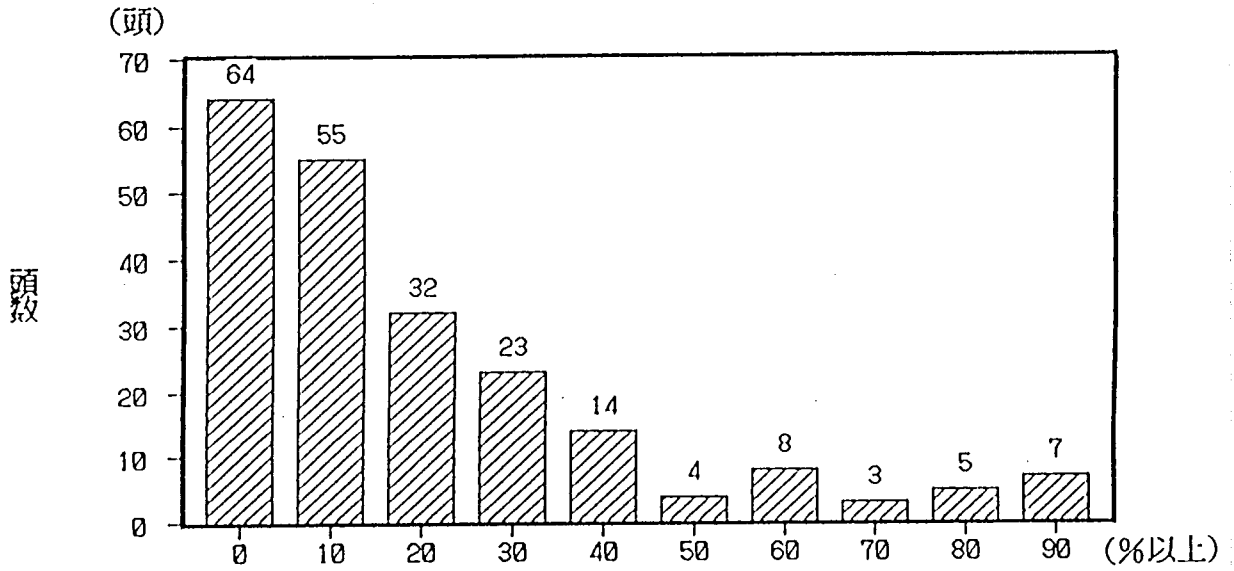


図8 全細胞における好中球の出現および受胎率

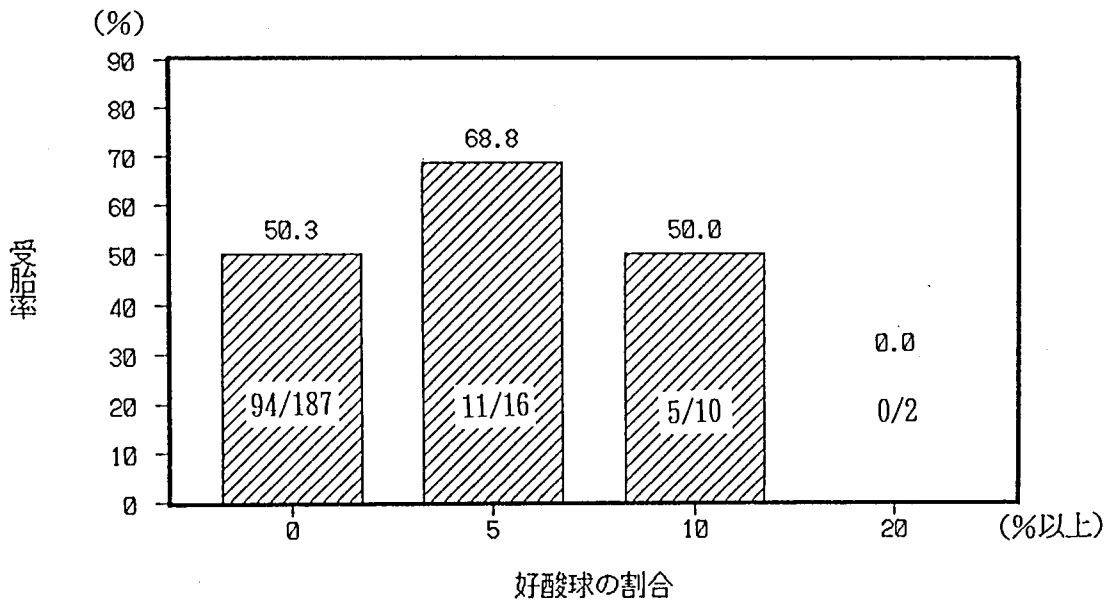
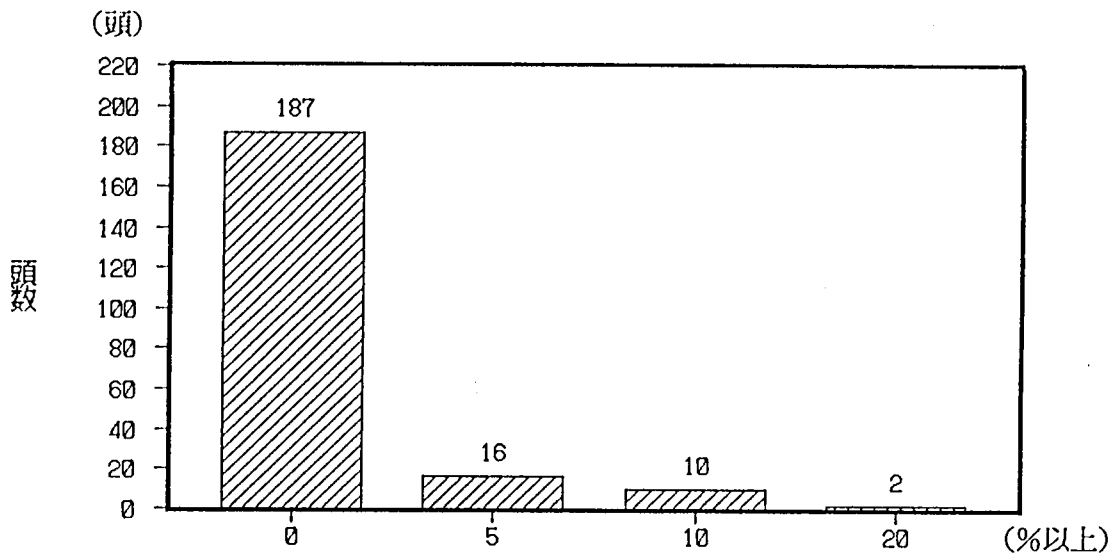


図9 全細胞における好酸球の出現および受胎率

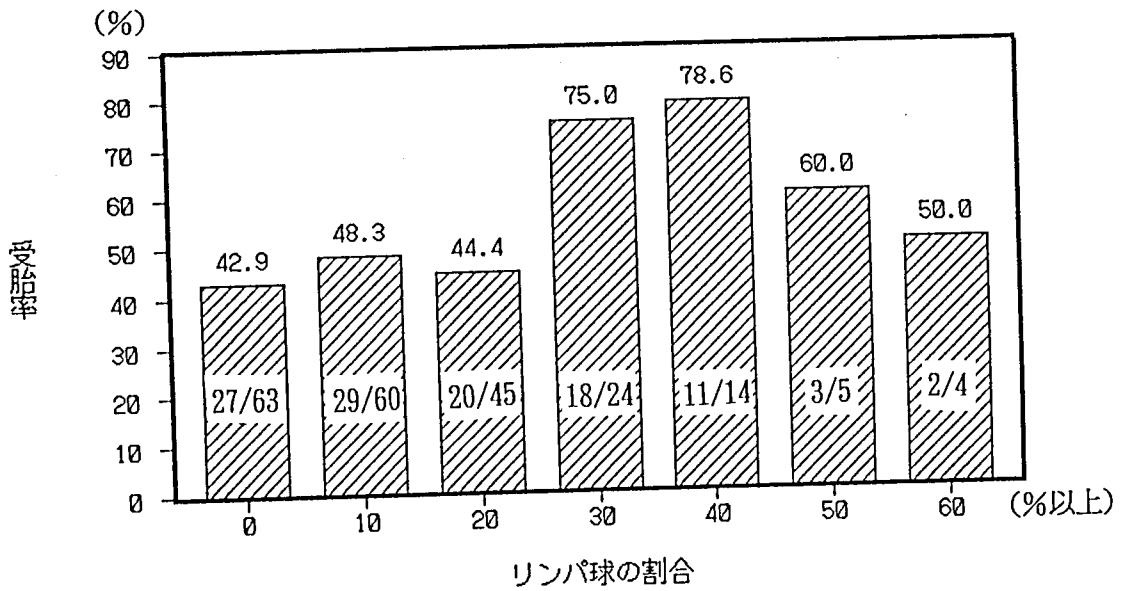
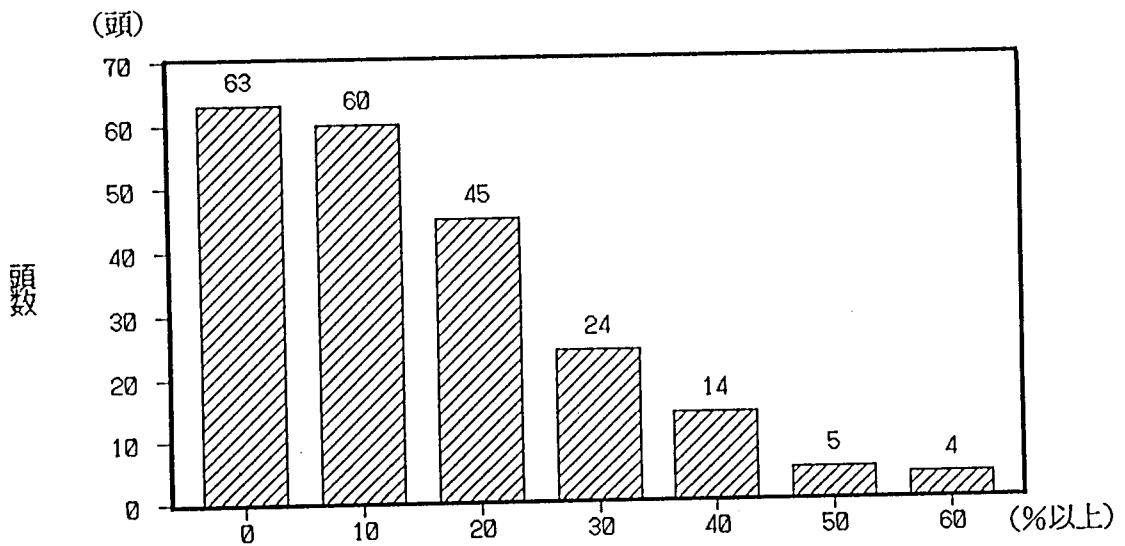


