犬の繁殖生理に関する研究

Ⅲ. 性周期における vaginal smear 所見

筒 井 敏 彦

(日本獣医畜産大学 家畜臨床繁殖学教室)

緒 言

雌動物の性周期は、通常、発情前期、発情期、発情後期、発情休止期の4期に分けられマウス、ラット、モルモットにおいては、vaginal smear (以下 V. S. と略す)の検査によって各期が判然と区分できる。牛、馬については、直腸検査による卵巣の触診および腔検査による腔粘膜、粘液などの状態によって、ある程度性周期を判定することができる。しかし、中、小動物では、その各期の判別は極めて困難である。

犬においては、EVANS & COLE (1927¹⁾, 1931²⁾, GRIFFITH & AMOROSO³⁾ (1939) によって、V. S. が研究されて以来、性周期の区分⁴⁻¹⁸⁾、排卵時期¹⁹⁻²¹⁾および交配適期²²⁾などの判定に V. S. を応用した報告が見られるようになった。

著者は第Ⅰ報²³⁾において、発情出血や雄犬に対する許容状況から、発情前期、発情期の持続日数について、また第Ⅱ報²⁴⁾において、犬の排卵は雄犬に交配を許容してから48時間前後に始まり、60時間の間にほぼ終了していたことを報告した。

今回は、既報の成績を基にして判定した犬の発情期を中心として、V. S. 中に出現する各種細胞の変化を観察するとともに、外陰部の状態および発情時に陰門から漏出する血液を混じた粘液 (以下、発情出血と呼ぶ) の性状などについても観察したので、その成績を報告する。

実験材料及び方法

1. 実験材料

実験に用いた動物は東京都犬管理所から譲渡を受けた雑種で、年令2~4才、体重10kg前後のもの32頭

Studies on the reproduction in the dog. III. Observations of vaginal smear in estrous cycle.

TSUTSUI, Toshihiko (Laboratory of Veterinary Obstetrics, Nippon Veterinary and Zootechnical College, Musashino-shi, Tokyo 180)

Jap. J. Animal Reprod. 21 (1), 1975.

である。

これらの雌犬は、発情出血の始まる (発情前期の開始) 9~3カ月前から、毎日、V. S. 外陰部の変化などを観察し、さらに発情終了後1日から60日の間の種々の時期に剖検して、生殖器官に異常、疾患などの認められないことを確かめた。

実験犬の内訳は、発情中に交配させなかったもの6頭、交配させ妊娠したもの15頭、交配させたが不妊に終わったもの6頭、精管切除雄犬と不妊交配させたもの5頭である。

雌犬の発情状況や雄許容を判定するために用いた雄犬は、交配経験があり性欲旺盛な4頭である。うち2頭は不妊手術 (精管結紮切断) を施した。

実験犬の飼育管理は第Ⅰ報²³⁾に準じた。

2. 実験方法

次の事項について、毎日8~9時の間に観察を行なった。

- 1) 一般状態: 元気、挙動、被毛光沢、食欲 (16時)。
- 2) 外陰部の状態: 腫脹、波動、粘液および血液を混じた粘液の漏出。
- 3) 腔前庭粘膜の状態: 光沢、色調、充血。
- 4) 雄犬に対する交配許容の有無 (許容試験): 雌犬に発情出血が観察された日から、毎日7時と19時の2回雄犬に接触させ、交配を許容するか否かを観察した。この検査は雄犬を許容しなくなる日まで続けた。

5) V. S. の検査: a) V. S. の採取方法: V. S. の採取はステンレス製の葉匙を陰門から腔内に約5cm挿入して、腔底から採取した。採取した V. S. は、その性状を肉眼的に観察した後、1滴をスライドガラスに塗抹した。塗抹標本は風乾後90%メタノールで3分間固定したうえ、蒸留水1ml当りギムザ液2滴を加えた液で20~30分間染色した。

b) V. S. の観察: V. S. の観察は発情出血の始まる3カ月前から発情終了後10日までの間、毎日行なった。

各個体における V. S. 中の各種細胞の出現とその消長は、発情出血の始まった日 (a), 雄犬許容の始まった日 (b), 雄犬許容の終わった日 (c) の 3 点を基準として表わした。

V. S. の検査は標本全体を鏡検 (倍率 100) して、有核腔上皮細胞, 角化細胞, 中性多核白血球, 赤血球をそれぞれの出現数によって, - (なし), ± (少数), + (中等度), ++ (多数) の 4 段階に区分して記録した。

