

重種馬における子宮内細胞診および
細菌学的調査

令和 4 年
(2022 年)

帯広畜産大学大学院畜産学研究科
獣医学専攻博士課程
新倉匡賢

Study on the uterine cytology and bacteriology
in heavy draft horses

2022

NIIKURA Tadamasa

Doctoral Program of Veterinary Science
Graduate School of
Animal and Veterinary Sciences and Agriculture
Obihiro University of
Agriculture and Veterinary Medicine

略語説明

ABPC ; Amino benzyl penicillin (アンピシリン)

CEZ ; Cefazolin (セファゾリン)

ERFX ; Enrofloxacin (エンロフロキサシン)

ESBL ; Extended-spectrum β -lactamase (基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ)

GM ; Gentamycin (ゲンタマイシン)

IUF ; Intra-uterine-fluids (子宮内貯留液)

IUI ; Intra-uterine-infusion (子宮内薬剤注入)

KM ; Kanamycin (カナマイシン)

MBFX ; Marbofloxacin (マルボフロキサシン)

OT ; Oxytocin (オキシトシン)

OTC ; Oxytetracycline (オキシテトラサイクリン)

PCG ; Benzyl penicillin (ペニシリン)

PG ; Prostaglandin F_{2 α} (プロスタグランディン F_{2 α})

PMN ; Polymorphonuclear neutrophil (多形核好中球)

目次

諸論.....	1
図表.....	5
第1章：重種馬における交配後のオキシトシン及びプロスタグランディン F2 α 投与 と多形核好中球(PMNs)数の関係について	
1. 緒言.....	11
2. 材料および方法	12
2.1. 供試馬と処置	12
2.2. 細胞診及び子宮内貯留	13
2.3. 血清プロジェステロン値測定	13
2.4. 統計処理	14
3. 結果.....	14
4. 考察.....	15
5. 小括.....	17
6. 図表.....	19
第2章：重種馬における子宮内細菌検査と薬剤注入の関係について	
1. 緒言.....	26
2. 材料および方法	27
2.1. 供試馬と処置	27
2.2. 採材方法	27
2.3. 細菌検査および薬剤感受性.....	28
2.4. 統計処理	28
3. 結果.....	28
4. 考察.....	29

5. 小 括.....	31
6. 図 表.....	32
総 括.....	36
謝 辞.....	39
Abstract.....	41
引用文献.....	45

諸 論

馬が誕生したのは何百万年も前のことであるが、家畜化されたのは 5000 年ほど前のことである。馬を訓練して荷物や人の運搬に利用することで、人類は以前より格段に効率よく土地を耕すことが出来るようになった。それ以来、人類は馬と共に暮らし、馬から衣類、食物、輸送、娯楽の恩恵を受けている。人類は、狩猟採集の生活から農業に近い生活へ画期的な転換を遂げた際、馬を家畜化して仕事をするようになった。中世の軍馬として育種されてきた大型の重種は、馬力のある農業用馬、重挽馬として改良され、ベルジアン、シャイアー、ペルシュロンなど、多くの近代品種として生まれ変わった。農耕に一番良い馬は大型で筋肉の多いものと考えられ、そうした品種が作り出された [21]。

馬が最も人類に必要とされたと言える 18 世紀から 20 世紀は、産業の著しい発展期にあり、爆発的な馬の頭数の増加を記録する [80]。古代から、牛馬による戦車や荷車などの牽引は行われていたが、馬の持つ速さと牽引動力を利用して、一躍産業の担い手として馬が活躍した。日本でも、明治期に挽曳技術を導入し、これにより、産業の近代化が飛躍的に発展した。産業現場では、昭和初期まで物資の運搬、輸送等に馬力が主要な動力として活躍した。また、拓殖事業としての馬力は森での木の切り出しや材木の運搬など林業や炭鉱の場に利用され、主に北海道東部、北部開拓地で市街地と辺境地域を結ぶ物資輸送に利用され、結果として北海道開拓が大きく進展した。今も残る北海道や東北の挽曳競馬、馬の挽曳能力は、人の生活を支えた時代の名残と言える。

機械化の進んだ現代でも、馬は世界の多くの国々で重要な働きを担っている。海外の大きな牧場では、特に車の入れない場所などでは牛を統制するためにカウボーイが今なお、馬と共に仕事をしている。重種馬は農耕に適した品種であり、畑を耕したり、畝に種を撒いたり砕土したりと、農作業に従事している。また、荷車に食物や作物、乾草等を積み、物資の輸送に貢献している。また、広報活動や宣伝にも馬は利用されている。ビール醸造所の多くは、今でもクライズデール、シャイアー、ペルシュロンなどが、ビールを載せた荷車を都会の雑踏の中牽引して、配達に馬を利用している [21, 37]。

ドラフトホース (draft horse) は、畑で鋤を引きまた荷馬車を引く時などに使われる胴長で、頸や肢の太い大型の馬のことを言う。第二次世界大戦後、トラクターが農村へ普及したことで、日本ではドラフトホースの農耕へ従事する機会が急速に激減し、それに伴い生産頭数も減少した [36]。農業のモータリゼーション化に加え、

生産者の高齢化も伴い、2019年には、我が国の重種馬飼養頭数は約5,100頭にまで減少している [64]。その中でも北海道には、ばんえい競馬と呼ばれるドラフトホースの競馬があり、ペルシュロン、ブルトン、ベルジアン等の品種が純血または、半血種として生産されており、日本輓系種と呼ばれている。この日本で改良された重種馬は、世界で最も体長が長く、胸囲が大きく、世界で最も体重が重い品種である [38] (Fig. 0-1)。重種馬は性格が温厚で扱いやすく、北海道や東北をはじめ、祭事に利用されている。また、性格に加えて、体格が大きく力強い風格から、全国に愛好家もいる。この世界で最も大きな品種である重種馬の保存、ばんえい競馬や独自の文化を維持していくためには、重種馬繁殖成績の向上が必要不可欠である。

馬は季節繁殖動物であり、交配できる時期が2月から9月頃までと限られている。正常な卵巣周期開始には日長時間が長くなる必要があり、一般的に北半球では2月中旬頃からが繁殖シーズンの始まりと考えられている [60]。早生まれの仔馬は、当才馬のセールで身体が大きく高値で取引される傾向がある。また、早い時期に分娩を終えた牝馬は、遅い時期に分娩した牝馬よりも交配の機会をより多く得ることが出来るため、多くの牧場管理者や獣医師は繁殖シーズンの早い時期からの交配および受胎することを望んでいる [30, 57, 70]。

1960年代、サラブレッドにおける1シーズンでの受胎率は約70%、妊娠鑑定も排卵後40-45日で行われ、双胎による流産が多く、翌年の仔馬生産率は、50-55%と低い値であった [3, 34]。しかし、ここ50年間で、馬の繁殖技術は大きく進歩した。超音波画像診断装置が1980年代に馬臨床繁殖の現場に取り入れられ、妊娠鑑定や双胎の処置も排卵後14日から行うようになり、現在では超音波装置は繁殖分野で獣医師にとって必須の道具となっている。エコー検査による繁殖管理、診断技術等、多くの報告がなされている [3, 24, 26, 27, 28, 40, 56, 68]。近年のサラブレッドにおける1シーズンでの受胎率は90%、翌年の仔馬生産率は85%程度まで向上したとの報告がある [2, 3, 6, 31, 44, 59]。サラブレッド以外の馬では、人工授精 (AI: Artificial Insemination) や受精卵移植 (ET: Embryo Transfer)、卵細胞質内精子注入法 (ICSI: Intracytoplasmic sperm injection) 等、馬における様々な繁殖技術が進歩してきた [3, 71]。

一方、重種馬臨床繁殖の現場では、交配適期の診断が獣医師を介さずに、生産者が発情行動の観察等から独自で判断されることが多く、どの程度の子宮疾患が存在し、子宮疾患に対してどのような処置が必要であるか、十分な対応がなされていないのが現状である。

交配誘導性子宮内膜炎は、交配後の余剰精液が子宮内へ残存することで炎症が惹起される病態であり、子宮内貯留が 48 時間以上続くと不受胎や早期胚死滅のリスクが高まると考えられている。現在、重種馬臨床現場において子宮内膜炎の治療は、排卵後の子宮洗浄や子宮内薬剤注入が一般的に行われているが、子宮の自浄作用が低下している馬では、洗浄等の処置後も子宮内貯留が認められ不受胎となることが多い。また、重種馬では一発情期中の交配回数が 2~3 回にわたることも多く、子宮内汚染のリスクも高い (Fig. 0-2)。軽種馬では、交配後のオキシトシン投与により子宮内の浄化を促す処置が行われているが、重種馬ではオキシトシンやプロスタグランディン製剤等の陣痛促進剤を使用した報告はない。

子宮内細胞診や細菌検査は、古くから軽種馬における子宮内膜炎の診断に利用されており、野外臨床現場では子宮内還流液採取よりも簡便に行うことができる。また、子宮内細胞診の結果が好ましくない場合、胚死滅や流産のリスクが高くなり、仔馬出生率の低下から生産者の経済的損失につながる [11, 22, 23]。しかし、重種馬においては子宮内細胞診や細菌検査の報告がなく、子宮内膜炎の罹患状況や子宮内環境が調査されていないのが現状である。

本研究の目的は、繁殖用重種馬における交配前後の子宮内環境を調査するために、超音波画像診断装置を用いた交配前後の子宮内貯留液の有無を検索する。また、子宮内環境の迅速診断を可能とするために、交配前後の子宮内の炎症細胞の有無および細菌の有無を専用サイトブラシおよび細菌検査スワブにより採取した材料を解析する (Figs. 0-3, 0-4)。

まず第 1 章では、子宮内サイトブラシを用いた子宮内膜細胞診を行い、同時にプロスタグランディン F_{2α} およびオキシトシンといった陣痛促進剤が、子宮クリアランス能、子宮内貯留液の排出へ正の影響を及ぼすか比較検討した。

さらに第 2 章では、子宮内スワブを用いて細菌検査を実施し、重種馬における交配前後の細菌検出率を調査した。また、子宮内薬剤注入の有無が重種馬における子宮内環境へ正の効果を示すか比較検討した。

図表



Fig. 0-1. Japanese heavy draft horses are mixed breeds of Percheron, Breton, and Belgian draft horses. They weigh approximately 1,000 kg and are one of the largest breeds in the world. Left : Waiting an examination of reproductive tract of the heavy draft horse. Middle : Mare and foal resting in the stable. Right : Mare and foal grazing in the paddock.



Fig. 0-2. Persistent breeding-induced endometritis. A major cause of infertility in mares. Left : Mating of heavy draft horse. Middle : Exudation at the vulva. Right : Vaginal speculum examination.