図10 全細胞におけるリンパ球の出現および受胎率

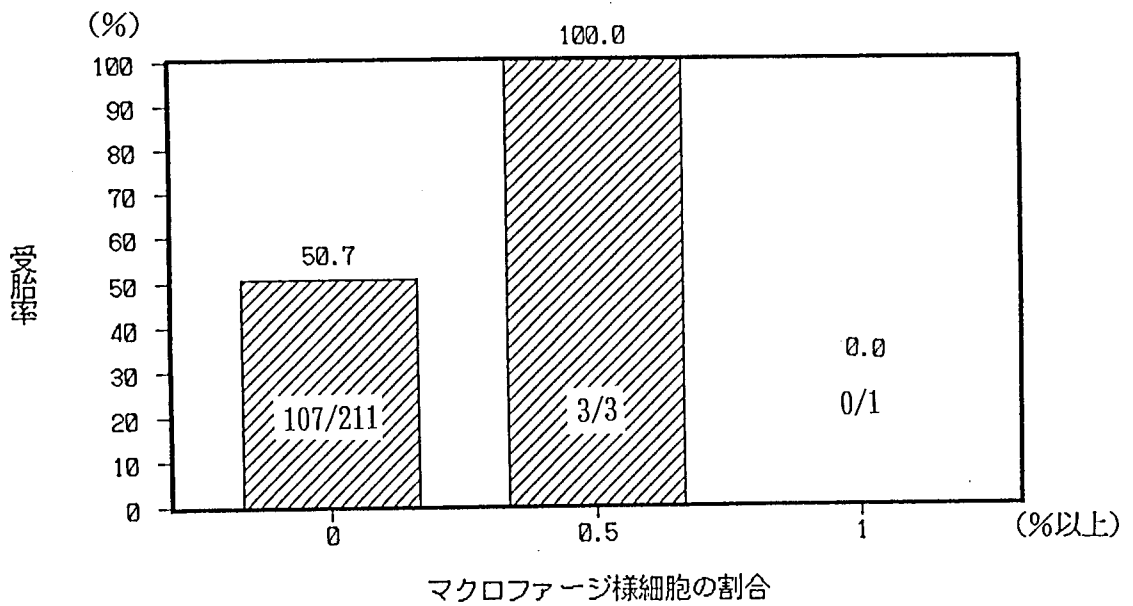
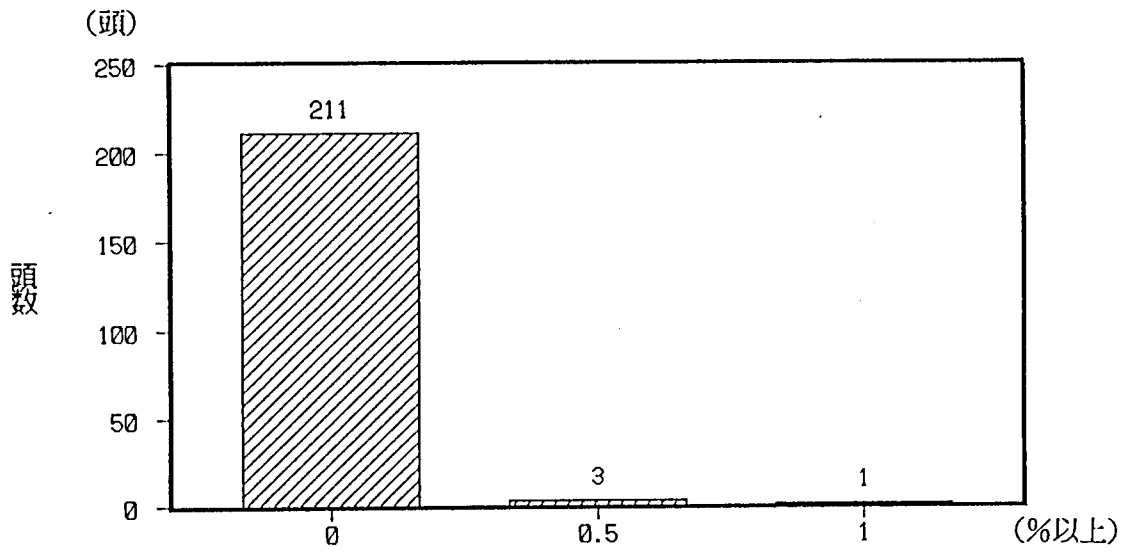


図11 全細胞におけるマクロファージ様細胞の出現および受胎率

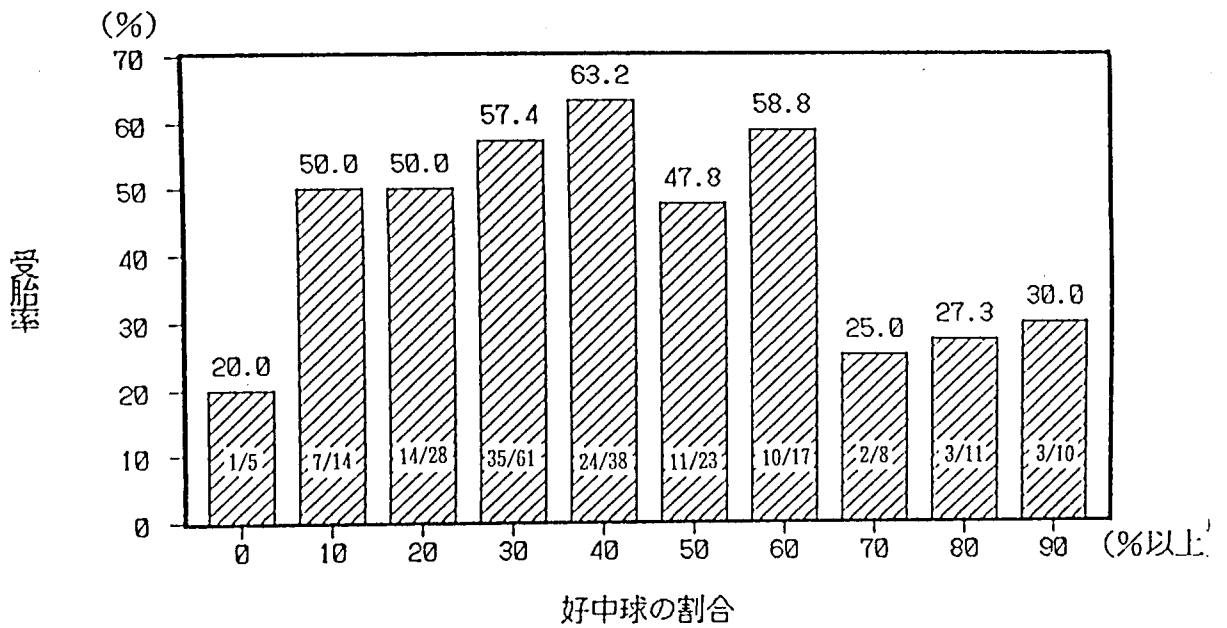
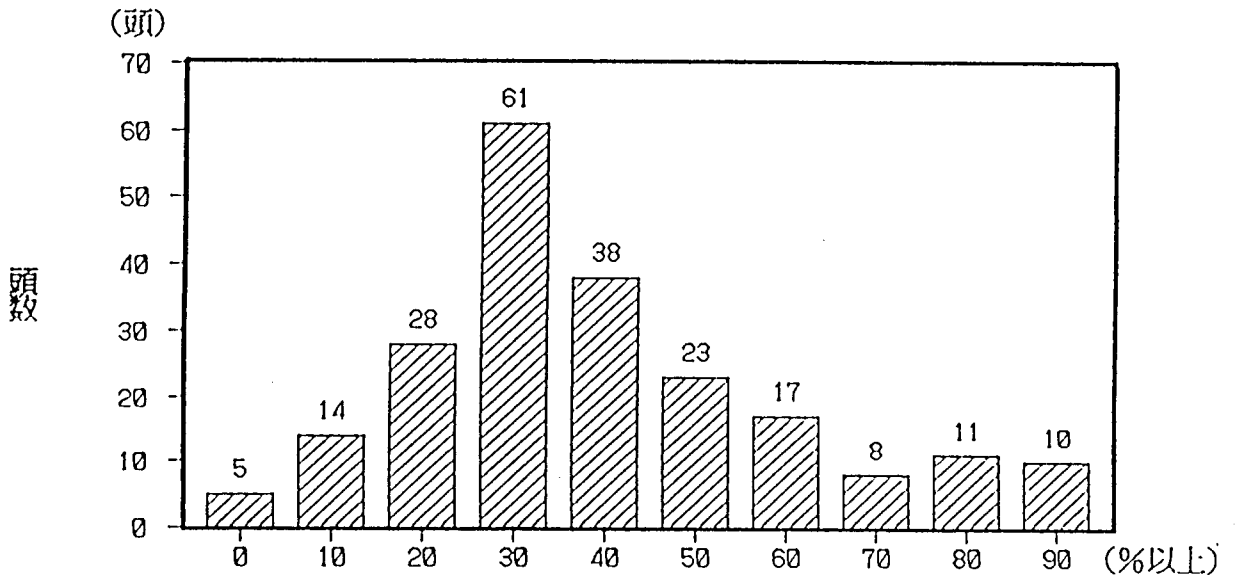