有核腔上皮細胞は, SCHUTTE¹³⁾ が報告しているように, 基底層, 中間層, 表層細胞に分類し, また, これら細胞の染色性についても観察した。

結 果

実験犬 32 頭における発情の持続日数, 発情出血の状況, 外陰部の変化および V. S. 所見は, つぎのとおりであった。

1. 発情の持続日数

発情前期の持続日数は 3~17 日, 平均 8.4 日, 発情期の持続日数は 5~20 日, 平均 11.1 日, 発情前期と発情期の合計の持続日数は 15~27 日, 平均 19.6 日であった。

2. 発情出血

1) 発情出血持続日数は 10~30 日, 平均 20.8 日であった。

2) 発情出血の所見: 漏出液は, 発情出血開始時には暗赤色または赤褐色で, やや粘稠である。しかし, 2~3 日を経過すると赤色水様になり, 量も少なくなった。発情前期の後半から発情期の前半では増量し, 色調はピンクまたは淡赤色となる。その後, 発情期中頃には著しく減少し, その後半から発情終了後 2~3 日で漏出液は見られなくなった。しかし, 実験犬 32 頭中 12 頭は発情終了後も 4~10 日間, 発情期に比べてやや多量に見られた。発情終了後に漏出液される粘液は発情出血開始時のそれとよく似て, 暗赤色または赤褐色となり, 性状もやや粘稠であった。

3. 外陰部の所見

発情に先立って外陰部の腫大の開始する時期を実験犬 32 頭について調べた結果, つぎのような成績が得られた。すなわち, 腫大開始がもっとも早かったものは発情出血開始 61~70 日前で 5 頭にみられ, ついで 41~50 日前で 6 頭, 31~40 日前で 2 頭, 21~30 日前で 8 頭, 11~20 日前で 4 頭, 1~10 日前で 3 頭, 発情出血初日に 4 頭であった。この外陰部の腫大は, とくに発情前期の 3~4 日頃から著明となり, その後半に最高に達し,

柔軟となり, この状態を発情期中頃まで持続し, その後, 徐々に縮小した。

4. V. S. の所見

発情出血開始 3 カ月前から発情終了後 10 日までを前述の 3 基点を基準として, V. S. 中に出現する種々の細胞の消長を整理した結果は, 次のようであった。

1) 有核腔上皮細胞: 発情出血の始まる前 3 カ月間は V. S. 中に出現する有核腔上皮細胞は常に少数で, その大部分は腔粘膜の中間層, 表層のものである。発情出血の開始 1 カ月前までは基底層の細胞も少数混入していることが認められた。

発情出血の始まる約 1 カ月前頃から 22 頭には有核腔上皮細胞が中等度に増加したが, 他の 10 頭には変化がみられなかった。有核腔上皮細胞は発情前期に入ると全般的に減少し始め, 発情前期の前半から消失したものが 7 頭, 発情前期の後半から消失したものが 18 頭, また発情期に入った直後から消失したものが 4 頭あった。

なお, 残りの 3 頭は発情前期, 発情期にも常に少数存在していた。29 頭において, 発情前期から発情期にかけて消失した有核腔上皮細胞が, 6 頭で発情期の前半から, 17 頭で発情期の後半から, また別の 6 頭では発情終了直後からそれぞれ再び出現し始めた。

2) 角化細胞: 角化細胞は発情出血の始まる前 3 カ月間は, V. S. 中に常に少数存在していたが, 発情出血の始まる約 1.5 カ月前に 32 頭中 18 頭において一過性に増加 (中等度~多数) した。角化細胞は, 32 頭中 15 頭において発情前期前半から, 7 頭では発情前期後半から, また 5 頭では発情期前半からそれぞれ増加を始めた。しかし, 残りの 5 頭では, 発情前期, 発情期中も角化細胞は増加を示さず, 常に少数出現していた。

27 頭において発情前期から発情期に増加した角化細胞は, 1 頭では発情期の前半から, 9 頭では発情期の後半から, また 12 頭では発情終了直後からそれぞれ減少し始めた。なお, 残りの 5 頭では発情終了後も引続き角化細胞が中等度に出現していた。

発情前期に出現する角化細胞の大きさは, 径約 44 μ であったが, 発情期において僅かに大きくなり, その他の時期におけるよりもギムザ液に濃染した。

3) 中性多核白血球: 中性多核白血球は発情出血開始前 3 カ月間の V. S. 中には常時出現し, その出現数は検査の時期によって変動がはげしかった。すなわち, 発情出血の始まる前から減少し始め, 32 頭中 8 頭では発情出血開始直前から, 9 頭では発情前期の前半から, 9 頭では発情前期の後半から, また 4 頭では発情期開始時

Fig. 1. Appearance of cellular elements in canine vaginal smear.

