Corynebacterium hofmannii による牛の性周期別子宮内接種試験について

鈴木達行* 高橋芳幸* 下平乙夫*

(昭和 56 年 10 月 16 日受理)

Relationship between Estrus and Uterine Infection with *Corynebacterium hofmannii* in Cows

TATSUYUKI SUZUKI, Y. TAKAHASHI and I. SHIMOHIRA
(Hidaka National Livestock Breeding Station,
Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,
Urakawa, Hokkaido)

SUMMARY

Five cows in estrus and 8 cows in the luteal phase were inoculated with *Corynebacterium hofmannii* into the uterine horn. Then 48 hours later, flushing fluid was collected from the uterine lumen by uterine irrigation.

C. hofmannii in 4 cases and pyometritis in 5 cases were detected in the uterine flushing fluid in the luteal-phase. No symptoms of pyometritis and bacteriological infection were detected in estrus.

From the sediment of flushing fluid, epithelial cells were detected in estrus, and epithelial and polymorphonuclear cells in the luteal phase.

要 約

前報⁸⁾で、牛の膣から比較的高頻度に検出された *Corynebacterium hofmannii* が、黄体期に行う受精卵の移植の際、膣から子宮に持ち込まれた場合の子宮の反応を確認するため、リビートブリーダー牛 7 頭について、性周期別に子宮内接種試験を行ったところ、概要次のような結果を得た。

1) 発情期の子宮では、感染に対して明らかな抵抗がみられ、試験に供した 5 頭中全例の回収液に異状がみられず、接種菌が検出されなかった。また、回収液からの検出細胞は上皮様細胞が主体を占めた。

2) 黄体期に感染試験に供した 7 頭では、4 例から接種菌、5 例から膿塊が検出され、明らかに接種菌の感染が認められた。回収液からの検出細胞は、多形核白血球様細胞、核の濃染した円形細胞が主体で、上皮様細胞の変性が著明であった。また、反復して試験に供した例では、プラズマ様細胞、円形細胞の集簇がみられた。

3) 発情期に感染試験に供した 5 頭中 1 例で、菌接種の 8 日後に卵巣嚢腫がみられたが、ほかの 4 例では、いずれも正常な状態に回復した。次に、黄体期の試験に供した 7 頭中 2 例では、前回の発情から 20 および 21 日目に正常な発情が再来したが、ほかの 4 頭では、30~40 日経過後も発情が再来せず、子宮内膜炎、あるいは、卵巣嚢腫を併発した。

WILLETT ら⁹⁾、BLOCK & ROWSON¹⁾ は、黄体期の子宮に受精卵の移植が成功しないのは、この時期の子宮が、細菌感染を受けやすいためであることを実験的に示唆した。また、山内ら¹¹⁾は、兎および牛について、子宮内に非病原性菌を注入して子宮内膜炎発生試験を行い、黄体期の初期に注入すれば、子宮内膜炎が発生するが、卵卵期に注入しても全く発病しないことを確認した。

著者ら⁸⁾は、性周期別に膣内、子宮頸管内の細菌叢を調査し、子宮頸管では、性周期を問わず無菌的であるが、黄体期の膣では、発情期のものに比べて *Corynebacter-*

ium, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Escherichia* など、多種多様の細菌が検出されることから、この時期に行う子宮頸管經由による受精卵の移植では、膣から子宮内へ細菌を持ち込み、これらの感染する機会が多いと推察した。

本報では、これらの黄体期における膣由来の細菌が、受精卵の移植の際、子宮に持ち込まれた場合の子宮の反応を確認するため、前報⁸⁾で、膣から比較的高頻度に検出された *C. hofmannii* により、性周期別に子宮内接種試験を行ったので、その成績について報告する。

* 農林水産省日高種畜牧場(北海道浦河郡浦河町西舎)

1. 材料および方法

1) 試験牛と対象牛

試験牛では、日高種畜牧場繁殖牛のうち、リピーターまたは流産などのため廃牛となった7頭について、昭和55年11月から12月までの2カ月間にわたって、発情期、黄体期別に、それぞれ5, 7例を反復して試験に供した。これらの試験例のうち、初回試験例は、発情期、黄体期別に3, 4例、2回目試験例は、2, 2例、また3回目試験例は、黄体期の1例である。