図12 炎症細胞における好中球の出現および受胎率

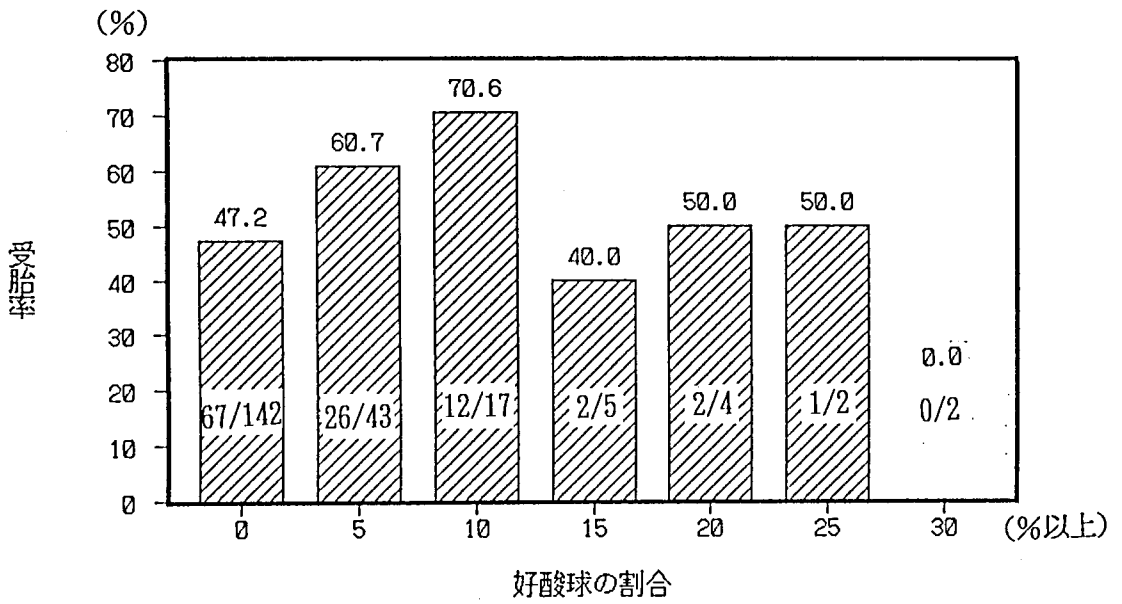
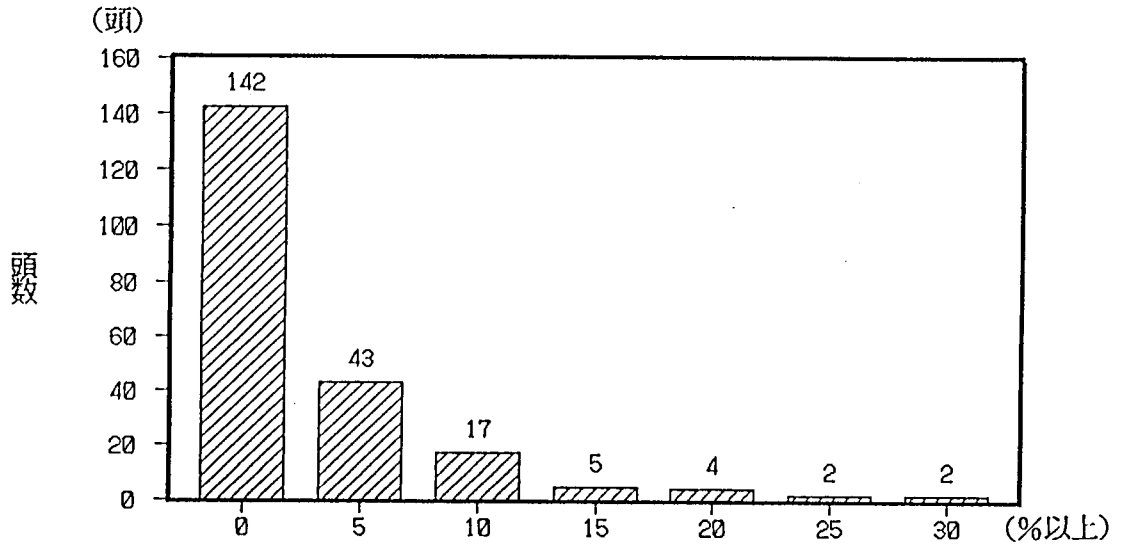