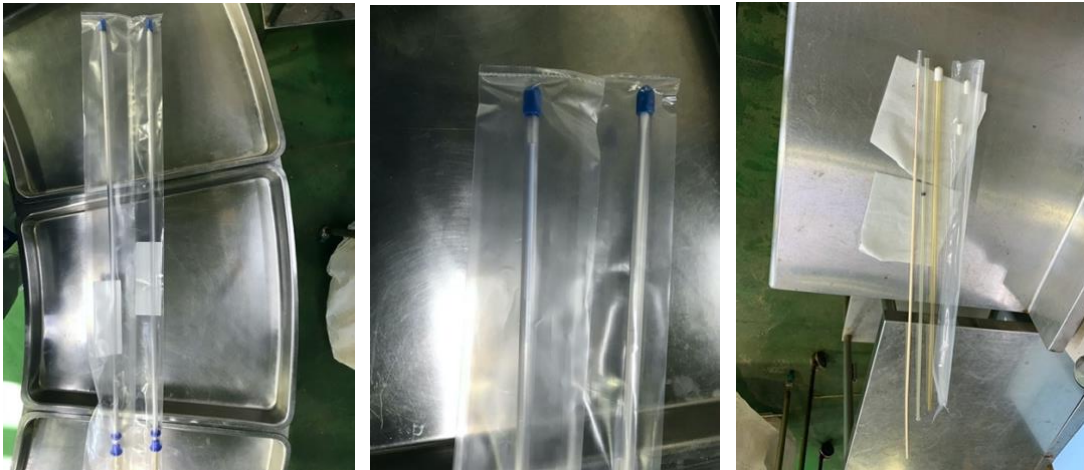


Fig. 0-3. A double-guarded uterine cytology brush and cotton swab. Left : A separated type of double-guarded uterine cytology brush and cotton swab (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany). Middle : The tip of separated type of double-guarded uterine cytology brush and cotton swab. Right : A combined type of double-guarded uterine cytology brush and cotton swab (Har-Vet™, U.S.A).



Fig. 0-4. Sampling of uterine cytology and bacteriology. Top : Scrubbing and sterilization of the vulva and perineal region before sampling. Center :

Introducing the brush into the uterus to obtain the samples from heavy draft horse. Bottom : After obtained the samples from uterus.

第 1 章

重種馬における交配後のオキシトシン及び プロスタグランディン F_{2α} 投与と多形核好中球(PMNs)数の 関係について

1. 緒言

交配誘導性子宮内膜炎は、馬における不受胎の主要因である。子宮平滑筋収縮能の低下は、子宮クリアランス能の低下を引き起こす。馬の胚は排卵後 5-6 日で子宮内へ下降するため、馬が受胎するためには交配後 5 日以内に子宮内膜の炎症を取り除く必要がある [12, 78]。交配後の子宮内膜に起こる炎症は、子宮内から余剰精液や不純物、貯留物を排泄させるために必要な生理反応であり、一般的に交配後 24-48 時間以内に子宮内膜の炎症は治まると考えられている [63, 85, 86]。

日本の重種馬は、体重 1000kg にもなり世界で最も大きな品種の馬であり、ペルシュロン種、ブルトン種、ベルジアン種の混血からなる [42]。近年農業の機械化に伴い、物資の運搬や農耕への従事など重種馬の活動する機会が減少した。その結果、子宮の収縮能低下や後産停滞のリスク上昇につながると考えられている [33]。子宮クリアランス能の低下や遅れから交配後子宮内膜の炎症が持続することで、不受胎につながる [39, 52]。交配後 48 時間以上、子宮内膜の炎症が排除されない場合、持続的な感染または交配誘導性子宮内膜炎を発症していると考えられている [8, 51]。

軽種馬と比較して、重種馬では後産停滞や難産の発生率が高い傾向にあり、分娩後の繁殖成績悪化や受胎率低下につながると考えられている [33, 72]。加えて、重種馬は大型動物であるゆえに、出生仔馬も大型であり出生時体重が重いいため死産率も高い傾向にある [45]。さらに、輓馬の精液は他の品種と比較して、運動性が弱く形態学的に奇形率が高い傾向にある [4]。

近年、生産者の高齢化や重種馬の活躍する機会が全国的には祭事等に限られており、日本における重種馬生産頭数は減少傾向にあるが、我が国には、ばんえい競馬と言われる世界で唯一、重種馬のみのレースがある。この貴重なレースや日本独自の文化を維持するために、重種馬の繁殖成績向上が必要である。

多形核好中球 (PMN) 数は、子宮内膜炎を診断する指標の一つである。PMN は白血球の一種であり、細菌などの病原体や炎症に対する免疫機構に関係している [29]。細菌や精子などの子宮内侵入が引き金となり、子宮内膜表面に PMNs が動員される。この反応により、子宮内から病原体や起炎物質が取り除かれる。一般的に、馬の子宮内膜細胞診は以下のように分類されている。正常 (0-rare PMNs/hpf)、軽度炎症 (1-2 PMNs/hpf)、中等度炎症 (3-5PMNs/hpf)、重

度炎症 (>5 PMNs/hpf) [23]。また、交配後 12 時間以上子宮内貯留が残存する場合も、交配誘導性子宮内膜炎に罹患していると考えられている [13, 73, 84]。

ダブルガードのサイトブラシは、野外の臨床現場において簡便かつ十分量の細胞を子宮内膜から採取することが可能である [15, 62]。子宮内膜からの細胞採取には、コットンスワブ、サイトブラシ、少量の子宮還流液の3通りの手法がある。このうち、サイトブラシは子宮内膜炎を診断する上で一貫して最適な量の細胞を採取することができる [7]。

軽種馬において、子宮クリアランス能を高めるためにオキシトシン (OT) が一般的に使用されている。OTに加えて、プロスタグランジン F_{2α} (PG) も子宮収縮を助長するために使用されるが、PGにおいては、黄体退行作用も有している [43, 61]。そのため、排卵前後の PG 投与は子宮収縮能と黄体退行作用の観点から様々な見解がある。重種馬において、子宮収縮作用目的の PG 投与は過去に報告がなく、また子宮内膜の PMNs に関する研究も報告されていない。重種馬における、OT や PG といった陣痛促進剤と子宮内膜 PMNs との関連も未だ知られていない。

第 1 章では、子宮収縮能の向上と炎症細胞の関係を調査する目的として、重種馬における OT 及び PG 投与が子宮内膜 PMNs に及ぼす影響を比較検討した。

2. 材料及び方法

2.1. 供試馬と処置

北海道足寄町にて管理されている重種繁殖牝馬 47 頭 54 発情 (年齢 3~19 歳) を用いて、ランダムに CON (無処置群, n=18), PG (ジノプロスト投与群, n=18), OT (オキシトシン投与群, n=18) の 3 群を作出した。各群における年齢の中央値は、CON : 10 歳, PG : 7 歳, OT : 7 歳であった。各群における、空胎馬 : 未経産馬 : 分娩馬 : 流産馬等の頭数は、それぞれ、CON; 9 : 2 : 4 : 3, PG; 6 : 3 : 5 : 4, OT; 4 : 3 : 9 : 2, であった。

健康な牝馬の繁殖期間中、交配前から排卵後 2 日まで毎日または一日おきに経直腸超音波検査を実施し、交配後排卵確認時を Day 0 とした。交配は、全て排卵前に行い自然交配とした。ダブルガードサイトブラシ (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) を用いて、47 頭 54 発情 (47 発情は 1 周期のみ, 7 発情は 2 周期より採材) より計 162 検体 (交配前 [Pre], 排卵確認時 [Day 0], 排卵

後 2 日 [Day 2], 各 54 検体ずつ) の子宮内膜細胞を採取した。PG 群に対しては排卵確認時にジノプロスト (Panacelan-Hi®, Fujita Pharmaceutical Ltd., Tokyo, Japan) 5mg を一回筋肉内注射した。また, OT 群に対しては, 排卵確認時から 12 時間間隔, 動物用オキシトシン (Oxytocin for animal use, DS Pharma Animal Health Co., Ltd., Osaka, Japan) 20 単位ずつ計 3 回, 筋肉内注射を行った。CON 群に対しては, 薬剤投与は行わず排卵確認のみ実施した。受胎の確認は, 排卵後 14 日目及び 28 日目に胚ならびに黄体数の確認を行った。

本研究は臨床研究として, 十勝農業共済組合の動物倫理に基づき診療依頼者よりインフォームドコンセントを得た上で, 診療業務の一環として行われた。

2.2. 細胞診及び子宮内貯留

細胞診サンプルは, ダブルガードの子宮サイトブラシを用いて, 全 54 発情より 1 発情につき 3 回 (Pre, Day 0, Day 2), 計 162 検体を採材した。衛生的な細胞診を実施するために, 繁殖牝馬の外陰部をスクラブ及び洗浄消毒を行ったのちに, 滅菌した直腸検査用手袋もしくは手術用手袋を着用し, ダブルガードサイトブラシを子宮内へ挿入した。10 秒から 15 秒程, 子宮内でブラシを回転させたのちブラシを取り出し, スライドグラスへ塗抹した。塗抹標本は, 簡易迅速染色液 (Diff-Quik®, Sysmex Co., Hyogo, Japan) を用いて染色した。スライドグラス乾燥後, 光学顕微鏡を用いて PMNs の数をカウントした (Fig. 1-4)。PMNs は, 400 倍 10 視野中の平均細胞数を記録した。

Day 0 及び Day 2 において, 過去の文献を参考に子宮内貯留液 (IUF) の量を以下のように分類し記録した。Grade 1 (G1): 子宮内の貯留液及びエコージェニックライン無し, Grade 2 (G2): 少量の貯留液 (5 mm 未満) を認める, Grade 3 (G3): 明らかな貯留液 (5 mm 以上) を認める [13]。

2.3. 血清プロジェステロン値測定

Day 0-2, 9, 14, 28 において, 真空採血管 (Venoject II VP-P070K, テルモ(株), 東京), および採血針 (20 G × 1 1/2" needle NN-2038R, テルモ(株), 東京) を用いて頸静脈より採血を実施した。採取した血液を遠心分離し, 血清を採取した。採取した血清は, ホルモン測定までの間凍結保存した後に EIA analyzer

(AIA-360, Tosoh Co., Tokyo, Japan) を用いて、血清中プロゲステロン値を測定した。

2.4. 統計処理

各群 (CON, PG, OT) における PMNs の中央値、交配から排卵までの日数の中央値、年齢、一発情中の交配回数を、クラスカル-ウォリス検定 (ボンフェローニ補正) により比較した。各採材時 (Pre, Day 0, Day 2) における PMNs の中央値は、フリードマン検定 (ボンフェローニ補正) により比較した。各群の妊娠馬における血清プロゲステロン値は、クラスカル-ウォリス検定 (ボンフェローニ補正) を用いて比較した。各群における Day 0 から Day 2 にかけての子宮内貯留 Grade 減少率、および 28 日受胎率をフィッシャーの正確確率検定 (ボンフェローニ補正) により比較した。全ての検定は、EZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan), を用いて統計処理を行った [35]。危険率 5%未満を有意差ありとした。

3. 結果

各群における Pre から Day 0 にかけての PMN 数の中央値は有意に上昇した (Pre : Day 0, CON; 0.90 : 3.55, $P=0.0014$, PG; 1.20 : 8.45, $P=0.0046$, OT; 0.70 : 1.70, $P=0.0073$, Fig. 1-1)。PG 群のみ、PMN 数が Day 0 から Day 2 にかけて、有意に減少した (Day 0 : Day 2, PG; 8.45 : 0.85, $P=0.0073$)。

各群の採材時における PMN 数について、有意差は見られなかった (CON, PG, OT; Pre : 0.90, 1.20, 0.70; Day 0 : 3.55, 8.45, 1.70; Day 2 : 1.70, 0.85, 1.00; Fig. 1-2)。

各群における年齢の中央値について、有意差は見られなかった。

Day 0 における子宮内貯留液およびエコージェニックラインの出現率は、それぞれ以下の通りであった (CON; 10/18, PG; 14/18, OT; 11/18)。各群における Day 0 から Day 2 にかけての子宮内貯留減少率は、CON; 5/10, PG; 10/14, OT; 8/11, であり、群間で有意差は見られなかった。