対象牛では、受精卵の回収を目的に過剰排卵処理を行った正常な未経産牛4頭を試験に供した。

2) 試験の方法

(1) 細菌の接種方法：牛の陰由来 *C. hofmannii* 10^7 /ml 菌の0.5 ml を、国産の人工授精器で、発情期、ならびに黄体期（7～11日）の子宮角へ注入した。注入に際しては、外陰部を清拭したのち、腔内での細菌汚染を防止する目的で、授精器をセロファン紙で覆い、子宮頸管の

写真1 風船付導尿管

中央付近に達したところで、これを破り、深部に進めた。

(2) 接種菌の回収方法：菌注入の48時間後に、當場において、受精卵の回収の目的で使用している写真1に示した風船付導尿管（2 way balloon catheter）を感染子宮角に挿入し、40 cc のリンゲル氏液を注射筒で注入

表1 発情期、黄体期別 *C. hofmannii* による子宮内接種試験成績

牛番号	試験 順位	性周期	試験前の細菌学的検査 ¹⁾		回収菌量	回収液の 肉眼的所見	回収液の鏡検像 ²⁾				
			膈 前 庭	子 宮 頸 管			EC	N	LY	PL	E
219	1	0	Streptococcus (++)	—	—	清 澄	Ⅲ	+	++	—	+
	2	10	Streptococcus (Ⅲ)	—	++	多量の膿塊	変性	Ⅲ	Ⅲ	—	+
502	1	0	—	—	—	粘稠, 出血	Ⅲ	+	+	—	+
	2	7	Escherichia (+)	—	—	—	—	—	—	—	—
			<i>C. hofmannii</i> (+)	—	—	—	—	—	—	—	—
642	1	7	Streptococcus (Ⅲ)	—	—	—	—	—	—	—	—
			<i>Sta. aureus</i> (++)	—	+	少量の膿塊	変性	Ⅲ	++	—	+
			Escherichia (+)	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	0	Streptococcus (+)	—	—	—	—	—	—	—	—
			<i>C. hofmannii</i> (Ⅲ)	—	—	—	—	—	—	—	—
271	1	8	Streptococcus (Ⅲ)	Streptococcus (+)	—	清 澄	変性	Ⅲ	Ⅲ	—	+
	2	0	Streptococcus (Ⅲ)	—	—	清 澄	Ⅲ	++	++	—	+
			Staphylococcus (++)	—	—	—	—	—	—	—	—
			<i>B. subtilis</i> (+)	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	8	Streptococcus (Ⅲ)	—	+	多量の膿塊	変性	Ⅲ	Ⅲ	—	+
			<i>C. hofmannii</i> (+)	—	—	—	—	—	—	—	—
			<i>B. subtilis</i> (+)	—	—	—	—	—	—	—	—
196	1	8	Streptococcus (Ⅲ)	—	—	少量の膿塊	変性	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	+
			<i>C. hofmannii</i> (++)	—	—	—	—	—	—	—	—
400	1	8	Streptococcus (Ⅲ)	—	—	清 澄	変性	Ⅲ	++	Ⅲ	++
			<i>C. pyogenes</i> (++)	—	—	—	—	—	—	—	—
799	1	0	Streptococcus (Ⅲ)	—	—	清 澄	Ⅲ	+	+	—	—
83 ³⁾	1	7	実施せず	—	—	清 澄	Ⅲ	+	+	—	+
137 ³⁾	1	7				清 澄	Ⅲ	—	—	—	—
151 ³⁾	1	7				清 澄	Ⅲ	—	+	—	—
431 ³⁾	1	7				清 澄	Ⅲ	—	—	—	—

注) 1) +: コロニー数 10 以下 ++: コロニー数 11～50 Ⅲ: コロニー数 50 以上

2) 10 視野を平均した検出細胞の 100 分比 +: 0～10 ++: 11～30 Ⅲ: 31～60 Ⅳ: 60 以上

3) 正常牛 (過剰排卵処理牛)