図13 炎症細胞における好酸球の出現および受胎率

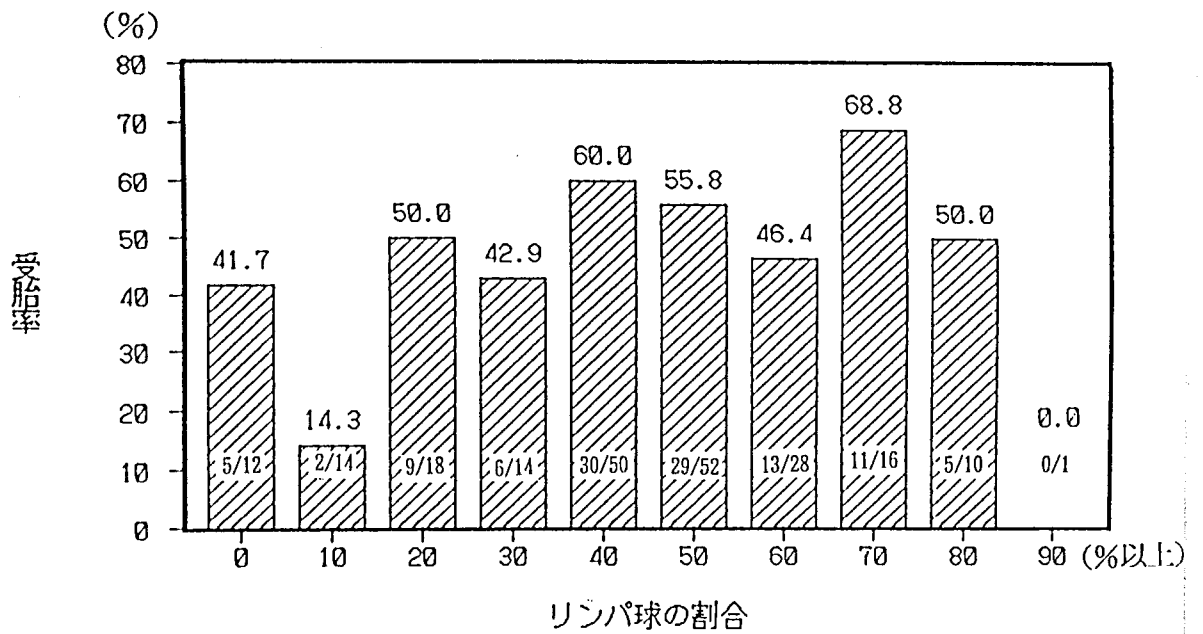
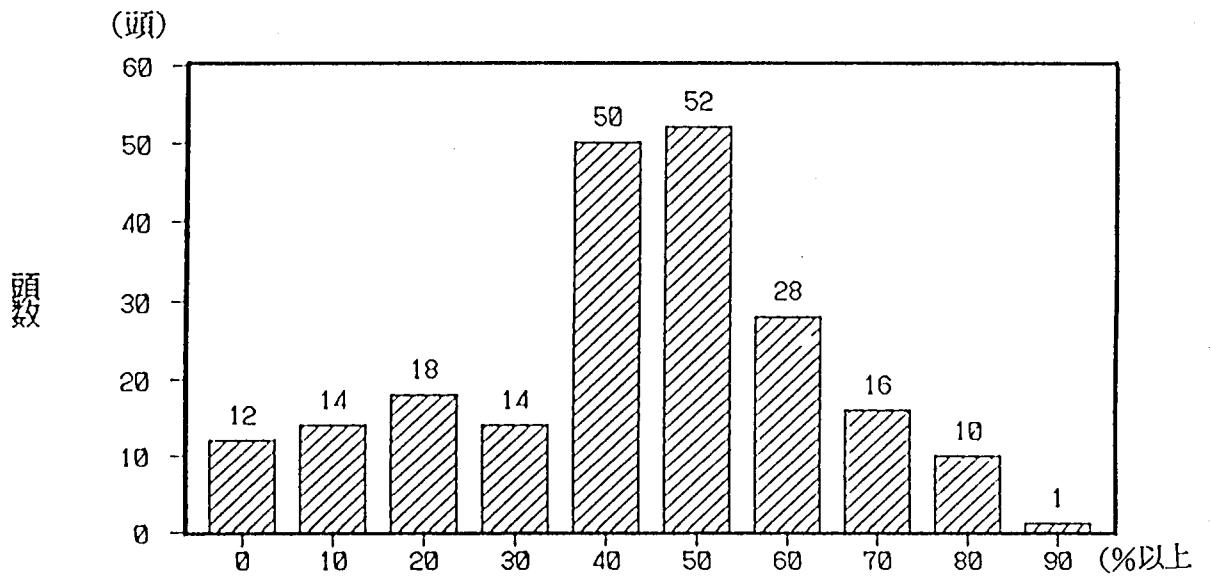