Day 0 及び Day 2 における子宮内貯留 Grade2 (G2) であった牝馬の頭数はそれぞれ以下の通りであった (Day 0, CON : PG : OT ; 4 : 5 : 8, Day 2, 5 : 3 : 4)。また、Grade3 (G3) の頭数については、それぞれ (Day 0, CON : PG : OT ; 6 :

9 : 3, Day 2, 4 : 3 : 2)であった (Table 1-1)。Day 2 における G2 および G3 の牝馬について、PMNs の中央値は、それぞれ、CON : 1.30, PG : 1.00, OT : 3.80, であった。

交配から排卵までの日数の平均値および中央値は、それぞれ以下の通りであり (平均値[SD] : 中央値, CON ; 1.83[0.92] : 2, PG ; 1.56[0.92] : 1, OT ; 1.94[0.87] : 2), 中央値における有意差は見られなかった。

1 発情中交配回数の平均値および中央値は、それぞれ以下の通りであり (平均値[SD] : 中央値, CON ; 1.50[0.78] : 1, PG ; 1.66[0.68] : 2, OT ; 1.50[0.70] : 1), 中央値における有意差は見られなかった。

各群における 28 日受胎率は、CON (12/18), PG (14/18), OT (10/18) であり、有意差は見られなかった。また、妊娠鑑定時に複数黄体が観察された牝馬の割合は、CON (5/12), PG (5/14), OT (5/10) であった。

妊娠馬における血清プロジェステロン値について、Day 0 から Day 14 までは各群における有意差は見られなかったが、Day 28 においては、OT が他の 2 群よりも有意に高かった (Fig. 1-3)。

4. 考察

ジノプロストは天然型 PG 製剤であり、黄体退行作用に加えて子宮平滑筋の収縮も助長する。本研究の目的は、重種馬におけるジノプロスト (PGF_{2α}) 及びオキシトシン投与と子宮内 PMNs への影響を検討することである。

交配後一過性に起こる子宮内膜の炎症は生理的反応の一種である [16, 85]。交配により子宮内膜の炎症が引き起こされ、子宮クリアランス能が助長される [47]。本研究において、交配後の Day 0 では、Pre と比較して全ての群で PMN の有意な上昇を示し、子宮内膜の一過性の炎症が観察された。

Day 0 において、PG 群では他の群よりも PMN が高い値を示した。この点については、PG 群における交配後排卵までの日数が平均 1.56 日であり、他の群よりも短かったことが考えられる。しかし、全ての群を比較した場合においても、交配後排卵までの日数に有意差は見られなかった。

Day 0 から Day 2 にかけて、全ての群において PMN の減少が観察されたが、群間での有意差は見られなかった。一方で、PG 群のみ Day 0 から Day 2 にかけて有意な PMN の減少が見られた。子宮収縮運動は、子宮内からの貯留液や有

害な炎症産物の排出に必要不可欠な運動である [79]。排卵時の子宮内貯留液は不受胎の原因となり得る [5, 55, 66]。交配後 6-36 時間以上経過したのちも、高さ 2 cm 以上の子宮内貯留液が存在する場合、交配誘導性子宮内膜炎の指標となる [9, 11, 48, 77]。本研究において、薬剤投与前にあたる Day 0 における各群の子宮内貯留 Grade2 及び Grade3 の割合は、それぞれ、CON; 55.6% (10/18), PG; 77.8% (14/18), OT; 61.1% (11/18) であった。このことは、日本の重種馬において 64.8% (35/54) の牝馬では交配後 12 時間以上経ても、子宮内の炎症が持続していることを示唆している。Day 0 から Day 2 にかけて、子宮内貯留の減少が見られた割合は、それぞれ、CON; 50% (5/10), PG; 71.4% (10/14), OT; 72.7% (8/11) であり、各群における子宮内貯留液の減少率に有意差は見られなかった。つまり、PG 群および OT 群においては、約 70% の牝馬で子宮内貯留液の減少が見られた一方で、CON 群では 50% のみであった。また、Day 0 における G3 を示した牝馬の頭数は、PG 群で 9 頭、OT 群で 3 頭であった。Day 2 における G3 の頭数は、PG 群で 3 頭、OT 群で 2 頭であった。子宮内貯留 Grade の改善率は、PG 群で 66.7% (6/9), OT 群で 33.3% (1/3) であり、加えて、Day 2 における G2 および G3 を示した牝馬の PMN の中央値は、CON 群で 1.30, PG 群で 1.00, OT 群で 3.80 であった。この結果は、子宮内貯留 Grade の改善において、PG の方が OT よりも効果的であったことを示唆している。また、PG 群のみ Day 0 から Day 2 にかけて有意な PMN の減少が見られたことから、PG の方が OT よりも効果的に子宮内炎症細胞を減少させる可能性を示している。これらのことから、ジノプロストの投与は子宮内から余剰産物を効果的に排除し、子宮内炎症を減少させることを表している。

OT や PG などの陣痛促進剤はどちらも、子宮平滑筋の収縮を促し子宮内の貯留液や有害物質の排出を促し子宮クリアランス能を助長するが、PG と OT の子宮収縮作用の比較において、OT の平滑筋収縮作用時間はおよそ 30 分であるのに対し、PG の作用時間は約 5 時間と長い [49, 75, 76, 84]。

PG は、黄体遺残の治療にも用いられる。一般的に、黄体期の牝馬に 5-10 mg のジノプロストを単回投与することで、2-5 日以内に発情を誘発することができる [16]。軽種馬においては、一般的に発情誘起処置として 250-500 μ g のクロプロステノール単回投与、交配誘導性子宮内膜炎に対する処置としては 250 μ g のクロプロステノールが使用されている [17, 58]。日本の重種馬臨床繁殖現場では、発情

誘起の目的で 10 mg のジノプロスト単回投与が行われている。本研究におけるジノプロスト投与量は、発情誘起の半量投与が用いられた。

排卵後の PG による処置には、様々な報告がある。ある研究では排卵後の PG 投与により受胎率が低下したとの報告がある一方で、別の研究では排卵後の PG 投与を実施した場合でも受胎率が低下しなかったと述べている [61, 74]。本研究において、各群の受胎率は、それぞれ、CON; 66.7%, PG; 77.8%, OT; 55.6%であり、排卵後 PG 投与による受胎率低下は見られなかった。また、有意差は見られなかったものの、PG 群が最も高い受胎率を示した。血清中プロゲステロン値については、Day 0 から Day 14 までの間、各群における有意差は確認されなかった。Day 28 日において、OT 群の血清プロゲステロン値が、PG 群および CON 群よりも有意に高い結果を示した。黄体期の OT 投与は、黄体退行を阻害すると言われている [81]。本研究における OT 投与は、Day 0 および Day 1 であったが、Day 28 にある牝馬では複数の黄体が観察された。

軽種馬において、複数排卵の率は、20.7%から 35.6%と報告されている [20]。一方、本研究では、Day 28 における複数黄体が観察された牝馬の割合は、それぞれ、CON; 41.6%, PG; 35.7%, OT; 50%であり、OT 群における複数黄体が観察された割合は、軽種馬の既報よりも比較的高い割合を示した。このことから、OT 群における Day 28 での高いプロゲステロン値は、複数黄体の割合が他群と比較して高かったためであると考えられる。

一般的に、妊娠初期における血清プロゲステロン値は、4 ng/ml 以上あれば基準範囲内であり妊娠維持に十分な値である [41, 54]。本研究について、妊娠馬における Day 28 の血清プロゲステロン中央値は、全ての群において 6 ng/ml 以上を示した。よって、本研究における妊娠馬は、全ての群において妊娠維持に十分なプロゲステロンを産生していたことが示された。

以上の結果、日本の重種馬においてジノプロストを発情誘起の半量、排卵時に投与することにより、受胎率に影響を及ぼさずに子宮内の PMNs を減少させることが示唆された。

5. 小括

第 1 章では、重種馬における交配後のオキシトシンおよびプロスタグランジン $F2_{\alpha}$ の投与が子宮内環境に及ぼす影響を調査した。その結果、天然型プロスタグ

ランディン F2_aであるジノプロスト投与は、オキシトシン投与や処置をしない場合よりも効果的に子宮内の多形核好中球を減少させることができ、重種馬における交配誘導性子宮内膜炎予防に有用であることが示唆された。

6. 図表

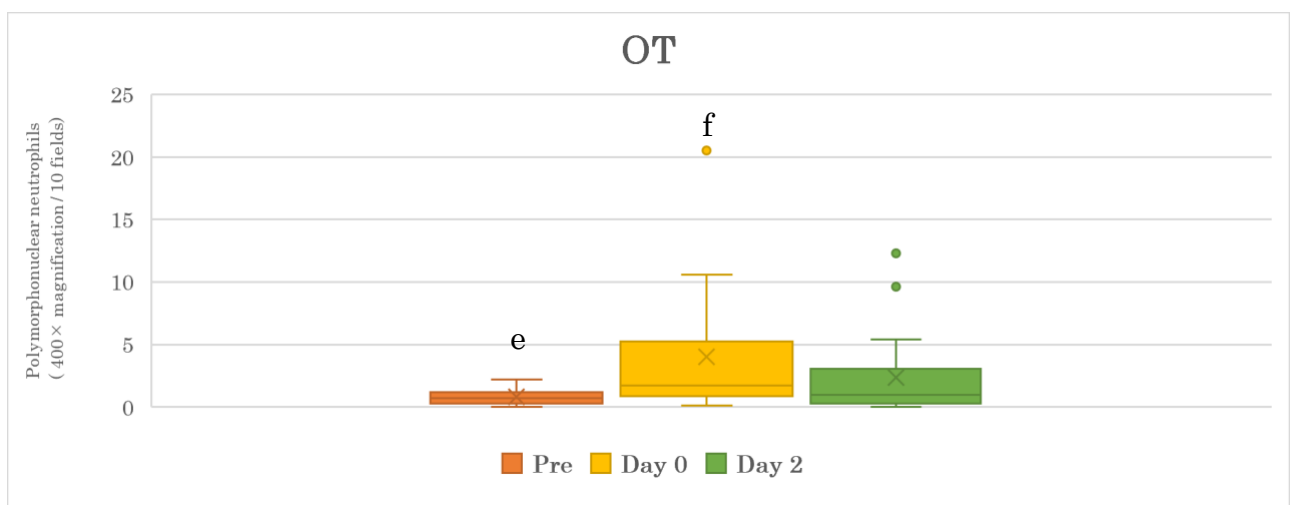
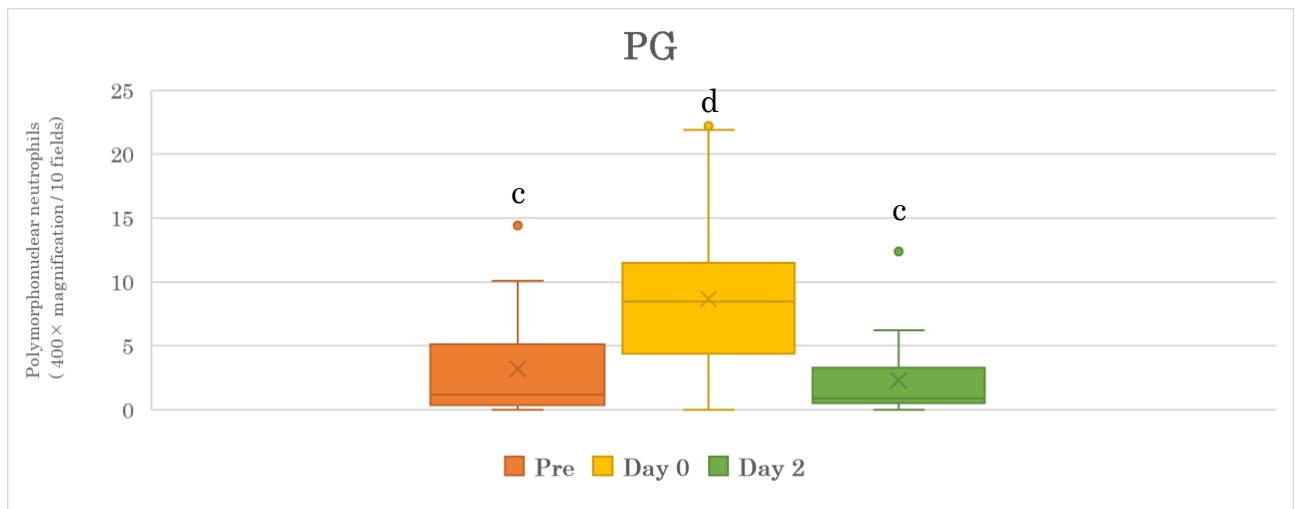
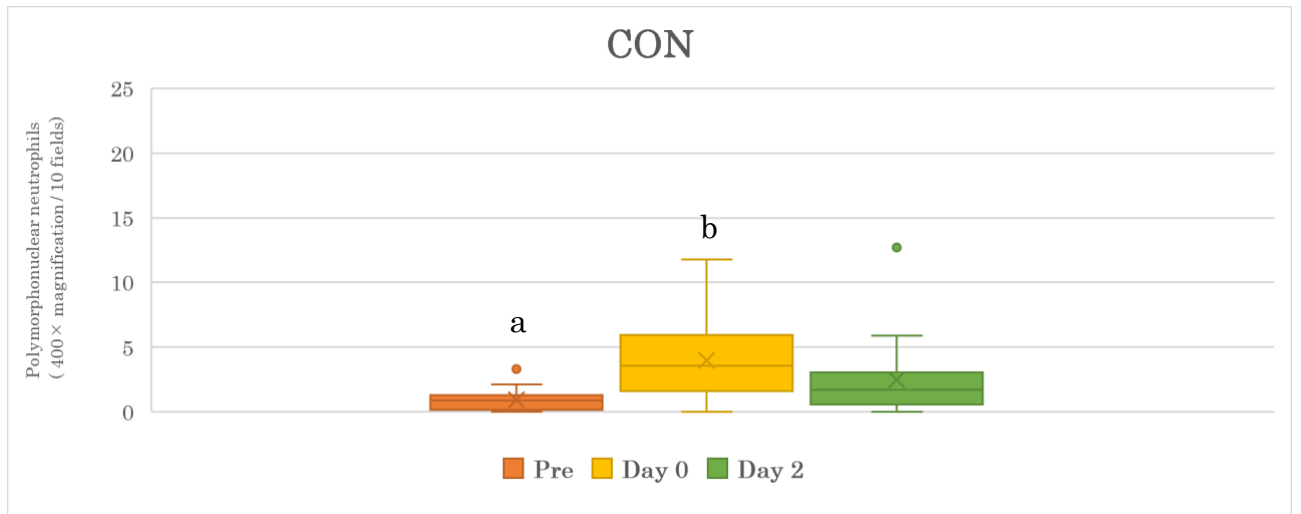