EC: 上皮様細胞 N: 多形核白血球様細胞 LY: 小型の円形細胞 PL: プラズマ様細胞 E: 好酸球様細胞

したのち、マッサージし、注射筒に吸引して回収した。

なお、導尿管の挿入に際しては、腔内の細菌汚染を防止する目的で、セロファン紙によりこれを覆い、子宮頸管外口部に達したところで破り、深部に進めた。また、黄体期に行った試験では、頸管拡張棒で子宮頸管を拡張したのち試験に供した。細菌の回収試験用材料の採取を終了したのち、子宮内にペニシリン 10 万単位、ストレプトマイシン 1g を注入し、その後の感染を予防した。

(3) 対象牛における回収方法：セロファン紙により導尿管を覆わなかった外は、上記(2)の方法に従い、組織培養液の TCM-199 で子宮内を灌流し、回収した。

(4) 回収液の培養と細胞の鏡検方法：回収液については、その 0.1 ml を 5% 牛血液寒天培地に塗抹し、37℃、48時間培養を行ったのち細菌数を調べた。また、残りの回収液については、2,500 rpm、10 分間遠沈したのち、その沈渣についてギムザ染色を施したのち鏡検した。対象牛の回収液では、受精卵を採取したのち、上記と同様な方法で試験に供した。

2. 成 績

1) 発情期における接種試験成績

供試した 5 例の成績は、表 1 に示すように、注入 48 時間後の回収で、いずれからも接種した *C. hofmannii* は検出されず、1 例に、少数の α -溶血性 *Streptococcus* が認められた。

回収液の性状は、1 例に粘稠性粘液と多量の出血を認めたほかに、特異所見がみられなかった。

鏡検像では、表 1 に示したように、初回の試験に供し

写真 2 発情期に接種した例の子宮洗浄液内細胞像：核の明るい細胞質の広い細胞（上皮様細胞）が主体に認められる（799 号牛，第 1 回試験）

た 799, 219, 502 では、核の明るい上皮様細胞が主体を占め、核の分葉した小型の細胞、核の濃染した円形細胞がわずかに認められた（写真 2）。また、2 回目の試験に供した 271, 642 では、上皮様細胞が主体を占めたが、初回の試験に供したものに比較し、核の分葉した細胞の検出割合が高かった。出血のみられた 502 では、粘液とともに赤血球が多量に含まれていた。

2) 黄体期における接種試験成績

黄体期に行った 7 例の成績は表 1 に示すとおりである。すなわち、7 頭中 4 例から *C. hofmannii* が回収されたが、回収菌量はきわめて少なく、No. 642, 271, 219, 502 別に、それぞれ 4, 5, 20, 70 個のコロニー数となった。

写真 3 黄体期に接種した例の子宮洗浄液内細胞像：核が円形濃染した小型の円形細胞が主体に認められる（400 号牛，第 1 回試験）

写真 4 黄体期に接種した例の子宮洗浄液内細胞像：核が分葉した小型の細胞（多形核白血球）が主体に認められる（219 号牛，第 2 回試験）

また、5例では、回収液に膿塊が認められた。膿塊は、No. 642, 196, 502 で少なく、No. 219, 217 で多かった。このうち No. 196 では、少量の膿塊が認められたにもかかわらず、接種した細菌の回収は陰性であった。

鏡検像では、初回の試験に供した No. 196, 271, 400, 642 で多形核白血球様、核が濃染した円形の細胞が主体を占め、上皮様細胞は変性が著明であった。また、No. 196, 400 では、核が円形、濃染して偏在した小型の円形細胞（一見、プラズマ細胞に類似）の集簇が認められ

た（写真3）。

2回目、ならびに3回目の試験に供した No. 219, 502 と271では、初回の試験に供した例と同様に、多形核白血球様、核が円形、濃染した小型の細胞が主体を占め、上皮様細胞に強い変性が認められた（写真4）。また、これらの例では、リンパ球の集簇が著明であった。