図14 炎症細胞におけるリンパ球の出現および受胎率

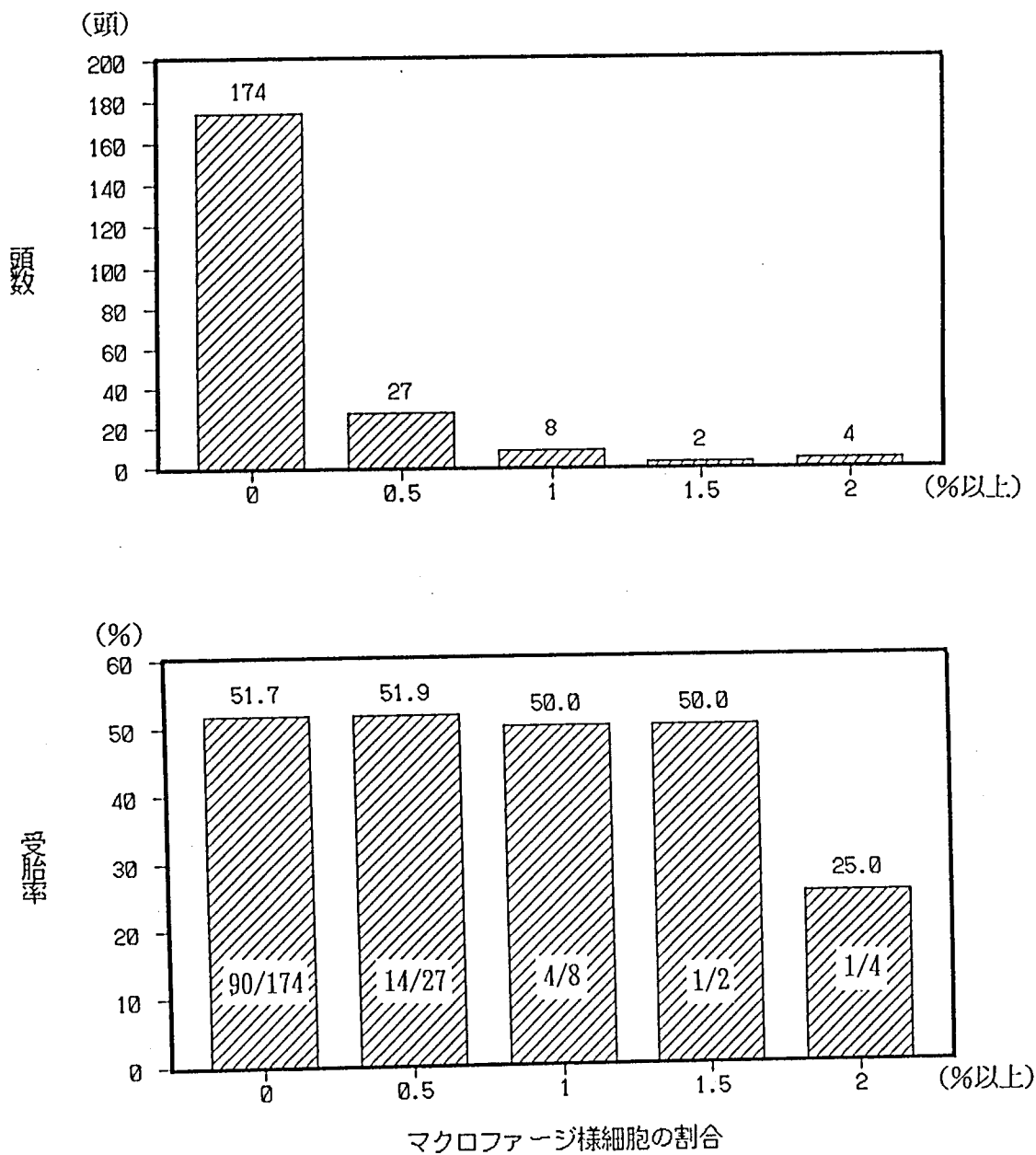


図15 炎症細胞におけるマクロファージ様細胞の出現および受胎率

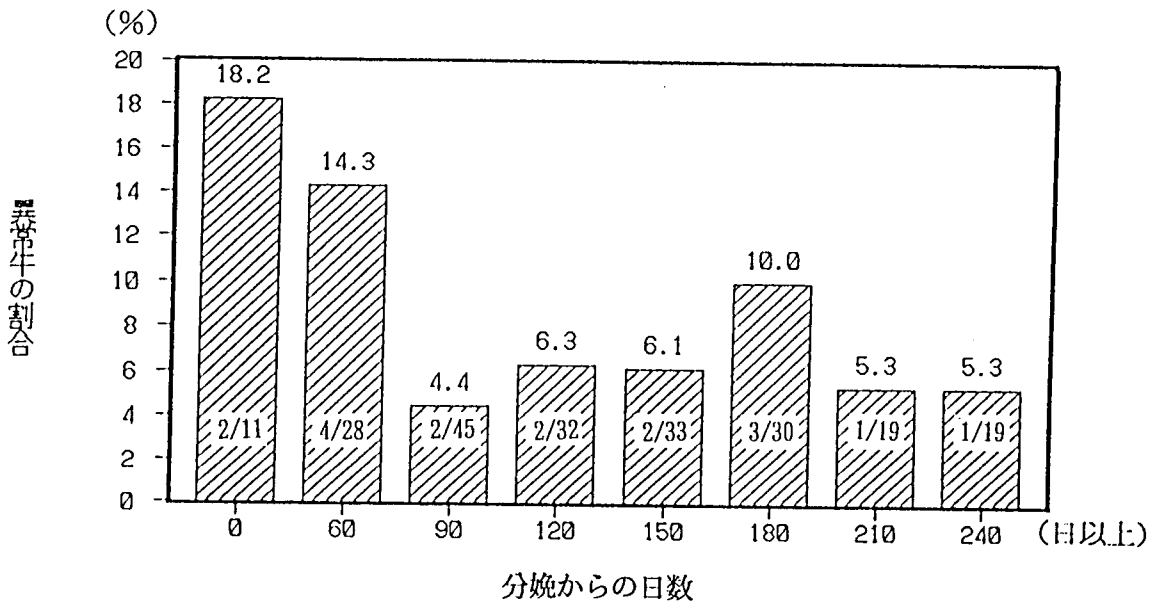


図16 分娩後の経過日数と細菌学的不良環境の評価

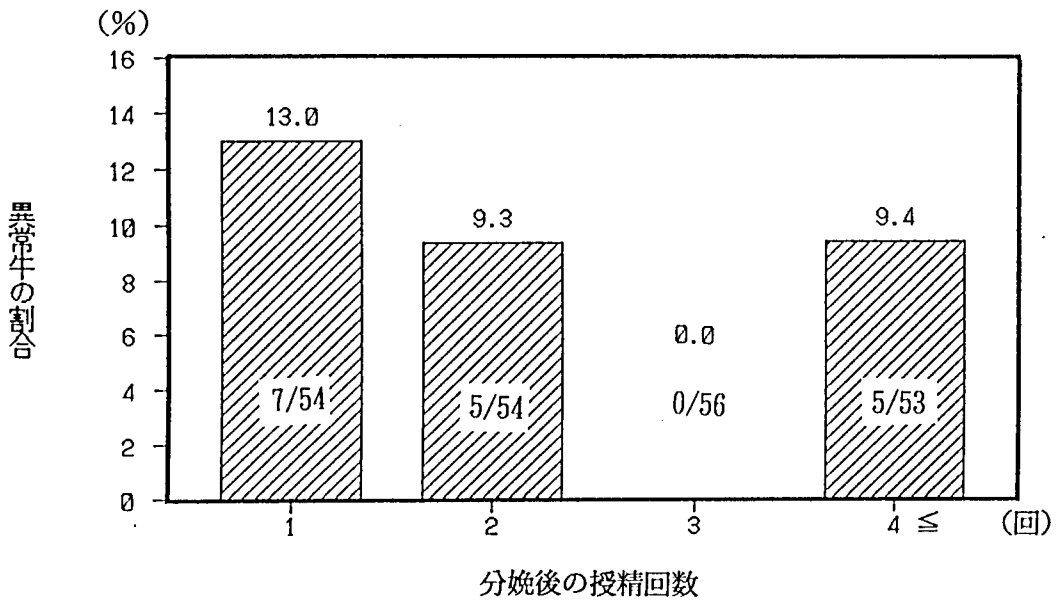


図17 分娩後の授精回数と細菌学的不良環境の評価

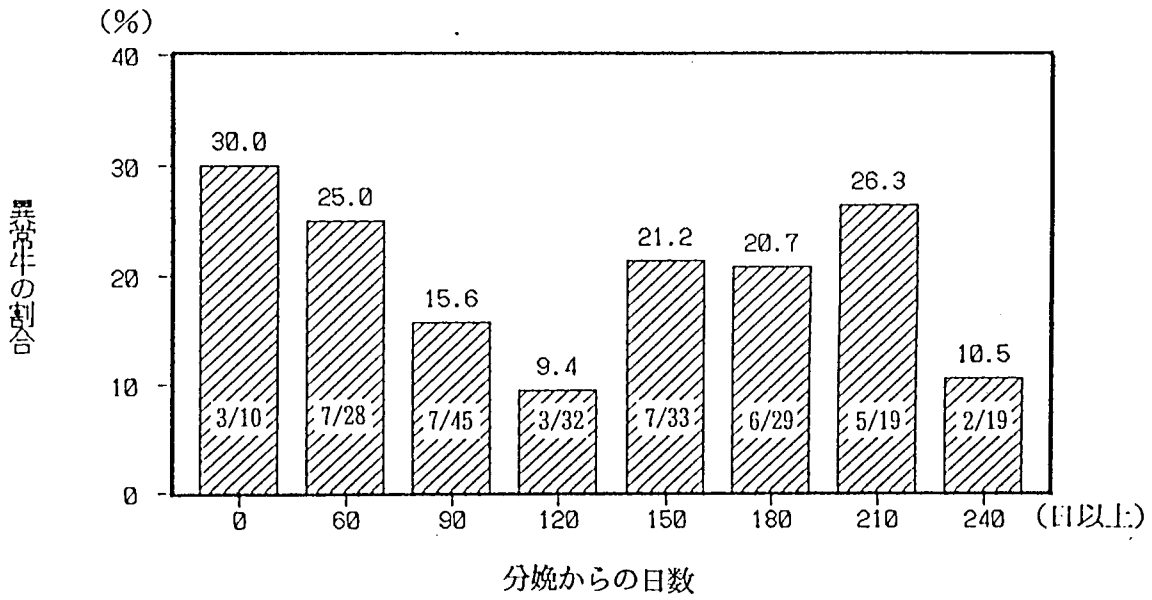


図18 分娩後の経過日数と細胞学的不良環境の評価

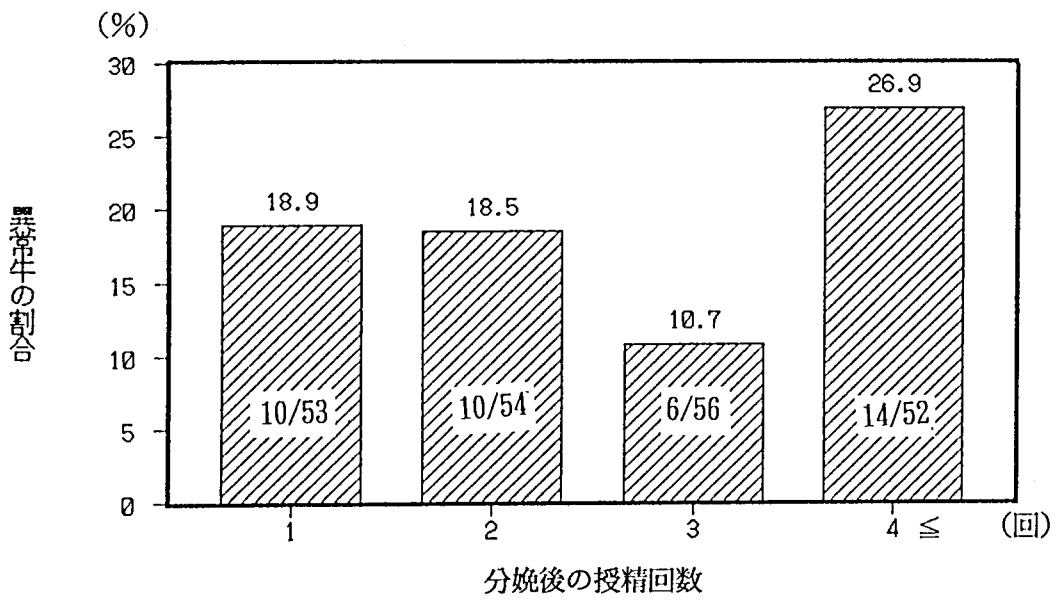


図19 分娩後の授精回数と細胞学的不良環境の評価