Fig. 1-1. Median numbers of the polymorphonuclear neutrophils (PMNs) of the groups. The dots above the bars shows outliers. Different letters above the bars of each graph indicate significant differences. $P < 0.01$.

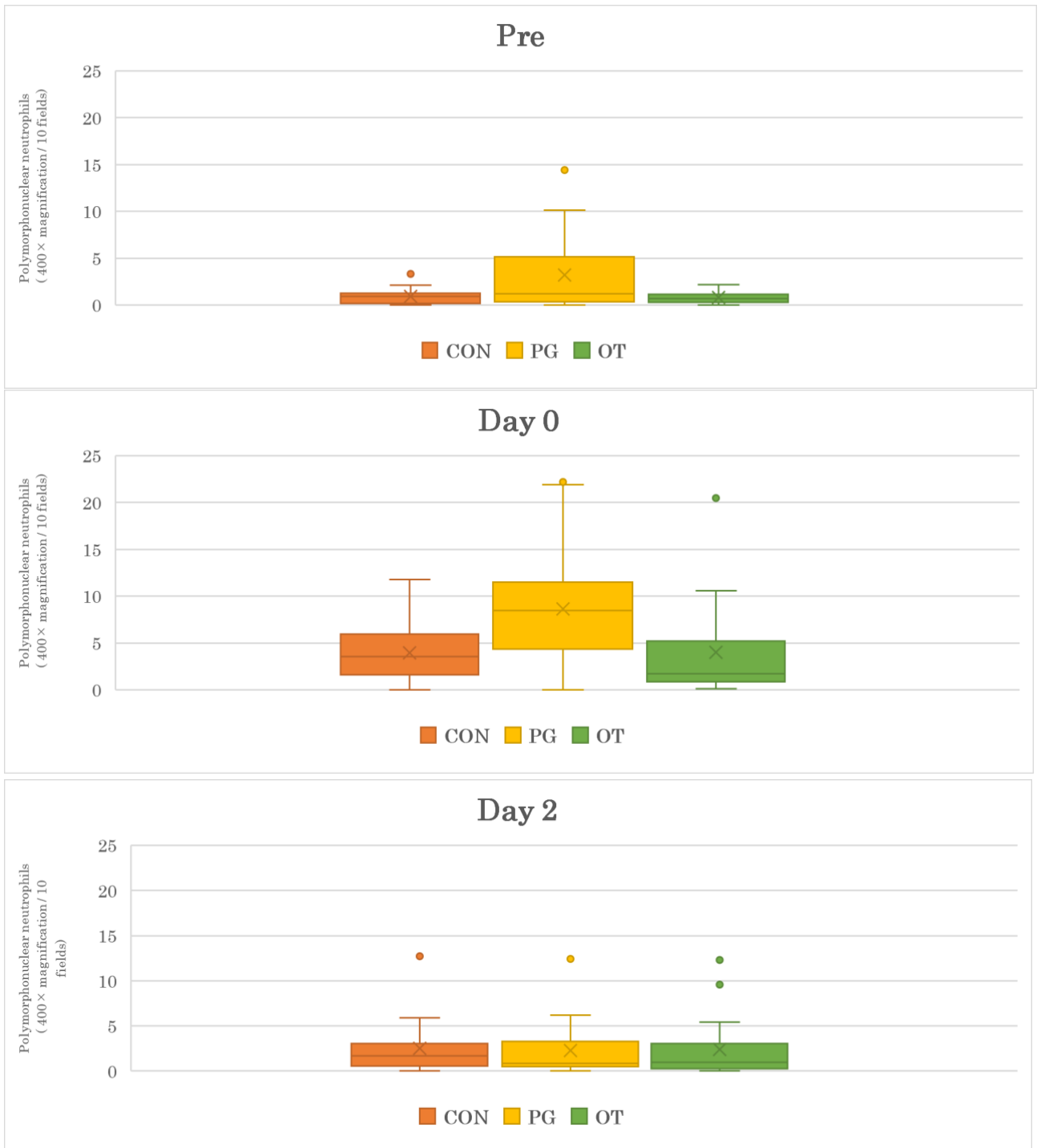


Fig. 1-2. Median numbers of the polymorphonuclear neutrophils (PMNs) at each time point for all three groups. The dots above the bars shows outliers. There were no significant differences observed at any time point among the three groups.

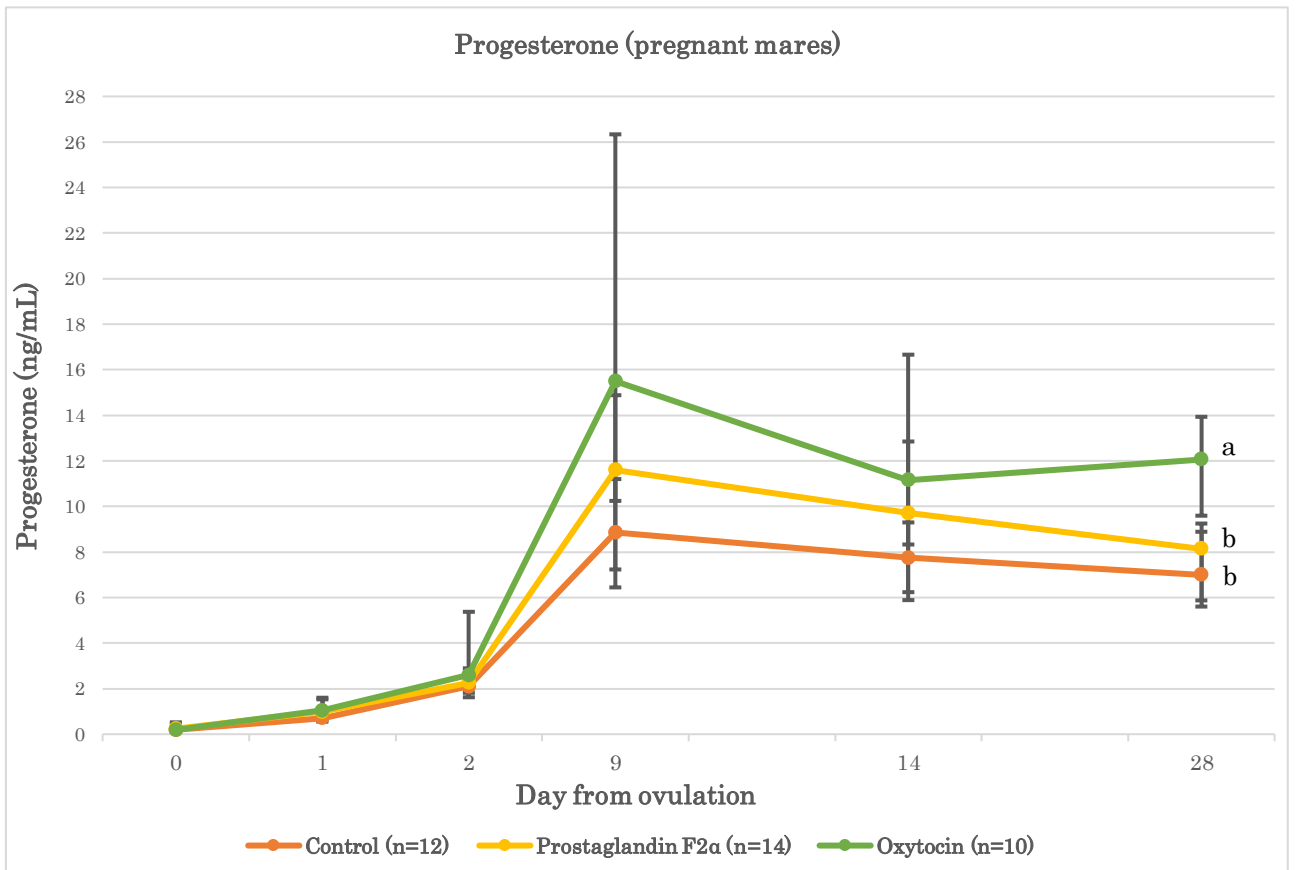


Fig. 1-3. Median values and 25th and 75th percentiles of plasma progesterone concentrations in pregnant mares. Different letters beside the plots for each group represent significant differences. $P < 0.01$.

