

氏名(本籍)	金子一幸 (東京都)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙第345号
学位授与の番号	学位規則第3号第2項該当
学位論文の要件	分娩後の牛子宮内の生物学的環境に関する研究
論文審査委員	(主査) 小林好作 (副査) 芦田浄美 松浦健二

論文内容の要旨

1. この研究の目的

乳牛の泌乳機能(生産能力)を適正に維持するには、分娩間隔を12-13カ月に保つことである。しかし、いろいろな原因による繁殖障害のため、かなりの数の牛がこの分娩間隔を達成できないでいる。その原因の一つは子宮疾患である。現在一般に行なわれている子宮疾患の診断法は、

- 1) 直腸検査による子宮の触診
- 2) 子宮分泌物の肉眼的観察
- 3) 発情粘液の顕微鏡的観察
- 4) 子宮内膜のバイオプシー
- 5) 子宮内の試験洗浄液の細菌培養

である。しかし、子宮頸管炎との鑑別ができない(3)で、費用や時間がかかる(4)、細菌が分離されてもされなくても子宮疾患の存在を確定できない(5)などの問題がある。

そこで著者は、分娩後の牛の子宮内の生物学的環境を調べることによつて的確な臨床診断を行なうことをめざした。すなわち、子宮内灌流液の細菌学および細胞学的検査を行なうとともに、発情粘液中の好中球の出現程度を調べ、子宮内不良環境の客観的評価方法の確立を試みた。またその成績をもとに、子宮内の不良環境が分娩後いつごろ作られるか、授精回数との関係はどうなっているかについても調査した。

2. 成績

調査対象は、ふつうの酪農家で飼育されている経産(初産から11産まで)ホルスタイン乳牛で、分娩後に正常性周期を反復し、子宮蓄膿症および卵巣囊腫の治療歴をもたない217頭である。

1) 細菌学的検査の成績

21.7% (47/217) の灌流液から次のような細菌が検出された。

Streptococcus spp	29株
Staphylococcus spp.	4株
Bacillus spp.	4株
Pseudomonas spp.	3株
Escherichia coli.	2株

Corynebacterium spp.	1株
Actinomyces spp.	1株
同未定	8株

菌種にかかわらず、一定数（原液で6 CFU/0.1ml、沈渣で50CFU/0.1ml）以上が分離された牛では受胎が妨げられていた。

2) 細胞学的検査の成績

灌流液中には赤血球、子宮内膜上皮細胞、炎症細胞（好中球、好酸球、リンパ球、マクロファージ様細胞）が出現していた。有核細胞500箇中に占めるそれぞれの平均出現率は、

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	0.9± 0.1%

であった。

3) 主成分分析と判別分析

灌原液とその沈渣の細菌数（CFU/0.1ml）および全細胞種を用いて主成分分析を行い、累積寄与率60%以上となるまでに第Ⅰ（上皮細胞と炎症細胞）、第Ⅱ（細菌）および第Ⅲ（マクロファージ様細胞）主成分が抽出された。

受胎の有無を目的変数として、受胎群と非受胎群の間の共分散行列が等しいといえるのは、細菌、好中球およびリンパ球を説明因子とした場合で、それぞれ

$$Y = 0.17966 - 0.007938 \times \text{沈渣中の細菌数 (CFU/0.1ml)}$$

$$Y = -0.55469 + 0.01157 \times \text{炎症細胞に占めるリンパ球比率}$$

$$Y = 0.48086 - 0.01077 \times \text{炎症細胞に占める好中球の比率}$$

という判別関数式が得られた。

沈渣中の細菌数（CFU/0.1ml）、リンパ球および好中球比率に関する判別得点受胎率から、カイニ乗検定で受胎率が有意（危険率1%）に低下する得点を求め、判別関数式に代入して、

沈渣中に66 CFU/0.1 ml 以上の細菌

沈渣中炎症細胞に占めるリンパ球の比率24%以下

沈渣中炎症細胞に占める好中球の比率65%以上

を子宮の細菌学的または細胞学的な不良環境とした。

4) 子宮内の生物学的不良環境の評価

上の基準にもとづき217頭について評価し、子宮内不良環境は分娩後比較的早期（60日まで）に作られること、また授精を反復（4回以上）することによって分娩後150日以降に再び悪化することが判明した。217頭中107頭（49.3%）が不受胎で、そのうち40頭（37.4%）の子宮が細菌学的または細胞学的な不良環境にあると診断された。この場合も、分娩直後から120日まで不良環境は次第に改善されていくが、150日を過ぎると再び悪化する。

5) 発情粘液中の好中球と子宮内環境

発情粘液中の好中球出現程度が増すにつれて、細菌学および細胞学的不良環境の発生が増加する傾向にあった。しかし好中球の出現程度によって不良環境の発生率が有意に変動することはなかった。