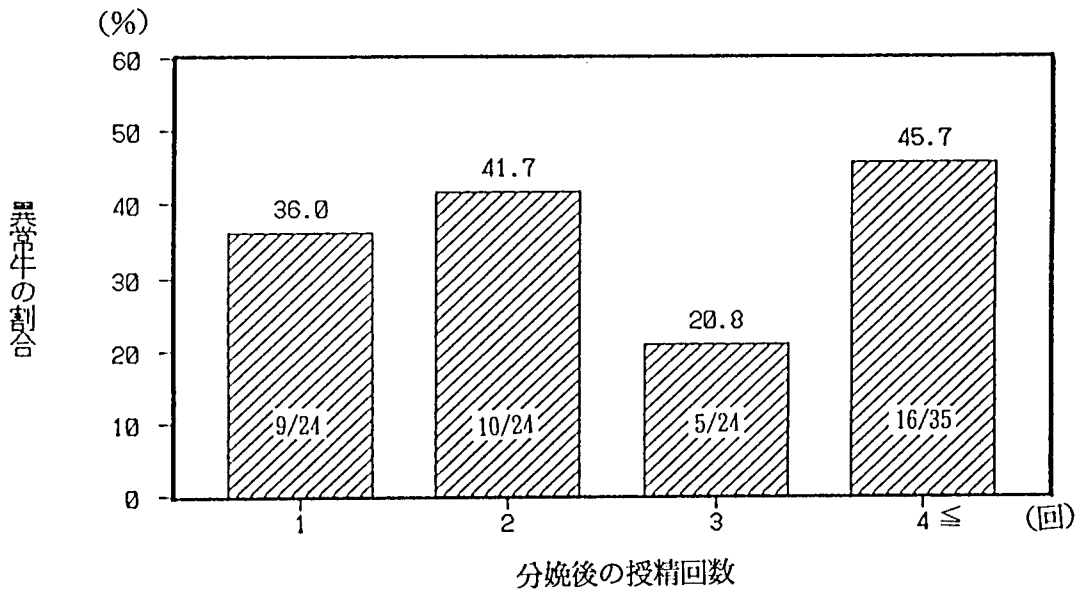


図20 不受胎牛における授精回数別子宮内不良環境の評価

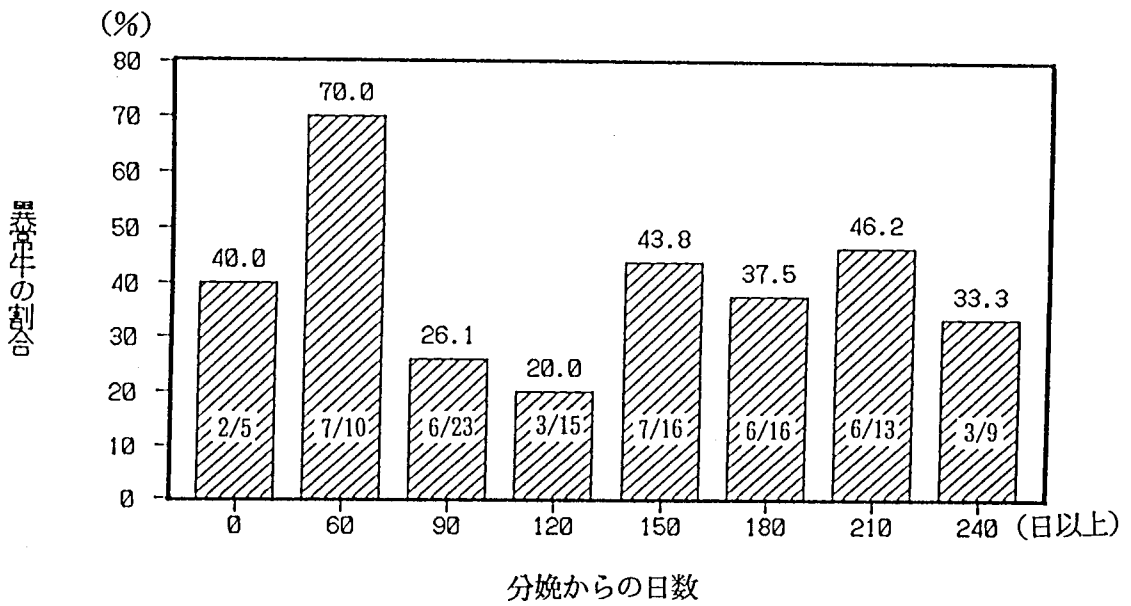


図21 不受胎牛における分娩後の日数別子宮内不良環境の評価

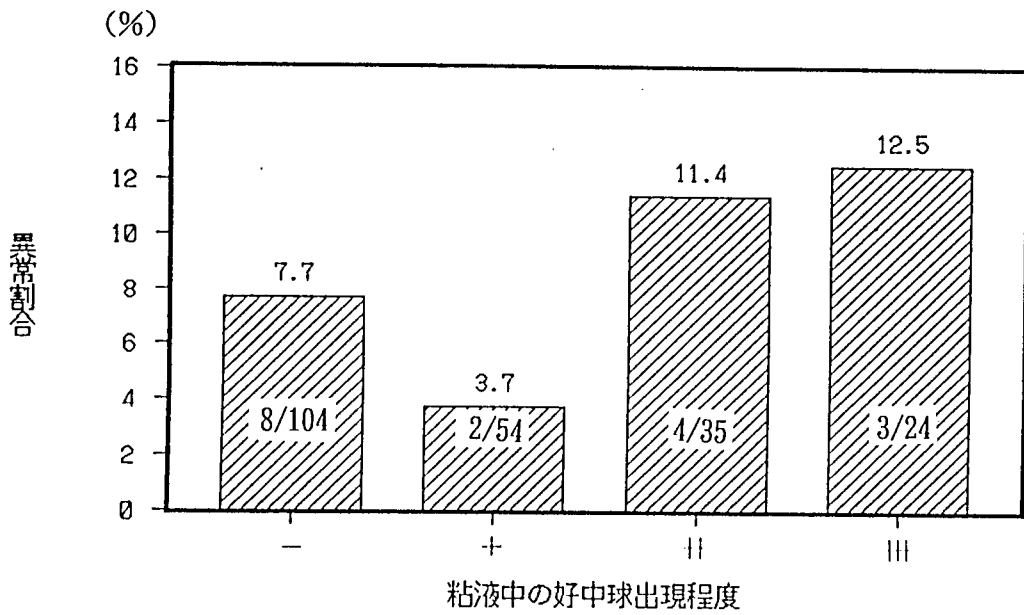


図22 発情粘液中の好中球出現状況と細菌学的不良環境の評価

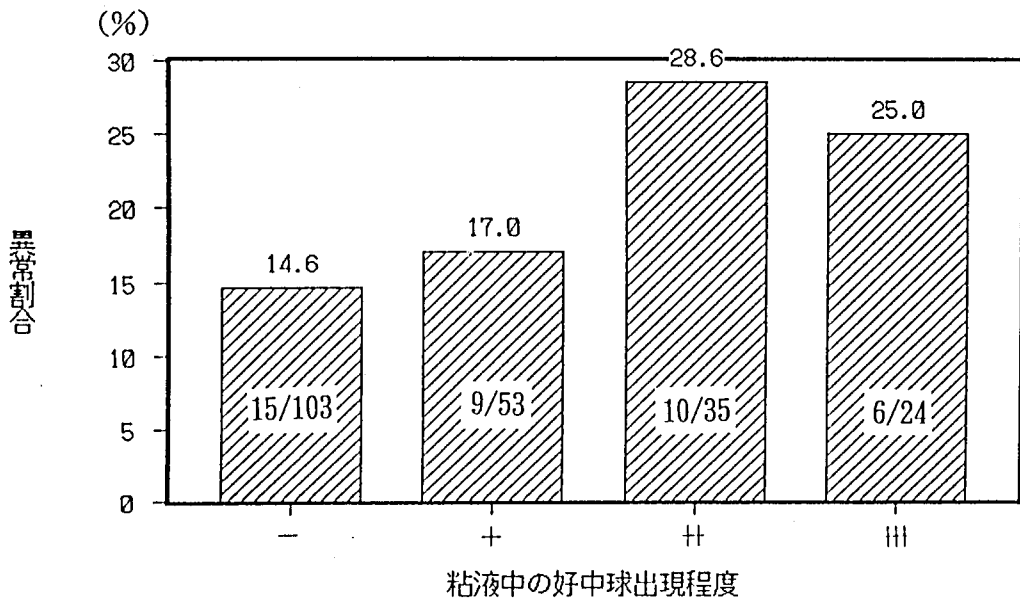


図23 発情粘液中の好中球出現状況と細菌学的不良環境の評価



写真 1

繊毛を持った上皮細胞 (×1000)

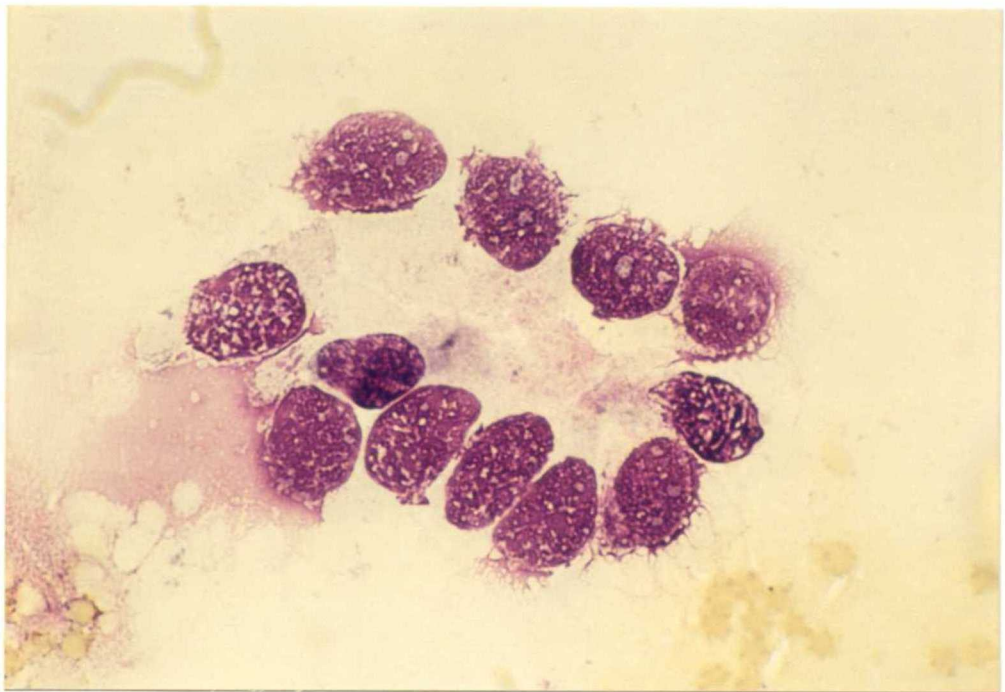


写真 2

シート状をなした上皮細胞 (×1000)