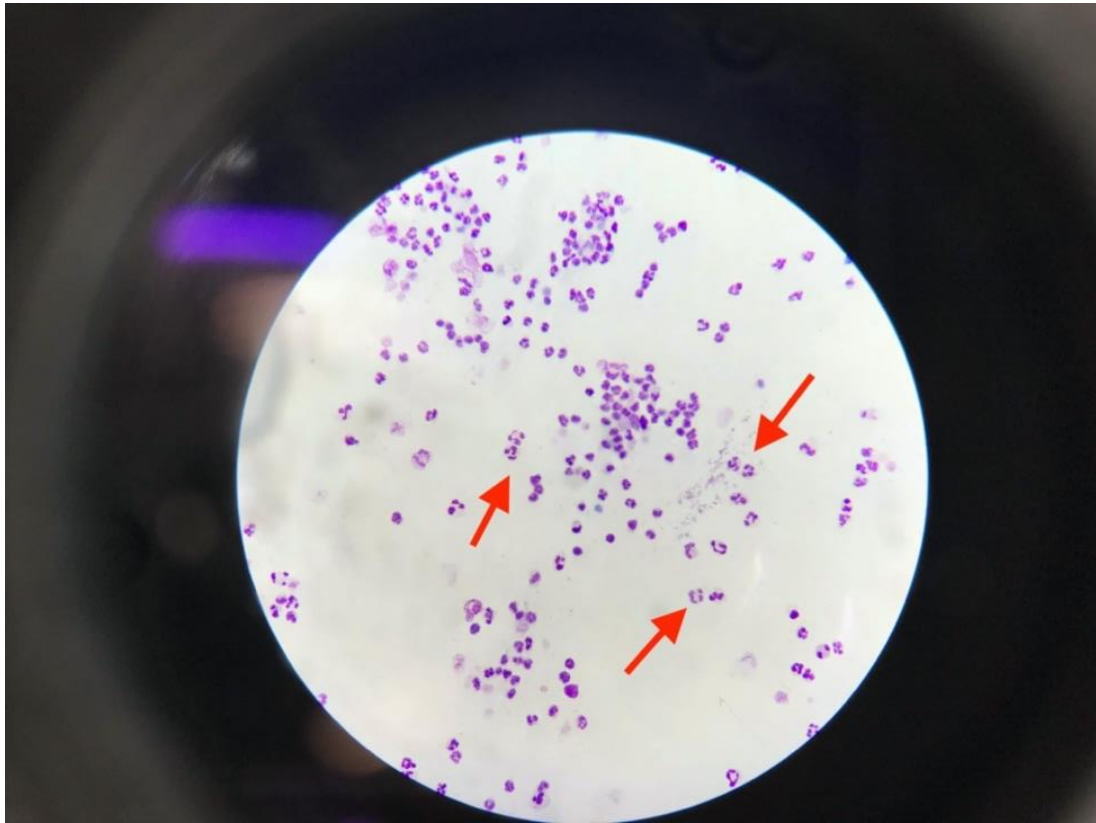


Fig. 1-4. The presence of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) examined by light microscopy. The PMNs can be seen (red arrows).

Table 1-1

The grade of intrauterine fluids (IUF) or echogenic lines at Day 0 and Day 2.

IUF grade	CON (n=18)	PG (n=18)	OT (n=18)
Day 0	10 (G2 : 4, G3 : 6)	14 (G2 : 5, G3 : 9)	11 (G2 : 8, G3 : 3)
Day 2	9 (G2 : 5, G3 : 4)	6 (G2 : 3, G3 : 3)	6 (G2 : 4, G3 : 2)

Grade 2 (G2) : small amounts of fluids (<5 mm in diameter) or echogenic line. Grade 3(G3) : obvious intrauterine fluids (\geq 5 mm in diameter).

第 2 章

重種馬における子宮内細菌検査と

薬剤注入の関係について

1. 緒言

子宮は本来、外陰部や膣前庭、膣、そして子宮頸管の解剖学的構造により、外部からの異物侵入を防いでいる。交配や分娩等により子宮の防御機構が崩され、空気、精液、尿、細菌、真菌等の異物が子宮内に侵入することで、子宮内膜の炎症が引き起こされる [8, 87]。

子宮内膜炎は、馬における不受胎および妊娠 35 日未満の早期胚死滅の主要因と考えられており、一般的に好気性細菌が原因となることが多い [69]。子宮スワブによる細菌検査は、子宮内膜炎の診断に用いられる検査の一つである。牝馬の子宮内細菌において、*Escherichia coli* (*E. coli*)、および、*β-streptococci* は、子宮内膜炎起因菌として頻繁に検出され、不受胎や早期胚死滅の原因となり得る [1, 22, 83, 25]。

子宮内膜炎の治療は、抗生物質を用いた処置がしばしば行われる。抗生物質の選択は、細菌検査および薬剤感受性の結果をもとに行うのが基本となる。臨床現場では、牝馬の発情期間中や排卵前後の短い間での治療を行うために、迅速な子宮内の細菌学的診断が求められる。しかしながら、細菌培養検査には数日間を要するため、日々の臨床現場では発情期間中に全ての症例において検査結果を得るのは困難であるため、治療を先行せざるを得ない場合がある。このため、子宮内薬剤注入のための抗生物質の選択は、しばしば、経験的なデータをもとにする場合や、過去の文献等を参考に想定される原因菌を十分にカバーできる抗生剤の選択が必要となる。

子宮内薬剤注入は、細菌感染が疑われる子宮内膜炎において行われる治療法の一つである。使用する薬剤は、β-ラクタム系のペニシリン (PCG)、アンピシリン (ABPC)、セファゾリン (CEZ)、アミノグリコシド系のカナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM) や、ニューキノロン系のエンロフロキサシン (ERFX) 等、様々な薬剤がある。子宮内細菌の種類や検出率は、時期や馬の個体群等により様々である。重種馬における子宮内細菌検査については、過去のデータも少なく、抗生剤の選択に悩まされることがある。軽種馬においては、子宮内細菌検査や薬剤感受性の結果が様々報告されている [22, 65, 25]。しかし、重種馬におけるこれらの報告は見当たらない。

第 2 章では、重種馬における子宮内環境、特に細菌検査および薬剤感受性結果を調査することを目的として、CEZ, KM, CEZ+KM, ERFX の子宮内薬剤注入が細菌検出割合に及ぼす影響を調査した。

2. 材料及び方法

2.1. 供試馬と処置

2018年から2021年の4年間、重種繁殖牝馬107頭128発情（年齢3～19歳）を用いて、ランダムに抗生剤注入群（IUI, n=64）および抗生剤非注入群（CON, n=64）の2群を作出した。

健康な牝馬の繁殖期間中、交配前から排卵後2日まで毎日または一日おきに経直腸超音波検査を実施した。交配後排卵確認時をDay 0とし、Day 0においてIUI群では、各種子宮内薬剤注入を行い、CON群では、排卵確認もしくは動物用生理食塩水（Normal saline solution for animal, Nippon zenyaku kogyo Co., Ltd., Fukushima, Japan）のみの子宮内注入を行った。

子宮内へ使用した薬剤は、CEZ（セファゾリン注 [Cefazolin injection, Fujita Pharmaceutical Ltd., Tokyo, Japan]）、KM（硫酸カナマイシン [Kanamycin sulfate injection, Meiji Seika Pharma Co., Ltd., Tokyo, Japan]）、ERFX（エンロフロキサシン [Bytril® 10% injection, Elanco Co., Ltd., Tokyo, Japan]）を用いた。

IUI群では、CEZ 1 g 単独+生食計 100 ml、KM 1 g 単独+生食計 100 ml、ERFX 500 mg 単独+生食計 100 ml、CEZ+KM 併用+生食計 100 ml のいずれかの薬剤を用いて、子宮内薬剤注入を行った。CON群については、排卵確認もしくは生食 100 ml 注入を行った。

本研究は臨床研究として、十勝農業共済組合の動物倫理に基づき診療依頼者よりインフォームドコンセントを得た上で、診療業務の一環として行われた。

2.2. 採材方法

交配は、全て排卵前に行い自然交配とした。ダブルガードカルチャースワブ（Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany, or Har-Vet™, U.S.A）を用いて、107頭128発情より計384検体（交配前 [Pre]、排卵確認時 [Day 0]、排卵後2日 [Day 2]、各128検体ずつ）の子宮内細菌を採取した。

繁殖牝馬の外陰部をスクラブ及び洗浄消毒を行ったのちに、滅菌した直腸検査用手袋もしくは手術用手袋を着用し、ダブルガードカルチャースワブを子宮内へ挿入した。10秒から15秒程、子宮内でスワブを回転させたのちスワブを取り出し、直ちにAmies transport mediumへ保管した。

2.3. 細菌検査および薬剤感受性

細菌検査および薬剤感受性試験は、第一岸本臨床検査センターへ依頼した。検出された全菌種の中から、Pre および交配後である Day 0 における細菌非検出 (NG [negative culture of micro-organism]) の割合を調査した。また、薬剤注入後の Day 2 における *E. coli*, *E. coli* ESBL (+) および, *β-streptococcus* group C の検出割合および薬剤感受性を調査した。薬剤感受性試験については、以下の 9 種類を調査した (PCG, ABPC, CEZ, KM, GM, オキシテトラサイクリン [OTC], ERFX, マルボフロキサシン [MBFX], スルファメトキサゾールトリメプリーム製剤 [ST])。

2.4. 統計処理

各群の 28 日受胎率および Day 2 における, *E. coli*, *E. coli* ESBL (+), *β-streptococcus* group C の検出割合, Pre および Day 0 の各群における NG の割合, Pre および Day 0 における各群間の NG 割合について, χ^2 検定 (イエーツの連続性補正) により比較した。CEZ, KM, CEZ+KM, および ERFX の Day 2 における, *E. coli*, *E. coli* ESBL (+) および, *β-streptococcus* group C の検出割合について, フィッシャーの正確確率検定 (ボンフェローニ補正) により比較した。全ての検定は, EZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan), を用いて統計処理を行った [35]。危険率 5%未満を有意差ありとした。

3. 結果

全 384 検体の子宮スワブから, 30 種類の微生物が検出された (Table 2-1)。Pre および Day 0 における NG の割合は, それぞれ, Pre, CON : IUI; 20/64 : 11/64, Day 0, 3/64 : 3/64, であり, Pre および Day 0 における群間での有意差は見られなかった。Pre から Day 0 にかけて, NG の割合はそれぞれ, (CON, Pre : Day 0, [*P*-value]; 20/64 : 3/64, [*P*=0.00023], IUI, 11/64 : 3/64, [*P*=0.047]) であり, 両群ともに Pre から Day 0 にかけて, NG の割合が有意に減少した (Table 2-2)。

CON 群および IUI 群における 28 日受胎率は, CON (41/64), IUI (39/64) であり, 有意差は見られなかった。

Day 0 および Day 2 における *E. coli*, *E. coli* ESBL (+), *β-streptococcus* group C の検出割合は、それぞれ、Day 0, CON : IUI; 42/64 : 31/64, Day 2, 38/64 : 22/64 であった。Day 0 における *E. coli*, *E. coli* ESBL (+) および, *β-streptococcus* group C の検出割合ついて、群間に有意差はなかった。Day 2 における, *E. coli*, *E. coli* ESBL (+) および, *β-streptococcus* group C の検出割合については、CON (38/64) と比較して IUI (22/64) の方が上記 3 菌種の検出割合が有意に低下した ($P=0.0078$, Table 2-3)。

CEZ, KM, CEZ+KM, ERFX の各薬剤について、Day 2 における, *E. coli*, *E. coli* ESBL (+) および, *β-streptococcus* group C の検出割合は、それぞれ、CEZ (9/16), KM (3/10), CEZ+KM (5/25), ERFX (7/13) であり、各薬剤に有意差は見られなかった。