- Epithelial cells
- - - - - Cornified epithelial cells
- Leucocytes
- Erythrocytes

から、それぞれ消失した。しかし、残りの2頭では一定の傾向はみられなかった。また、30頭中18頭において発情期の後半から、12頭では発情終了直後から、それぞれ再び中等度に出現し始め、このうち13頭では一過性に著明に増加した。

4) 赤血球：赤血球は発情出血の始まる前3カ月間はほとんど出現しないが、発情出血の始まる約1.5カ月前に25頭においてきわめて僅かであるが出現した。このうち13頭では赤血球が数日間一過性に出現しただけであったが、残りの12頭では発情出血の始まるまで数日おきに出現を繰り返した。これら25頭のうち7頭は発情出血の始まる42~64日前(1頭は27日前)の間に1日のみ陰門から血様粘液の漏出がみられた。

V. S. 中への赤血球の出現(少数以上)は肉眼的に陰門から発情出血のみられた日から22日前までの間、平均7日前からであった。赤血球は発情前期の前半はきわめて多数出現し、明確に染色されるが、発情前期の後半から発情期にかけて減少するとともに染色性も低下した。

発情期中頃では、陰門から血様粘液が漏出しているにもかかわらず32頭中13頭ではV. S. 中にほとんど赤血球が認められなかった。しかし、この13頭中8頭では赤血球が発情期の後半および発情終了後、再び中等度に出現した。

発情期を中心として、その前後におけるV. S. 中の各種細胞の出現消失は以上のごとくであるが、一般に、発情前期、発情期の長いものは、上記のようなV. S. の変化がゆるやかであり、逆に期間の短いものはV. S. の変化が急激であった。

5. V. S. 中に出現する各種細胞の出現率：実験犬32頭において、発情出血の始まる10日前から発情終了後10日までの39日間におけるV. S. 中の各種細胞の出現状態を百分率(±以上を出現陽性として検査頭数に対する陽性動物の率)で表わすとFig. 1に示すとおりである。すなわち、有核上皮細胞は発情出血の始まる前10日間にはほぼ全頭に出現しているが、発情前期に入ると減少し、中頃で70% 発情期の第1日目で31%に減少したが、中頃から日を追って出現率が増加し、発情終了日には91%に達し、発情終了後10日間もおおよそこれを維持した。

角化細胞は発情出血の始まる前10日間は約85%の犬に出現し、発情前期に入るとさらに増加し、発情終了日までにはほぼ全頭に認められた。発情終了後の10日間はわずかに減少した。

中性多核白血球は、発情出血の始まる前10日間は約80%の犬に出現し、発情前期に入ると減少し、中頃で50%に、この期の終了日には19%に低下し、さらにに発情期に入って、その前半には約10%に低下したが発情期の末期に急に増加し、終了日に63%に達し、発情終了後10日間は約90%の犬に出現した。

赤血球の出現率は発情出血の始まる10日前には16%程度であったが、その後急に増加し、発情前期の第1日目は84%に達した。その後漸次減少し、発情期の第1日目は66% 発情期中頃には約50%に低下した。発情期の後半から再び増加し、発情終了後7日まで約65%に出現し、その後急に減少し、発情終了後10日目では38%となった。

考 察

本研究は、発情前期、発情期および出血期間などの明らかな32頭について、発情出血開始3カ月前から発情終了後10日まで約130日間にわたりV. S. を観察したものであるが、その成績はおおむね、EVANS & COLE^{1,2)} GRIFFITHS & AMOROSO³⁾の研究報告とほぼ一致している。しかし、発情出血開始前のV. S. 所見についての報告は非常に少なく、ただ、GRIFFITHS & AMOROSO³⁾, BELL & CHRISTE¹²⁾らの報告があるのみで、彼らは発情出血を認めた7~22日前からV. S. 中に赤血球が出現すると述べているにすぎない。

本実験においては、発情出血の始まる約1.5カ月前に赤血球の一過性の出現、角化細胞の一過性の増加を認め、約1カ月前から有核上皮細胞の増加がみられた。また、実験犬32頭中7頭(22%)において、発情出血