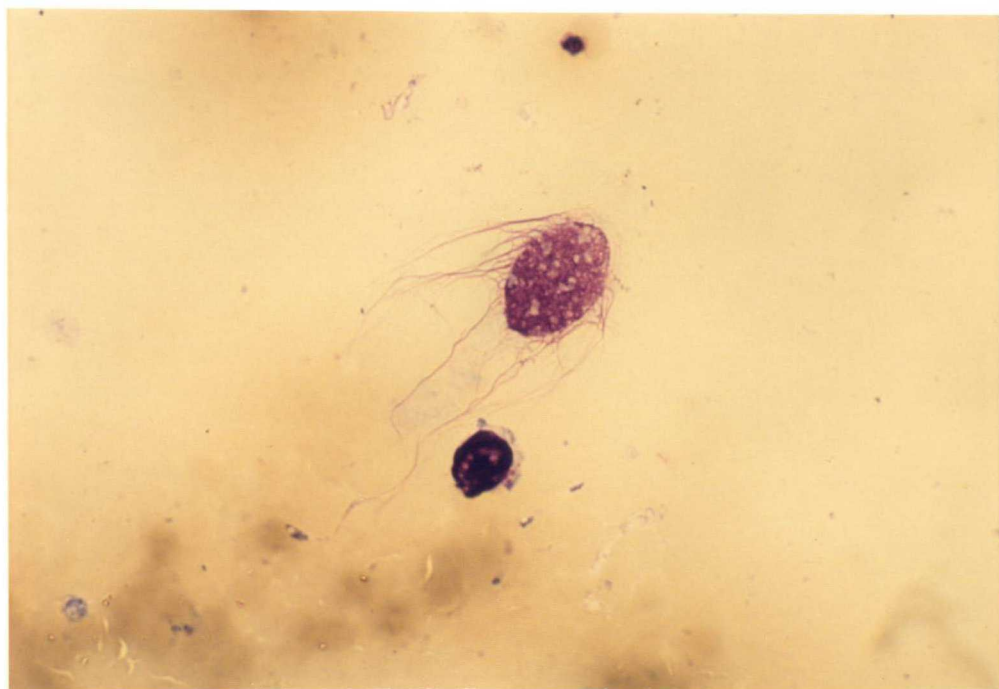


写真 3

上皮細胞とリンパ球 (×1000)

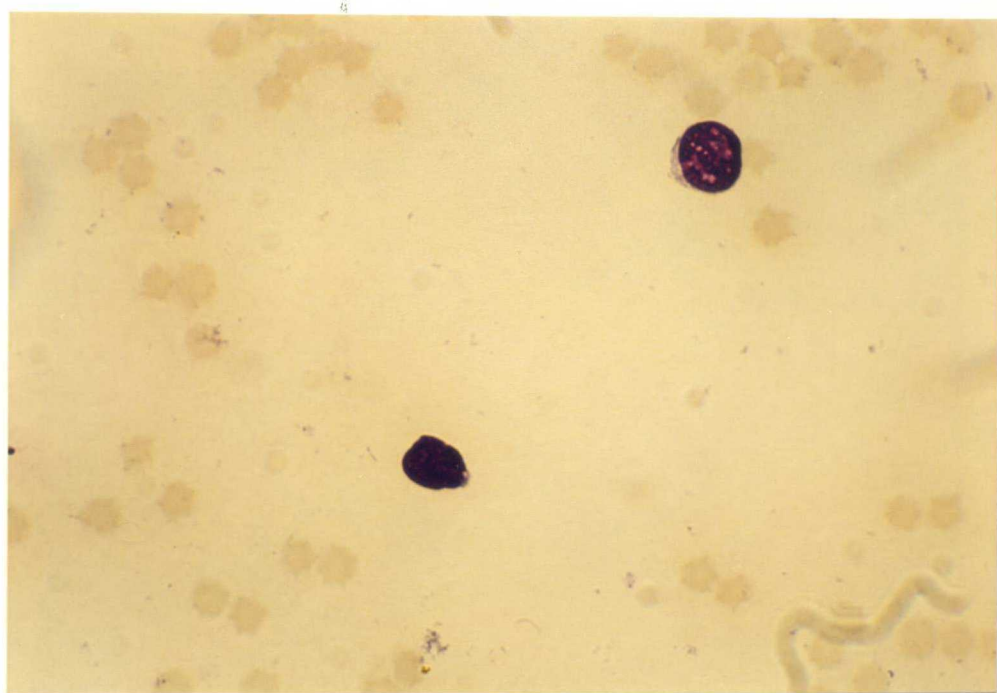


写真 4

リンパ球 (×1000)

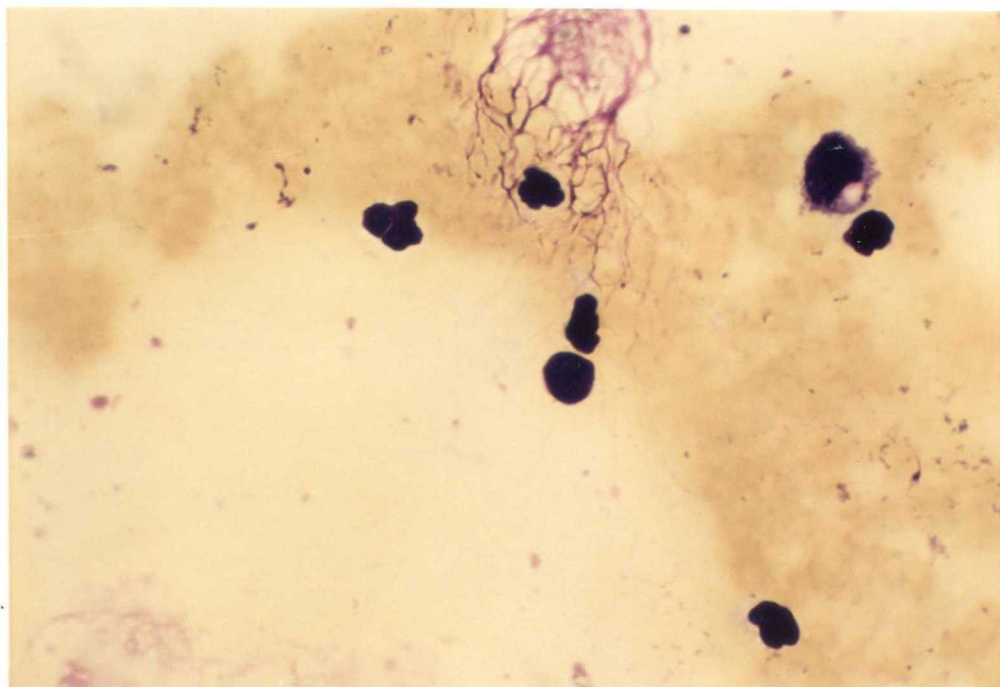


写真 5
リンパ球と好中球 (×1000)

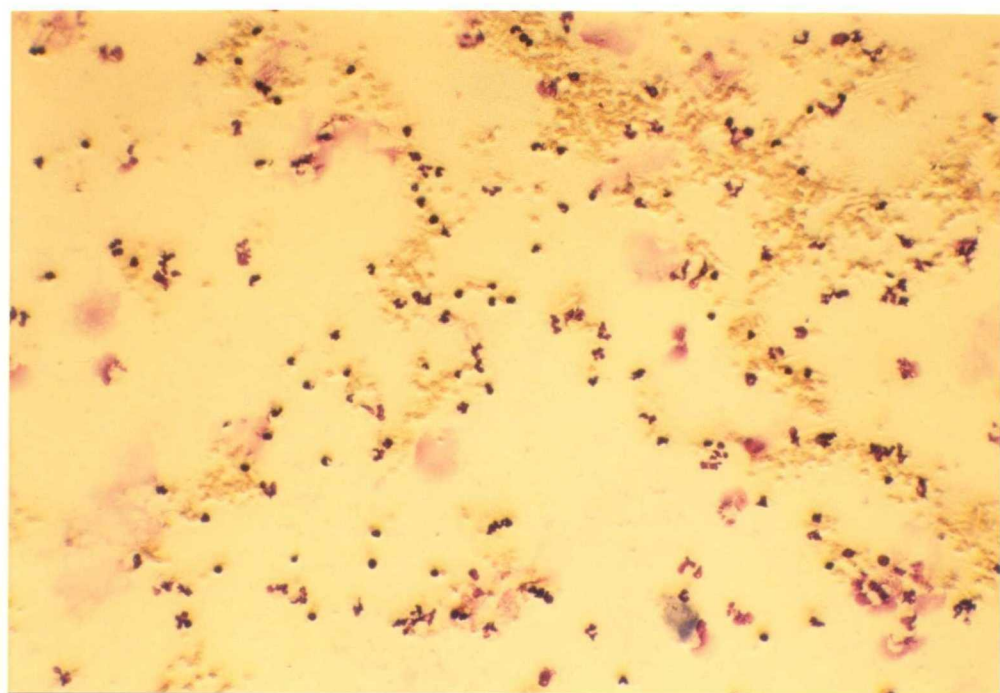


写真 6
好中球が90%以上を占める標本 (×300)