Table 2-4 に *E. coli*, *E. coli* ESBL (+) および, *β-streptococcus* group C の薬剤感受性結果を示した。*E. coli* については、PCG を除く全ての薬剤に感受性を示したが、*E. coli* ESBL (+) は多剤耐性を示し、ABPC および CEZ は無効であり、さらに ERFX や MBFX といったニューキノロン系抗生物質にも低い感受性を示す結果となった。*β-streptococcus* group C については、アミノグリコシド系抗生物質 (KM および GM) が無効であったが、ST 合剤については 64.1%、他の薬剤に関しては感受性を示した。

4. 考察

本研究では、重種馬における子宮内細菌検査および子宮内薬剤注入の効果について調査した。その結果、交配前である Pre の NG 割合は全体として 24.2% であった。軽種馬における子宮内膜 biopsy や子宮内 swab からの細菌検査においては、NG 割合が 36.5%-51.3% [1, 67] との報告があり、重種馬では、NG 割合が低い結果となった。自然交配による同一種牡馬の交配回数の増加、人工授精における 1 発情中の複数回交配などは、受胎率低下や交配誘導性子宮内膜炎の原因となり得る [44, 50]。重種馬では、1 発情中に複数回交配することがしばしばあり、CON 群および IUI 群併せて、Day 0 では 95% の検体である種の菌が検出されていることから、交配により一時的に子宮内へ細菌が持ち込まれる可能性が考えられた。

E. coli および *Streptococcus equi* Subspecies *zooepidemicus* に代表される *β-streptococcus* group C は、馬における子宮内細菌検査において検出頻度が高い菌種である [35, 37]。本調査では、Day 2 における *E. coli*, *E. coli* ESBL (+) および, *β-streptococcus* group C の検出割合は、IUI 群の方が CON 群よりも有意に低い結果となった。このことから、子宮内薬剤注入は *E. coli*, および *β-streptococci* による子宮内膜炎治療に効果的であると考えられた。しかし、各群において、受胎率に有意差がなかったことや、CEZ, KM, CEZ+KM, ERFX の各種薬剤使用後である Day 2 において *E. coli*, および, *β-streptococcus* group C の検出割合に有意差がなかったことから、使用する薬剤についてのさらなる調査が必要である。

近年、馬の子宮内膜炎治療において白血球を含んだ血漿やラクトフェリンなどの抗生剤以外の注入により、受胎率の向上や子宮内貯留液の減少がみられたとの報告がある [16, 50, 76]。本調査において、CON 群と IUI 群の間で受胎率に差が見られなかったことや、CEZ, KM, CEZ+KM, ERFX の各種薬剤について、Day 2 における *E. coli*, *E. coli* ESBL (+) および, *β-streptococcus* group C の検出割合に有意差が見られなかったことから、重種馬においても、抗生物質治療以外の Non-traditional な治療も今後の検討課題であると考えられた。

薬剤感受性試験について、*E. coli* ESBL (+) に対して CEZ は感受性がなく、*β-streptococcus* group C に対してアミノグリコシド系は無効であった。ESBL は、ペニシリン系や第 1 世代および第 2 世代セフェム系薬を分解していた β -ラクタマーゼが基質特異性を広げた酵素であり、セフトオフル等の第 3 世代から第 4 世代までのセフェム系薬をも分解する能力を獲得した酵素である。セフェム系の使用歴、特に第 2 世代から第 4 世代までのセフェム系抗菌薬の使用が ESBL 産生菌の検出率を高めるリスク因子となることや、近年フルオロキノロン耐性菌や ESBL による多剤耐性 *E. coli* の増加が懸念されている [53, 32]。

本研究において、Day 2 における *E. coli*, *E. coli* ESBL (+) および *β-streptococcus* group C の検出割合はそれぞれ、(CEZ : 56%, KM : 30%, CEZ+KM : 20%, ERFX : 53.8%) であった。このことから、子宮注入時の薬剤選択において、単剤使用よりも複数の抗生剤を併用する方が、治療効果が高まる可能性が示唆された。一方で、抗生物質使用にあたり、*E. coli* ESBL (+) をはじめと

した多剤耐性菌の出現を防ぐためにも、抗生剤の乱用に注意していく必要があると考えられた。

5. 小括

第2章では、重種馬における子宮内細菌の検出率および、CEZ, KM, CZ+KM, ERFX の各抗生物質投与による効果を調査した。その結果、子宮内膜炎の主要菌種である *E. coli*, *E. coli* ESBL (+) および, *β-streptococcus* group C の検出割合は、薬剤注入により有意に減少することがわかった。しかし、受胎率等に有意差が見られなかったことから、使用する薬剤の再検討や、薬剤投与回数、多剤耐性菌の検出割合等のさらなる調査が必要であると考えられた。

6. 図表

Table 2-1

Micro-organism isolated from uterine swab between 2018-2021.

Micro-organism
<i>Escherichia coli</i>
<i>Bacillus</i> sp
<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>β-streptococcus</i> group C
<i>Acinetobacter</i> sp
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>γ-streptococcus</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>α-streptococcus</i>
<i>Coagulase-negative staphylococcus</i> (CNS)
<i>Staphylococcus. Epidermidis</i>
<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>β-streptococcus</i> other group of A B C G
<i>Candida</i> sp
MSSA <i>β-lactamase</i> (-)
Yeast - like fungus
<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Moraxella</i> sp
<i>Escherichia coli</i> ESBL (+)
<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Corynebacterium</i> sp
<i>β-streptococcus</i> group G
<i>Enterococcus gallinarum</i>
<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Rhodococcus erythropolis</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Streptococcus uberis</i>
<i>Arthobacter polychromgenes</i>
<i>Klebsiella ozaenae</i>

Table 2-2

The rate of negative and positive culture of micro-organism at
Pre and Day 0.

	NG		positive culture of micro-organism		total
	CON (n=64)	IUI (n=64)	CON (n=64)	IUI (n=64)	
Pre	20***	11*	44	53	128
Day 0	3***	3*	61	61	128

NG : negative culture of micro-organism

CON : control group (non-antibiotic treatment)

IUI : Intra-uterine-infusion group

*Significant differences $P < 0.05$.

***Significant differences $P < 0.001$.

Table 2-3

The detection rate of *E. coli*, *E. coli* ESBL (+), *β-streptococcus* group C and NG or other micro-organisms at Day 0 and Day 2.

	Day 0		Day 2	
	CON (n=64)	IUI (n=64)	CON (n=64)	IUI (n=64)
<i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> ESBL (+), <i>β</i> -streptococcus group C	42	31**	38	22**
NG or Other	22	33	26	42
Total	64	64	64	64

NG : negative culture of micro-organism

CON : control group (non-antibiotic treatment)

IUI : Intra-uterine-infusion group

** Significant differences $P < 0.01$.

Table 2-4

Microbial susceptibility of *E. coli*, *E. coli* ESBL (+) and *β-streptococcus* group C isolated from uteri of Japanese heavy draft mares, 2018-2021.

sensitivity (%)	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> ESBL(+)	<i>β-streptococcus</i> group C
PCG	-	-	100
ABPC	100	0	100
CEZ	100	0	100
KM	100	100	0
GM	100	100	0
OTC	100	66.6	100
ERFX	100	16.6	100
MBFX	100	16.6	100
ST	100	0	64.1

PCG : Penicillin, ABPC : Ampicillin, CEZ : Cefazolin, KM : Kanamycin,
 GM : Gentamycin, OTC : Oxytetracycline, ERFX : Enrofloxacin,
 MBFX : Marbofloxacin, ST : Sulfamethoxazole / Trimethoprim.

総括

子宮内膜炎は、古くから馬における不受胎の主要因であると認識されている。子宮内膜炎を引き起こす要因は、分娩や人工授精、自然交配、気腫や尿腫の原因となる解剖学的な構造異常などが考えられる。異物が子宮内に侵入することで、子宮内膜の炎症が引き起こされる。炎症は、子宮内から余剰精液や不純物、貯留物を排泄させるために必要な生理反応であるが、交配後 24-48 時間以上子宮内膜の炎症が続くことは異常であると考えられている [87]。交配誘導性子宮内膜炎は、交配後に生じる子宮内膜の炎症を指すが、子宮平滑筋収縮能の低下、子宮クリアランス能の低下により炎症が長時間続く場合、不受胎につながる恐れがある。ダブルガードサイトブラシによる子宮内膜細胞診は、子宮内膜炎の診断に用いられる手法の一つである [46]。細菌性の子宮内膜炎は、一般的に好気性細菌が原因となることが多く、牝馬の子宮内細菌において *E. coli*, および *β-streptococci* は子宮内膜炎起因菌として頻繁に検出される。

軽種馬では、子宮内膜細胞診や細菌検査の報告は多数あるが [1, 7 15, 46, 65, 82], 重種馬におけるそれらの報告は見当たらない。そこで、本研究では重種馬における子宮内環境の調査として、以下 2 種類の研究を行った。

第 1 章では、交配後排卵確認時の天然型プロスタグランジン F_{2α} 製剤であるジノプロストまたはオキシトシンの投与が子宮内膜細胞診に与える影響を比較検討した。その結果、無処置群、ジノプロスト投与群、オキシトシン投与群、全ての群において、子宮内膜炎症の指標である PMN 数が交配前よりも交配後排卵確認時の方が有意に増加することがわかった。また、ジノプロスト投与群のみ、排卵確認時から排卵後 2 日にかけて、子宮内膜 PMN 数が有意に減少する結果となった。受胎率に関して有意差が見られなかったものの、ジノプロスト投与群が最も高い受胎率を示した。これらのことから、軽種馬と比較して、体重が重く子宮も大きな重種馬では、交配後のジノプロスト投与が子宮クリアランス能を向上させ、交配誘導性子宮内膜炎の予防に有効であることが示唆された。

第 2 章では、重種馬における子宮内細菌の検出率を調査し、セファゾリン (CEZ)、カナマイシン (KM)、CEZ+KM、エンロフロキサシン (ERFX) の子宮内薬剤注入が、*E. coli*, および *β-streptococcus* group C の検出割合に及ぼす影響を比較検討した。

その結果、全 384 検体の子宮スワブから 30 種類の微生物が検出され、交配前には細菌非検出 (NG) の割合が 24.2%であったのに対し、交配後排卵確認時に

は、ほぼ全ての牝馬（95%）である種の菌が検出される結果となった。また、抗生剤注入群（IUI）の方が、抗生剤非注入群と比較して、排卵後 2 日目の *E. coli*, および *β-streptococcus* group C の検出割合が有意に減少する結果となった。さらに、子宮内へ注入した薬剤の比較では、有意差がなかったものの CEZ および KM 併用投与が、最も *E. coli*, および *β-streptococcus* group C の検出割合が少なかった。これらのことから、重種馬において、交配により一時的に子宮内へ細菌が持ち込まれるものの、排卵確認時の抗生剤注入は、*E. coli*, および *β-streptococcus* group C の検出率を低下させ、交配に起因する感染性子宮内膜炎の治療に有効であることが示唆された。

以上の研究から、重種馬における排卵確認時のジノプロスト投与または、子宮内薬剤注入は、子宮内炎症細胞の減少やある種の子宮内細菌の検出率を低下させ、交配誘導性子宮内膜炎や感染性子宮内膜炎の予防および治療に効果的であることが示唆された。

謝 辭

本研究の遂行ならびに本論文の執筆にあたり、終始御懇篤なるご指導およびご鞭撻、そして御校閲を賜りました帯広畜産大学教授 南保泰雄博士に心から拝謝いたします。

また、本論文を御審査していただきました、帯広畜産大学教授 松井基純博士、佐々木基樹博士、松本高太郎博士に深甚なる謝意を表します。

本研究の推敲および執筆にあたり、貴重なご指導ご助言を賜りました、十勝農業協同組合連合会 齊藤哲獣医師、そして、本研究に欠かすことのできない研究の場を快くご提供してくださりました、大野信一氏、加藤信一氏、留田邦彦氏、並びに各牧場関係者の皆様、最後に臨床研究のサポートにご協力いただいた十勝農業共済組合の皆様に深謝申し上げます。

Abstract

Endometritis is a major cause of infertility in mares. Uterine contraction weakness results in a reduction of uterine clearance. For mares to conceive, uterine inflammation should be cleared within the first 5 days after breeding. Uterine inflammation after breeding is a normal physiological reaction that is necessary for the discharge of excess semen, debris, or accumulations from the uterus to protect the conceptus from harmful inflammatory products and maintain pregnancy. This inflammation generally resolves within 24–48 hr.