以上の成績は、分娩後の子宮内環境を的確に判定し、これまでの子宮疾患の診断法を改善するという点で有益な基準を提供するものである。

論文審査の結果の要旨

わが国乳牛の一頭当たり乳牛生産能力は非常に高くなっている。しかし全体としてみると病気の発生が多く、なかでも繁殖障害は最大の生産阻害要因となっている。その原因にはいろいろあるが、一つは子宮疾患である。現在一般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30日くらいまでで、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ないかぎり不可能である。その他の診断法としては、子宮内の診断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では子宮疾患と子宮頸管炎を鑑別できず、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からといって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。

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タイムリミットも近く、たとえ診断が下されても適切な治療を行う余裕がない。近年は多頭飼養が進み、牛群全体としての効率的な繁殖管理の必要に迫られている。そのため、分娩後のどの時間に、どのような牛に対してどのような検査を行え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課題となっている。

この現状を打開しようとして、著者は分娩後の牛の子宮内の生物学的環境を調べ、的確な臨床診断を行うことをめざし、子宮内滲流液の細菌学および細胞学的検査、発情粘液の好中球出現率および子宮内の生物学的不良環境の経時的発生状況の調査を行った。

1. 子宮内滲流液の採取

調査対象は、ふつうの酪農家で飼育されており、分娩後に正常性周期を回復し、子宮蓄膿症および卵巣嚢腫の治療歴のない経産ホルスタイン種乳牛217頭である。採材は授精した翌日に直腸検査により排卵を確認後、バルーン・カテーテルを用いて100 mlの滅菌生理食塩液を子宮内に注入し、子宮を軽くマッサージしたあと、注入液を回収している。

2. 細菌学的検査

回収した灌流液の原液と、遠心沈渣について行なっている。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。また、回収液10mlを3,000回転10分間遠心して得た沈渣に生理食塩液を加えて1mlとし、その0.1mlを同様培地に塗布した。どちらも37°C48時間好気培養し、発育したコロニー数（以下CFU）をかぞえた。原液の場合は同一コロニーが2個以上、沈渣の場合は10個以上発育したものについて菌種の同定を行なっている。

原液から同一コロニーが2個以上発育した頭数は46頭で、5頭からは2種類の細菌が分離されている。沈渣で同一コロニーが10個以上発育した頭数は46頭で、1頭からは2種類の細菌が分離されている。それら菌種は *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.* および *Escherichia coli* などであった。

3. 細胞学的検査

回収液10mlを遠心し、沈渣をスライドグラスに塗布、風乾、メタノール固定後、ギムザ染色した標本の細胞を観察している。出現した細胞は赤血球、子宮内膜上皮細胞、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。上皮細胞、好中球およびリンパ球が有核細胞の96.4%を占めていた。

4. 主成分分析と判別分析

灌流原液とその沈渣の細菌数（CFU/0.1ml）および全細胞種を用いて主成分分析を行ない、累積寄与率60%以上となるまでに第I（上皮細胞と炎症細胞）、第II（細菌）および第III（マクロファージ様細胞）主成分が抽出された。

受胎の有無を目的変数として、受胎群と非受胎群の間の共分散行列が等しいといえるのは、細菌、好中球およびリンパ球を説明因子とした場合でそれぞれ

$$Y = 0.17966 - 0.007938 \times \text{沈渣の細菌数 (CFU/0.1ml)}$$

$$Y = -0.55469 + 0.01157 \times \text{炎症細胞に占めるリンパ球比率}$$

$$Y = 0.48086 - 0.01077 \times \text{炎症細胞に占める好中球の比率}$$

という判別関数式が得られた。

沈渣の細菌数（CFU/0.1ml）、リンパ球および好中球比率に関する判別得点受胎率から、カイ二乗検定で受胎率が有意（危険率1%）に低下する得点を求め、判別関数式に代入して、（1）沈渣中に66 CFU/0.1ml以上の細菌；（2）沈渣中炎症細胞に占めるリンパ球の比率24%以下；（3）沈渣中炎症細胞に占める好中球の比率65%以上を子宮の細菌学的または細胞学的な不良環境とした。

5. 子宮内の生物学的不良環境の評価

上の基準にもとづき217頭について評価し、子宮内不良環境は分娩後比較的早期（60日まで）に作られること、また授精を反復（4回以上）することによって分娩後150日以降に再び悪化することが判明した。217頭中107頭（49.3%）が不受胎で、そのうち40頭（37.4%）の子宮が細菌学的または細胞学的な不良環境にあると診断された。この場合も、分娩直後から120日まで不良環境は次第に改善されていくが、150日を過ぎると再び悪化していた。

6. 発情粘液中の好中球と子宮内環境

発情粘液中の好中球出現程度が増すにつれて、細菌学および細胞学的不良環境の発生が増加する傾向にあった。しかし好中球の出現程度によって不良環境の発生率が有意に変動することはなかった。

以上の成績は、分娩後の子宮内環境を的確に判定し、これまでの子宮疾患の診断法を改善するという点で、臨床上きわめて有益な基準を提供するものである。したがってこの業績は博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしいと判定した。