開始 42~64 日前 (1 頭は 27 日前) に、ただ 1 日のみであったが陰門から明らかな血様粘液の漏出するのを観察した。外陰部の腫大は、早いもので発情出血の始まる 60~71 日前から始まり、21~30 日までに実験犬の約 70% に見られた。

以上のような発情出血開始前の V. S. の変化、出血所見および外陰部の変化から推察して、発情出血の始まる 2~3 カ月前には、すでに卵巣には卵胞の発育が始まり、estrogen の分泌が起こっているものと考えられる。

上述の V. S. 所見から、大部分の実験犬において、発情前期、発情期を判定することが可能であった。しかし、4 頭では、発情前期、発情期を通じ、有核腔上皮細胞や中性多核白血球が出現したため、両期を判別することは困難であった。

また、著者は第 II 報²⁴⁾で犬の排卵は発情期の 2~3 日に起こることを報告したので、今回の研究から、この時期の V. S. を見ると、大部分の犬においては角化細胞と赤血球だけとなってから 2~3 日目であるため、一応の排卵時期を推定することができるが、各例について V. S. のみから排卵時期を正確に判定することは困難である。

結 論

実験犬 32 頭における発情出血、外陰部の変化および V. S. 所見は以下のとおりであった。

1. 発情出血所見

発情出血開始時の漏出液は暗赤色または赤褐色、粘稠で漸次増量するが、発情前期の後半から発情期の前半で漏出液は淡赤色となり、量が減少して、発情期の後半には見られなくなった。しかし、実験犬の 1/3 は発情終了後も 4~10 日間、暗赤色、粘稠の血様粘液を少量漏出した。

2. 外陰部の所見

外部陰の腫大は、早いもので発情出血開始 61~70 日前から徐々に始まり、21~30 日前までに実験犬の約 70% にみられた。この外陰部の腫大は、とくに発情前期の 3~4 日頃から著明となり、その後半に最高に達し、この状態を発情期中頃まで持続し、その後徐々に縮小した。

3. Vaginal smear 所見

実験犬 32 頭について、発情出血開始 3 カ月前から発情終了後 10 日まで約 130 日間の V. S. を観察し、次のような成績が得られた。

1) 発情出血開始前：中性多核白血球、有核腔上皮細胞や角化細胞は常に少数出現しているが、後 2 者は発情

出血の始まる約 1~1.5 カ月前から約 2/3 の犬において僅かに増加がみられた。赤血球は発情出血の始まる約 1.5 カ月前に数日間僅少出現し、発情出血の認められる平均 7 日前から V. S. 中に少数出現し始めた。

2) 発情前期：角化細胞は徐々に増加し、有核腔上皮細胞および中性多核白血球は、この期の後半で大部分は消失した。赤血球も前半は多数出現するが、後半は徐々に減少した。

3) 発情期：有核腔上皮細胞、中性多核白血球はこの期の後半から再び出現し始めた。中等度に出現していた角化細胞は後半から約半数の犬において減少した。不鮮明に染色された赤血球が少数出現するものや、まったく消失しているものが、それぞれほぼ同数認められた。

4) 発情終了後：有核腔上皮細胞、角化細胞は少数みられるが、中性多核白血球は約半数のものにおいて一過性に増加した。また、血様粘液の漏出がないにもかかわらず V. S. 中に赤血球の存在することを認めた。

以上のごとく、大部分の犬においては、V. S. 中に出現する各種細胞が卵巣周期と関連して周期的に変動することを知った。しかし、若干の犬 (5 頭, 13%) では判然とした細胞の出現消長はみられないので、V. S. のみによって発情の各期を正確に判定することは困難である。

なお、本稿の概要は 1971 年秋季家畜繁殖研究会において報告した。

本研究にあたり、終始ご指導をいただいた星修三先生に深謝し、実験を援助された清水敏光、長谷川清、松崎正実、平野佳代、細川千賀子の諸君に、また、本文の校閲をいただいた東京大学農学部山内亮教授、農林省家畜衛生試験場小笠晃博士に謝意を表します。

(1974. 10. 1 受付)

文 献

1. EVANS, H. M. & H. H. COLE: *Anat. Rec.*, **35**, 10, 1927.
2. EVANS, H. M. & H. H. COLE: *Mem. Univ. Calif.*, **9**, 66, 1931.
3. GRIFFITHS, W. F. B. & E. C. AMOROSO: *Vet. Rec.*, **51**, 1279., 1939.
4. ANDERSON, A. C., & ELOISE WOOTEN: *Reproduction in the Domestic Animal*, Vol. I. (COLE, H. H. & P. T. CUOPS) Eds, 359, Academic Press, New York, 1959.
5. HARROP, A. E.: *Reproduction in the Dog*, The University Press, Glasgow, 1960.
6. GIER, H. T.: *Vet. Scope*, **5**, 2, 1960.
7. ASDELL, S. A.: *Patterns of Mammalian*