Japanese heavy draft horses are mixed breeds of Percheron, Breton, and Belgian draft horses. They weigh approximately 1,000 kg and are one of the largest breeds in the world. Breeding mares have less chance to work and lack of physical exercise because of the mechanization of agriculture. These factors subsequently cause uterine contraction weakness. Uterine fluid accumulation, resulting from a decrease or delay in uterine clearance, is associated with prolonged inflammation and infertility.

Draft horses have higher incidence rates of retained placenta and dystocia, which lead to lower pregnancy rates. In addition, a larger body is generally associated with a higher foal birth weight, which is believed to result in a higher mortality rate.

The polymorphonuclear neutrophil (PMN) count is one of the diagnostic indicators of uterine inflammation. The PMN is a type of white blood cell that is associated with the immune system against bacterial pathogens and inflammation. Once equine spermatozoa or bacteria enter the uterus, they trigger a chemotactic signal, and PMNs are recruited at the surface of the endometrium, which results in the removal of pathogens and the resolution of inflammation.

A double-guarded cytology brush and swab can help in the collection of a sufficient number of cells from the endometrium and pathogens, which is easily available for use in practical field conditions.

Oxytocin (OT) is widely used as a treatment for endometritis to enhance mechanical uterine clearance in light breed mares. In addition to OT, prostaglandin F_{2α} (PG) is used. Administration of PG and its effect on the uterus of the heavy draft horses has not been previously reported, and no studies have been published regarding the uterine PMNs in heavy draft

horses. The effect of ecbolics (OT and PG) on uterine PMN counts is also unknown in these horses.

The objective of this study was to examine the uterine cytology and bacteriology in the Japanese heavy draft horses.

In the first section, the effect of prostaglandin F_{2α} (dinoprost) and oxytocin administration on uterine cytology were studied. To compare polymorphonuclear neutrophil (PMN) counts in the endometrium, a total of 162 samples were collected from 54 estruses of 47 mares (before ovulation [Pre], Day 0, and Day 2) using a double-guarded cytology brush. Then, the cytology brush was smeared on a glass slide. The slide was stained using a simple and quick staining solution. After air dried, the slide was examined by a light microscopy (400× magnification) for the presence of PMNs. PMNs were counted in 10 fields, and the average number of inflammatory cells per sample was recorded. Dinoprost (PG; 5 mg) was administered intramuscularly (i.m.) only once, on Day 0, whereas oxytocin (OT; 20 U i.m.) was administered three times at 12hr intervals starting on Day 0. The plasma progesterone concentrations from Days 0 to 14 were not different between the non-treatment (CON), PG treatment, and OT treatment groups. The PMN counts increased in all the groups from before administration to Day 0 (CON, 0.90 to 3.55; PG, 1.20 to 8.45; and OT, 0.70 to 1.70; $P= 0.0014, 0.0046, \text{ and } 0.0073$, respectively). There was a significant decrease in PMNs from Day 0 to Day 2 only in the PG group ($P = 0.0073$). The pregnancy rate was not different among the CON (12/18), PG (14/18), and OT (10/18) groups. The results of first section indicate that dinoprost can reduce uterine polymorphonuclear neutrophil counts.

In the second section, the effect of Intra-uterine-infusion (IUI) on uterine bacteriology were examined. A total of 384 intrauterine swab were collected from 128 estrus mares (before ovulation [Pre], Day 0, and Day 2) using a double-guarded cytology swab. Some antibiotics (Cefazolin [CEZ], Kanamycin [KM], CEZ+KM, Enrofloxacin [ERFX]) were infused in uterus of heavy draft mares on Day 0. A total of 30 microorganisms were isolated from the uterus of Japanese heavy draft mares. After mating, 95% (122/128) of uterine swab were cultured for any microorganisms. The ratio of negative culture of microorganism (NG) at Pre and Day 0 were [CON

(non antibiotic treatment), Pre : Day 0, P - value ; 20/64 : 3/64, $P=0.00023$, IUI, 11/64 : 3/64, $P=0.047$]. There was a significant decrease in the ratio of both group on NG from Pre to Day 0. The detection rate of *Escherichia coli* (*E. coli*), *E. coli* ESBL (+) and *β -streptococcus* group C on Day 2 were CON (38/64), and IUI (22/64). There was a significant decrease in the detection rate of these microorganisms compare to CON and IUI ($P=0.0078$). After antibiotics infused to uterus, the detection rate of *E. coli*, *E. coli* ESBL (+) and *β -streptococcus* group C on Day 2 were CEZ ; 56% (9/16), KM ; 30% (3/10), CEZ+KM ; 20% (5/25), ERFX ; 53.8% (7/13). The pregnancy rate was not different between CON (41/64) and IUI (39/64). Antibiotics susceptibility test indicated that the *E. coli* ESBL (+) was resistant to CEZ (0% of susceptibility) and ERFX (only 16% of susceptibility). The *β -streptococcus* group C also resistant to KM (0% of susceptibility). The results of second section, indicate that IUI of antibiotics can be reduced the detection rate of *E. coli*, *E. coli* ESBL (+) and *β -streptococcus* group C.

The results of this study indicate that dinoprost can reduce uterine polymorphonuclear neutrophil counts, and IUI can reduce the detection rate of the bacteria, and available for a preventing or treatment to persistent breeding-induced or infectious endometritis.

引用文献

- [1] Albihn A., Baöverud V., Magnusson U. Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. *Acta Vet Scand* 2003;44:121–129.
- [2] Allen W.R., Brown L., Wright M., Wilsher S. Reproductive efficiency of Flatrace and National Hunt Thoroughbred mares and stallion in England. *Equine Vet J* 2007;39:438–445.
- [3] Allen W.R., Wilsher S. Half a century of equine reproduction research and application : A veterinary tour de force. *Equine Vet J* 2018;50:10–21.
- [4] Aurich C., Achmann R., Aurich J.E. Semen parameters and level of microsatellite heterozygosity in Noriker draught horse stallions. *Theriogenology* 2003;60:371–378.
- [5] Barbacini S, Necchi D, Zavaglia G, Squires E.L. Reproductive study on incidence of postinsemination uterine fluid in mares inseminated with frozen/thawed semen. *J Equine Vet Sci* 2003;23:493–496.
- [6] Bosh K.A., Powell D., Shelton B., Zent W. Reproductive performance measures among Thoroughbred mares in central Kentucky during the 2004 mating season. *Equine Vet J* 2009;41: 883–888.
- [7] Bohn A.A., Ferris R.A., McCue P.M. Comparison of equine endometrial cytology samples collected with uterine swab, uterine brush, and low-volume lavage from healthy mares. *Vet Clin Pathol* 2014;43:594–600.
- [8] Brinsko S.P., Blanchard T.L., Varner D.D., Schumacher J., Love C.C., Hinrichs K., Hartman D.L. *Manual of equine reproduction* 3rd ed. Mosby/Elsevier 2011 pp73–84.
- [9] Brinsko S.P., Varnor D.D., Blanchard J.L. A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis. *Am Assoc Equine Pract* 2003;49:363–365.
- [10] Brook D. Cytological and bacteriological examination of the mare's endometrium. *J Equine Vet Sci* 1985;5:16–22.

- [11] Bucca S., Carli A., Buckley T., Dolci G., Forgarty U. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. *Theriogenology* 2008;70:1093–1100.
- [12] Camozzato G.C., Martinez M.N., Bastos H.B.A., Fiala- Rechsteiner S., Meikle A., Jobim M.I.M., Gregory R.M., Mattos R.C. Ultrastructural and histological characteristics of the endometrium during early embryo development in mares. *Theriogenology* 2019;123:1–10.
- [13] Chiba A., Ujiie Y., Aoki T. Relationship between the presence of intrauterine fluid and cervical bacteria in heavy draft mares before and after mating. *J Equine Sci* 2019;30:75–79.
- [14] Coffman E.A., Pinto C.R. A review on the use of prostaglandin F_{2α} for controlling the estrous cycle in mares. *J Equine Vet Sci* 2016;40:34–40.
- [15] Cocchia N., Paciello O., Auletta L., Uccello V., Silvestro L., Mallardo K., Paraggio G., Pasolini M.P. Comparison of the cytobrush, cotton swab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology* 2012;77:89–98.
- [16] Coutinho da Silva M.A., Darr C.R., Moraes L.E., Forshey B.S. lactoferrin modulates uterine inflammation postbreeding in the mare. *J Equine Vet Sci* 2017;56:63–67.
- [17] Cuervo-Arango J, Newcombe JR. Relationship between dose of cloprostenol and age of corpus luteum on the luteolytic response of early dioestrous mares: a field study. *Reprod Domest Anim* 2012;47: 660–665.
- [18] Dascanio J., Ley W.B., Bowen J.M. How to perform and interpret uterine cytology. *Am Assoc Equine Pract Proc* 1997;43:182–186.

- [19] Davies Morel M.C.G., Lawlor O., Nash D.M. Equine endometrial cytology and bacteriology: Effectiveness for predicting live foaling rates. *Vet J* 2013;198:206–211.
- [20] Davies Morel M.C.G., Newcombe J.R., Swindlehurst J.C. The effect of age on multiple ovulation rates, multiple pregnancy rates and embryonic vesicle diameter in the mare. *Theriogenology* 2005;63:2482–2493.
- [21] Davis C., 別宮貞徳(訳). 図説 馬と人の歴史全書. 東洋書林 2005. pp i – iii, 1–139.
- [22] Ferrer M.S., Palomares R. Aerobic uterine isolates and antimicrobial susceptibility in mares with post-partum metritis. *Equine Vet J* 2018;50:202–207.
- [23] Ferris R.A., Bohn A., McCue P.M. Equine endometrial cytology: Collection techniques and interpretation. *Equine Vet Educ* 2015;27:316–322.
- [24] Fricke P.M. Scanning the future—ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. *J Dairy Sci* 2002;85:1918–1926.
- [25] Frontoso R., De Carlo E., Pasolini M.P., Van der Meulen K., Pagnini U., Iovane G., De Martino L. Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. *Res Vet Sci* 2008;84:1–6.
- [26] Ginther O.J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. *Theriogenology* 2014;81:112–125.
- [27] Ginther O.J., Pierson R.A. Ultrasonic evaluation of the reproductive tract of the mare: principles, equipment, and techniques. *J Equine Vet Sci* 1983;3:195–201.
- [28] Ginther O.J., Utt M.D. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. *J Equine Vet Sci* 2004;24: 516–526.