対照の No. 83, 137, 151, 431 では、上皮様細胞が主体を占め、多形核白血球様、核が円形、濃染した円形細胞はほとんど認められなかった。

表2 試験牛における *C. hofmannii* 接種前後の生殖器の状況

牛番号	接種試験前の生殖器の状況		接種試験を行った性周期の各ステージと菌接種後の生殖器の状況		
	性 周 期	種付回数	1 回 目	2 回 目	3 回 目
271	18~21	9	8 ¹⁾	0 (囊腫)	8 (囊腫, 内膜炎)
400	18~21 (乳房炎)	7	8	機能不全 (41日間無発情)	
799	20	9	0	10	機能不全 (31日間無発情)
219	18~22	10	0	10	機能不全 (31日間無発情)
642	17~22 (2回流産)	3	7	0	...
196	17~23	11	8	機能不全 (31日間無発情)	
502	21 (1回流産)	4	0	7	囊腫, 内膜炎

注) 1): 接種試験を行った性周期の各ステージ

3) 接種試験の生殖器の状況

初回の接種試験を発情期に行った No. 219, 502, 799 では、接種後、子宮に異状が認められなかったが、引き続き行った黄体期の接種試験後、いずれも31日間にわたって発情の徴候を示さず、No. 502 では、子宮内膜炎と接種側卵巢に囊腫をともなった。

次いで、初回の接種試験を黄体期（性周期の7~8日）に行った No. 196, 271, 400, 642 のうち、No. 271, 642 では、菌接種後、それぞれ性周期の20, 21日に発情を示したが、No. 196, 400 では、卵巢囊腫、子宮内膜炎が著明で、それぞれ31, 41日間にわたって発情徴候を示さなかった。

2回目の試験を発情期に行った No. 271 では、菌接種後8日目の卵巢に囊腫がみられ、引き続いて、性周期の8日目に菌接種を行ったところ、著明な子宮内膜炎となった（表2）。

3. 考 察

Hawk⁴⁾ らは、発情期、黄体期別に *Escherichia coli* により、牛の子宮内への接種試験を行ったところ、黄体期の子宮における喚作用は、菌接種後3~4時間では微量で、8時間以降に著明となり、1~2日後に、子宮に多

量の膿塊が蓄積したことを報告した。また、Rowson ら⁶⁾ は、黄体期に行った接種試験で、試験に供した牛の11頭中8例から膿塊が検出されたのに対し、発情期に行った6頭では、全頭から、膿塊ならびに細菌が検出されなかったことを報告している。同様に、山内は^{10, 11)}、正常牛7頭について、*Aerobacter aerogenes*（現在 *Enterobacter aerogenes*）により子宮内への接種試験を行ったところ、卵胞期に注入した4頭は感染せず、黄体初期に注入した3頭に子宮内膜炎を認め、黄体形成初期の子宮は、細菌が感染して内膜炎が起りやすいことを示唆した。

著者らの接種試験でも同様な傾向がみられ、発情期では、子宮から膿塊ならびに細菌が検出されなかったのに対し、黄体期の子宮の7頭中5例から膿塊が検出され、このうち4頭から細菌が検出された。しかし、初回の接種試験を黄体期に実施した4例では、2例の回収液に少量の膿塊を認めたものの、2例では異状がみられず、回収菌量は、4頭中1例に4個の細菌が検出されたにすぎなかった。Black ら²⁾ は、リピートブリーダーについて、黄体期の子宮の細菌感染に対する態度を調べたところ、接種した *Escherichia* が、処女牛よりも著しく減少することから、抗菌力強いことを認めた。著者らの供試した試験牛もリピートブリーダーであったことから、正常

牛の子宮の細菌感染に対する態度とは異なった反応があったものと考えられる。また、2、3回と試験を繰り返した黄体期の接種試験例でも、膿塊の量は増加するものの、回収菌量がさほど多くなかったことが、これを示唆しているように思われる。