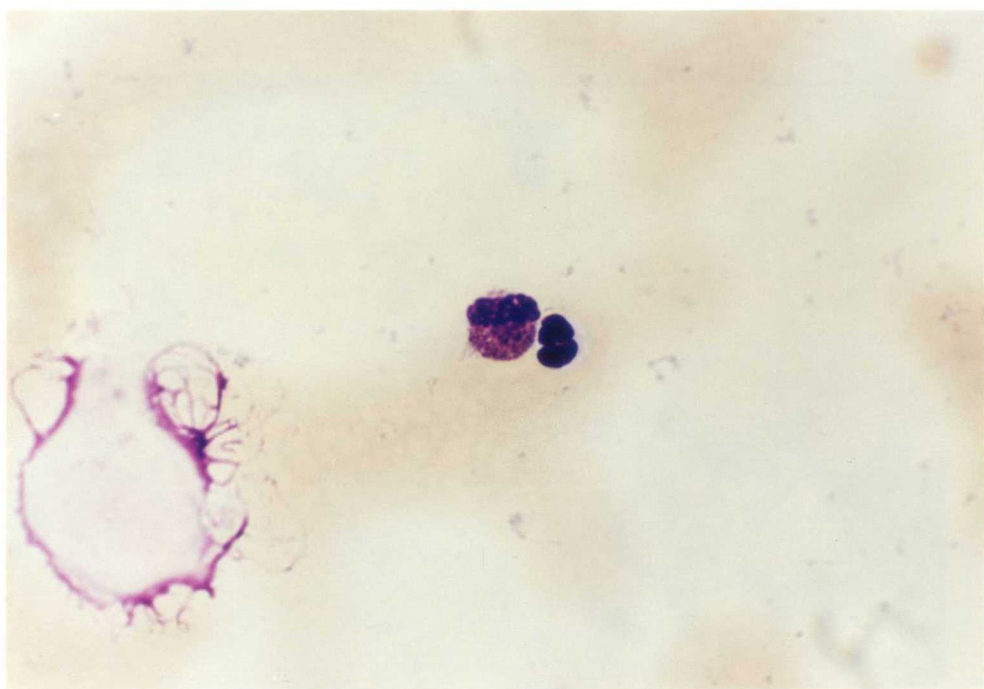


写真 7

好中球と好酸球 (×1000)

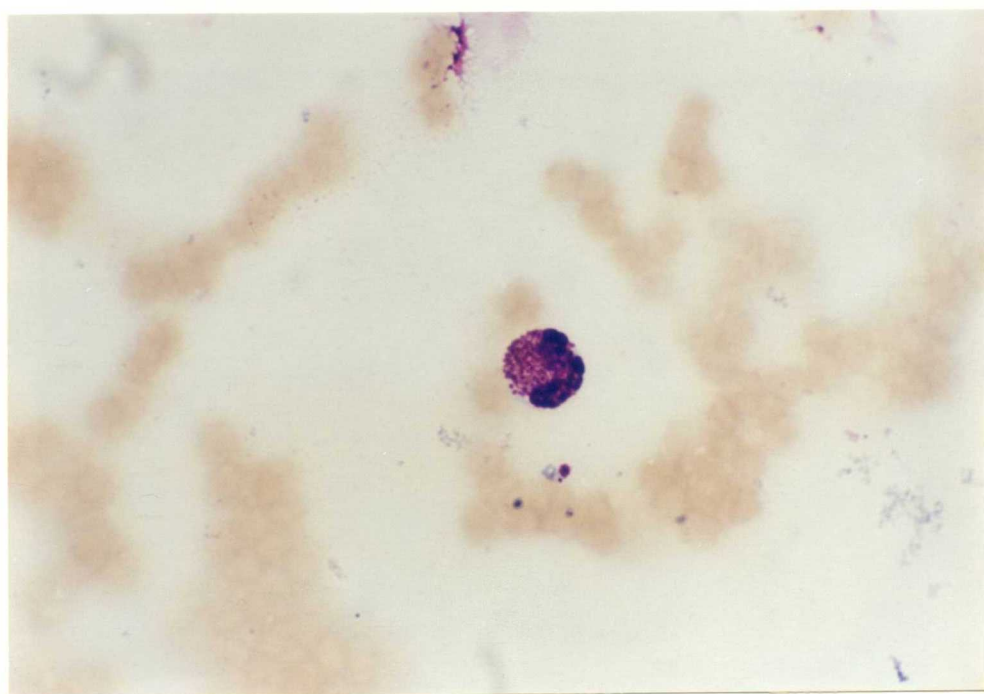


写真 8

好酸球 (×1000)

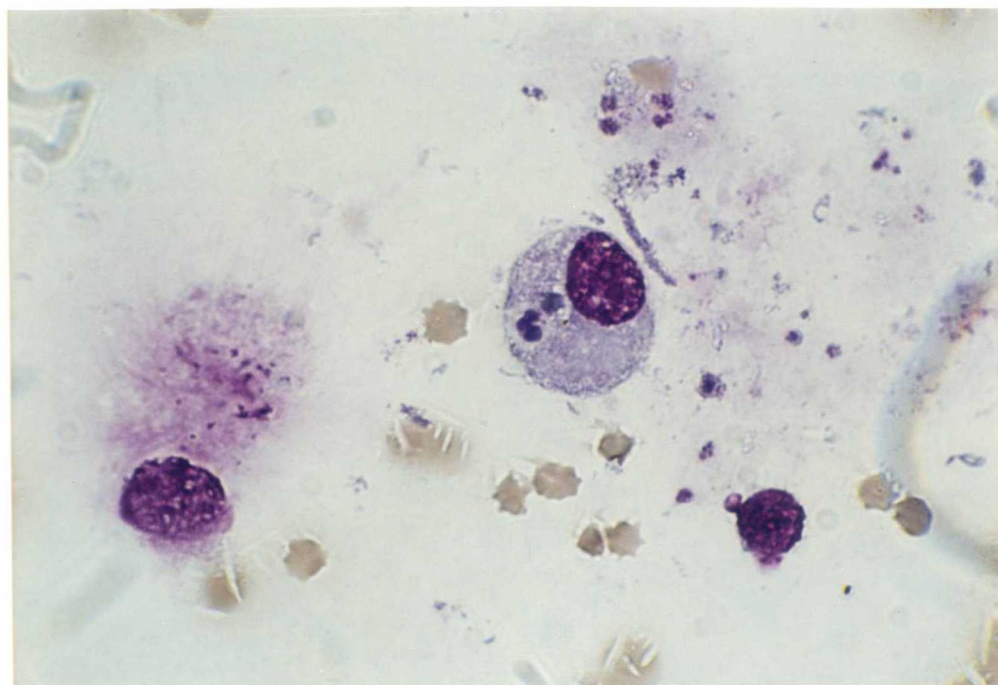


写真 9

マクロファージ様細胞 (×1000)

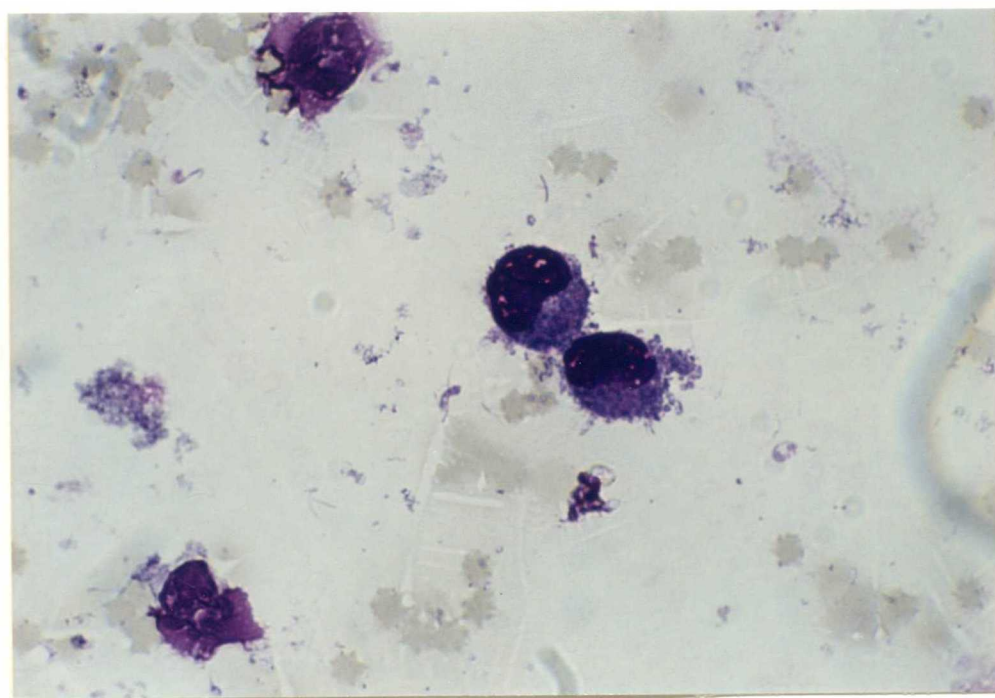


写真 10

マクロファージ様細胞 (×1000)