- Reproduction, 2nd. Ed Ithaca, N. Y., Cornell Univ. Press, 1964.
8. ECKSTEIN, P. & A. N. ZUCKERM: Marshall's Physiology of Reproduction, (PARKERS, A. S. ed) Vol. I, Longmans, Green, New York, 1964.
 9. WITIAK, E.: *Vet. Med.*, **62**, 869, 1967.
 10. BELL, H. T., J. B. BALLEY & D. W. CHRISTIE: *J. Endocrinol.*, **48**, 4, 1970.
 11. SIMONS, J.: *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, **65**, 369, 1970.
 12. BELL, E. T. & D. W. CHRISTIE: *Vet. Rec.*, **88**, 546, 1971.
 13. SCHUTTE, A. P.: *J. Small Anim. Pract.*, **8**, 301, 1967.
 14. CHRISTIC, D. W.: *Vet. Rec.*, **87**, 597, 1970.
 15. CHRISTIC, D. W.: *Vet. Rec.*, **87**, 598, 1970.
 16. BURGESS, O.: *Vet. Rec.*, **24**, 127, 1971.
 17. BELL, E. T. & D. W. CHRISTIE: *Brit. Vet. J.*, **127**, 93, 1971.
 18. EVENS, J. M. & T. J. SALAGE: *Vet. Rec.*, **87**, 598, 1970.
 19. SCHUTTE, A. P.: *J. Small Anim. Pract.*, **8**, 307, 1967.
 20. NEWBERRY, W. E. & H. T. GIER: *Vet. Med.*, **47**, 390, 1952.
 21. NORTHWAY, R. B.: *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, **67**, 538, 1972.
 22. SCHUTTE, A. P.: *J. Small Anim. Pract.*, **8**, 313, 1967.
 23. 筒井(敏)・清水(敏): 本誌, **18**, 132, 1973.
 24. 筒井(敏): 本誌, **18**, 137, 1973.

Summary

In order to investigate the cellular elements of vaginal smear of the bitch in the estrous cycle, 32 mongrel bitches 2~4 years of age weighing about 10 kg each were observed during approximately 130 days from 3 months before proestrus to 10 days after estrus.

Vaginal smears were collected every day using a metal spatula at any time between 8 and 9 a. m.

Various cell components contained in the vaginal smear were divided into 4 groups; -(non), ±(a few), +(moderate), and †(numerous), on the basis of the number of cells which appeared.

A smear was air-dried quickly, fixed in 90 per cent methanol and stained with Giemsa solution. The results obtained are as follows.

1. Pre-proestrus.

Leucocytes, epithelial cells and cornified epithelial cells were always low in count in the constituents of smear. In two-thirds of the animals the latter two increased slightly in count over a period from 1 to 1.5 months before vulval bleeding could be recognized by the naked eye.

Erythrocytes were observed in smear for only several days from 40 to 50 days before vulval bleeding. The consistent appearance of erythrocytes began to be observed in smear 7 days on the average (0~20 days) before vulval bleeding.

2. Proestrus (3~17 days, or 8.4 days on the average).

Cornified epithelial cells increased gradually. Epithelial cells and leucocytes were hardly found in numerous animals in the late stage of this phase. Erythrocytes increased in count in the early phase, but decreased gradually in the latter half of this phase.

3. Estrus (5~20 days, or 11.1 days on the average).

Epithelial cells and leucocytes began to appear in the vaginal smear again in late estrus.

Cornified epithelial cells decreased moderately in about half of the animals in the latter half of this phase.

In some animals, erythrocytes stained indistinctly were absent from smear in this phase.

4. Metestrus.

A few epithelial cells and cornified epithelial cells were found in vaginal smears during post-estrus. Leucocytes increased temporarily in about half of the animals. Erythrocytes appeared

moderately in smears in about two-thirds of the animals studied.

As mentioned above, it was found that various cell elements changed rhythmically in the vaginal smear in relation to the ovarian cycle in numerous bitches. Four bitches (13%), however, showed no periodical changes. So that, it was difficult to decide the estrous cycle accurately by examining vaginal smears alone.