子宮内の正常細胞については、発情期に、わずかに中性好性白血球がみられる個体もあるが、上皮細胞が主体を占めるといわれ、黄体期、ならびに卵巣摘出牛の非感染粘膜には、白血球反応が起らないとの報告³⁾もある。円山⁸⁾は、ビブリオ菌を子宮内に注入して、人工感染試験を行ったところ、卵胞期では、著変がみられなかったが、黄体期の子宮では、粘膜の変性、壊死、剝離があり、好酸球、好中球、リンパ球およびプラズマ細胞の浸潤が顕著であったと述べている。また、山内¹²⁾は、卵巣割去ラットに Stilbestrol の投与により、陰から子宮への細菌侵入を誘発させたところ、子宮内膜の組織所見として、上皮細胞の肥大、核の pyknosis, cytoplasm の空胞形成の変性および上皮の剝離が目され、好中球、小円形細胞、好酸球の浸潤が、とくに上皮下および変性した上皮層に認められた。今回の接種試験でも、これらの報告に類似した結果が得られ、発情期に回収した子宮内の細胞では、上皮様細胞が主体で、わずかに核の濃染した小型の分葉核細胞、小円形細胞が認められた。これに対して、黄体期のものでは、分葉核細胞、小円形細胞が主体を占め、プラズマ様細胞の増加や、上皮様細胞の変性が顕著であった。また試験を繰り返した例では、プラズマ様細胞や小円形細胞が増加する傾向がみられた。しかし好酸球は、検出細胞の百分比中2~10個の割合で検出されたにすぎず、増加の傾向はみられなかった。本試験に供した細胞は、回収液の沈殿から得られたものであり、バイオプシーにより得られた組織の調査と比較する上で難点があるにしても、一つの傾向はつかめたように思える。

発情期の子宮では、エストロジェンの作用により、子宮粘膜の末梢血液の補給を補助する働きのあることが知られている⁴⁾。また、このように血液の補充が強化されることにより、感染に対して白血球が増加され、エストロジェンによる子宮収縮運動は、子宮頸管を通して細菌

の排泄を促すといわれている⁷⁾が、発情期に実施した本試験の結果でも、菌接種48時間後に細菌の検出が陰性であったことから、この時期の子宮では、旺盛な喰作用や、子宮収縮運動による異物の排泄作用により、正常に回復することの早いことが推察できた。

これに対して、黄体期の子宮では、接種菌により著明な感染がみられた。これらの試験に供した牛が、主としてリピーターブリーダーであり、生殖器に問題のある牛であること、試験に供する間隔が短かったことなどを考慮しても、性周期別にみて、接染試験の結果が明瞭な差となって現われた。

上述のような実験結果からも、実施の時期が黄体期となる受精卵の移植では、移植時に陰内の細菌持ち込みによる子宮内汚染を防止する対策が、受精卵移植による受胎率の向上に関わる要因の一つになると考えられる。また、移植後子宮内膜炎の併発防止対策にも必要なものと思われる。

稿を終るに当たり、関連文献の提供を頂いた、前農林水産省家畜衛生試験場東北支場長 根本 久博士、鏡検像について指導を頂いた同本場 石野清之室長、ならびに関連文献の提供と校閲を賜った農林水産省畜産試験場杉江佑博士に深謝する。

文 献

- 1) BROCK, H., et al.: *F. Agric. Sci.*, 52, 479 (1952).
- 2) BLACK, W. G., et al.: 文献 10) より引用 (1953).
- 3) HANSEL, W., et al.: 文献 6) より引用 (1951).
- 4) HAWK, H. W., et al.: *Am. J. Vet. Res.*, 25, 362~366 (1964).
- 5) 円山八十一, ほか: 家畜繁殖誌, 7, 7~10 (1961).
- 6) ROWSON, L. E., et al.: *Vet. Rec.*, 65, 335~340 (1953).
- 7) ROWSON, L. E., et al.: 文献 6) より引用 (1942).
- 8) 鈴木達行, ほか: 日獣会誌, 投稿中.
- 9) WILLETT, E. L., et al.: *Science*, 113, 247 (1951).
- 10) 山内亮: 家畜繁殖学 最近のあゆみ 家畜繁殖学研究会編, 289~305, 文永堂, 東京 (1957).
- 11) 山内 亮, ほか: 家畜繁殖誌, 1, 45~48 (1955).
- 12) 山内 亮, ほか: 家畜繁殖誌, 2, 107~113 (1957).