- [29] Gutiérrez-Jiménez C, Mora-Cartín R, Altamirano-Silva P, Chacón-Díaz C, Chaves-Olarte E, Moreno E, Barquero-Calvo E. Neutrophils as Trojan horse vehicles for *Brucella abortus* macrophage infection. *Front Immunol* 2019;10:1–8.
- [30] Hanlon D.W., Firth E.C. The reproductive performance of Thoroughbred mares treated with intravaginal progesterone at the start of the breeding season *Theriogenology* 2012;77:952–958.
- [31] Hanlon D.W., Stevenson M., Evans, M.J. Firth, E.C. Reproductive performance of Thoroughbred mares in the Waikato region of New Zealand: 1. Descriptive analyses. *N. Z. Vet. J.* 2012;60: 329–334.
- [32] 橋本麻衣子, 瀬角りほ, 三村享, 春日恵理子, 松本剛, 本田孝行, 濱本知之, 山折大, 大森栄. 基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生 *Escherichia coli* を原因菌とする尿路感染症リスク因子の探索. *日本化学療法学会雑誌* 2018;66:749–757.
- [33] Ishii M, Kobayashi S, Acosta T.J, Miki W, Yamanoi T, Matsui M, Miyake Y., Miyamoto A. Relationship between peripartal plasma oxytocin and prostaglandin F₂ α metabolite and placental expulsion time in heavy draft mares. *J Reprod Dev* 2008;54:270–274.
- [34] Jeffcott L.B., Whitwell K.E. Twinning as a cause of foetal and neonatal loss in the thoroughbred mare. *J. Comp. Pathol.* 1973;83:91–106.
- [35] Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:452–458.
- [36] 柏村文郎. 世界のドラフトホース (1) アメリカ, カナダ編. *Hippophile* 2002;12: 27–38.
- [37] 柏村文郎. 世界のドラフトホース (5) イギリス, アイルランド編. *Hippophile* 2006;23: 17–22.
- [38] 柏村文郎. 世界のドラフトホース (7) ハンガリー, 海外総集編および日本の農用馬. *Hippophile* 2008;31: 21–27.

- [39] Katila T. Evaluation of diagnostic methods in equine endometritis. *Reprod Biol* 2016;16:189–196.
- [40] Kauffold J, Althouse G.C. An update on the use of B-mode ultrasonography in female pig reproduction. *Theriogenology* 2007;67:901–11.
- [41] Kelleman AA. Equine pregnancy and clinical applied physiology. *Proc. Annual Convention of the Am Assoc Equine Prac* 2013;59:350–358.
- [42] Kimura Y, Haneda S, Aoki T, Furuoka H, Miki W, Fukumoto N, Matsui M., Nambo Y. Combined thickness of the uterus and placenta and ultrasonographic examinations of uteroplacental tissues in normal pregnancy, placentitis, and abnormal parturitions in heavy draft horses. *J Equine Sci* 2018;29:1–8.
- [43] Kundak M., Kilicarslan M.R. The effect of uterine lavage and oxytocin administration before and after breeding on fertility in mares in the first postpartum estrus. *Acta Vet Eurasia* 2019;44:112–116.
- [44] Lane E.A., Bijnen M.L., Osborne M., More S.J. Henderson, I.S., Duffy P., Crowe M.A. Key factors affecting reproductive success of Thoroughbred mares and stallions on a commercial stud farm. *Reprod Domest Anim* 2016;51:181–187
- [45] Langlois B., Blouin C. Statistical analysis of some factors affecting the number of horse births in France. *Reprod Nutr Dev* 2004;44:583–595.
- [46] LeBlanc M.M. The Chronically Infertile Mare. *Am Assoc Equine Pract Proceedings* 2008a;54:391–407.
- [47] LeBlanc M.M. When to refer an infertile mare to a theriogenologist. *Theriogenology* 2008b;70:421–429.
- [48] LeBlanc M.M. Advances in the diagnosis and treatment of chronic Infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. *Reprod Domest Anim* 2010;45:21–27.

- [49] LeBlanc M.M., Causey R.C. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. *Reprod Domest Anim* 2009;44:10–22.
- [50] Li J., Zhao Y., Gao Y., Zhu Y., Reed Holyoak G., Zeng S. Treatments for endometritis in mares caused by *Streptococcus equi subspecies zooepidemicus*: A structured literature review. *J Equine Vet Sci* 2021;102:103430.
- [51] Liu I.K.M., Troedsson M.H.T. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. *Theriogenology* 2008;70:415–420.
- [52] Maischberger E., Irwin J.A., Carrington S.D., Duggan V.E.. Equine post-breeding endometritis: A review. *Ir Vet J* 2008;61:163–168.
- [53] Markey B.K., Leonard F.C., Archambault M., Cullinane A., Maguire D. *Clinical Veterinary Microbiology* 2nd ed. Mosby/Elsevier 2013 pp239–274.
- [54] McCue P.M., McKinnon A.O. 2011. Pregnancy Examination. pp. 2245–2261. In: *Equine Reproduction*, Vol. 2, 2nd ed. (McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner D.D. eds.), Wiley-Blackwell, Oxford.
- [55] McKinnon A.O., Squires E.L., Harrison L.A, Blach E.L., Shideler R.K. Ultrasonographic studies on the reproductive tract of mare after parturition : effect of involution and uterine fluid on pregnancy rate with normal and delayed first postpartum ovulatory cycles. *J AM Vet Med Assoc* 1988;192:350–353.
- [56] McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner D.D. 2011. Diagnostic Ultrasonography. pp. 2003-2162. In: *Equine Reproduction*, Vol. 2, 2nd ed. (McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner D.D. eds.), Wiley-Blackwell, Oxford.
- [57] Morel P.C.H., Bokor A., Rogers C.W., Firth E.C. Growth curves from birth to weaning for Thoroughbred foals raised on pasture. *NZVJ* 2007;55:319–325.

- [58] Morris L.H.A., McCue P.M., Aurich C. Equine endometritis a review of challenges and new approaches. *Reprod* 2020;160:95-110.
- [59] Nath, L.C., Anderson G.A., McKinnon A.O. Reproductive efficiency of Thoroughbred and Standardbred horses in north-east Victoria. *Aust Vet J* 2010;88:169–175.
- [60] Newcombe J.R. Field observations on the use of a progesterone-releasing intravaginal device to induce estrus and ovulation in seasonally anestrous mares. *J Equine Vet Sci* 2002;22:378–382.
- [61] Nie G.J., Johnson K.E., Wenzel J.G.W., Braden T.D. Effect of administering oxytocin or cloprostenol in the periovulatory period on pregnancy outcome and luteal function in mares. *Theriogenology* 2003;60:1111–1118.
- [62] Nielsen J.M. Endometritis in the mare: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology* 2005;64:510–518.
- [63] Nikolakopoulos E., Watson E.D. Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after bacterial infusion in the mare. *Theriogenology* 1999;52:413–423.
- [64] 農林水産省生産局畜産部畜産振興課. 馬の改良増殖をめぐる情勢. 2019.7 https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_katiku/attach/pdf/umakenkyuu-2.pdf. 2021.10.
- [65] Pisello L., Rampacci E., Stefanetti V., Beccati F., Hyatt D.R, Coletti M., Passamonti F. Temporal efficacy of antimicrobials against aerobic bacteria isolated from equine endometritis: an Italian retrospective analysis (2010–2017). *Vet Record* 2019;185:598.
- [66] Pycock J.F., Newcombe J.R. Assessment of the effect of three treatment to remove intrauterine fluid on pregnancy rate in the mare. *Vet Record* 1996;138:320–323.
- [67] Rasmussen C.D., Petersen M.R., Bojesen A.M., Pedersen H.G., Lehn-Jensen H., Christoffersen M. Equine infectious endometritis - clinical and subclinical cases. *J Equine Vet Sci* 2015;35:95–104.

- [68] Ribadu A.Y., Nakao T. Bovine reproductive ultrasonography: a review. *J Reprod Dev* 1999;45:13–28.
- [69] Schnobrich M.R., Pearson L.K., Barber B.K., Bradecamp E., Tibary A. Effect of intrauterine infusion of a water-based suspension of enrofloxacin on mare endometrium. *J Equine Vet Sci* 2015;35:662–667.
- [70] Smith A.M., Staniar W.B., Splan R.K. Associations between yearling body measurements and career racing performance in thoroughbred racehorses. *J Equine Vet Sci* 2006;26:212–214.
- [71] Squires E. Current reproductive technologies impacting equine embryo production. *J Equine Vet Sci* 2020;89:102981.
- [72] Threlfall W.R. 2007. Retained fetal membranes. pp. 107–113 In: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* 2nd ed. (Youngquist R.S., Threlfall W.R. eds.), Saunders, Philadelphia.
- [73] Troedsson M.H.T. 2011. Endometritis. pp. 2608–2619. In: *Equine Reproduction, Vol. 2*, 2nd ed. (McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner, D.D. eds.), Wiley-Blackwell, Oxford.
- [74] Troedsson M.H.T., Ababneh M.M., Ohlgren A.F., Madill S., Vetscher N., Gregas M. Effect of periovulatory prostaglandin F_{2α} on pregnancy rates and luteal function in the mare. *Theriogenology* 2001;55:1891–1899.
- [75] Troedsson M.H.T., Liu I.K.M., Ing M., Pascoe J. Smooth muscle electrical activity in the oviduct, and the effect of oxytocin, prostaglandin F_{2α}, and prostaglandin E₂ on the Myometrium and the oviduct of the cycling mare¹. *Biol Reprod* 1995;52:475–488.
- [76] Troedsson M.H.T., Nielsen J.M. Non-antibiotic treatment of equine endometritis. *Pferdeheilkunde* 2018;34:17–22.
- [77] Troedsson M.H.T. Therapeutic considerations for mating-induced endometritis. *Pferdeheilkunde*. 1997;13:516–520.
- [78] Troedsson M.H.T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology* 1999;52:461–471.

- [79] Troedsson M.H.T., Woodward E.M. Our current understanding of the pathophysiology of equine endometritis with an emphasis on breeding-induced endometritis. *Reprod Biol* 2016;16:8–12.
- [80] 馬の博物館. Working horse -働く馬-. (財) 馬事文化財団 2002. pp1–57.
- [81] Vanderwall D.K. Prolonging function of the corpus luteum to suppress estrus in mares. *Am Assoc Equine Pract* 2013;59:342–349.
- [82] Vera L., Boyen F., Visscher de A., Vandenbroucke V., Vanantwerpen G., Govaere J. Limitations of a chromogenic agar plate for the identifying bacteria isolated from equine endometritis samples. *Equine Vet J* 2019;51:266–269.
- [83] Von Dollen K.A., Jones M., Beachler T., Harris T.L., Papich M.G., Papich, Lyle S.K., Scott Bailey C. Antimicrobial activity of ceftiofur and penicillin with gentamicin against *Escherichia coli* and *Streptococcus equi* Subspecies *zoepidemicus* in an ex vivo model of equine postpartum uterine disease. *J Equine Vet Sci* 2019;79:121–126.
- [84] Watson E.D. Post-breeding endometritis in the mare. *Anim Reprod Sci* 2000;60–61:221–232.
- [85] Woodward E.M., Christoffersen M., Campos J., Betancourt A., Horohov D., Scoggin K.E., Squires E.L., Tredsson M.H.T. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. *Reproduction* 2013;145:289–296.
- [86] Woodward E.M., Tredsson M.H.T. Equine breeding-induced endometritis: a review. *J Equine Vet Sci* 2013;33:673–682.
- [87] Woodward E.M., Tredsson M.H.T. Inflammatory mechanisms of endometritis. *Equine Vet J* 2015;47:384–389.