乳牛における炎症性子宮疾患と卵巣機能

清水 隆^{1)†}

羽田真悟²⁾

真方文絵³⁾

1) 帯広畜産大学 畜産衛生学研究部門 動物医科学分野

2) 帯広畜産大学 臨床獣医学研究部門 予防獣医療学分野

3) JA全農 ET研究所 研究開発室

(2015年12月23日受付・2016年1月12日受理)

要 約 子宮への細菌感染によって発症する子宮炎や子宮内膜炎などの炎症性子宮疾患に罹患した乳牛では、卵巣機能が低下することが知られているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。感染細菌由来の内毒素であるリポポリサッカライド (LPS) は、生体内の生理現象に対して悪影響を及ぼすが、卵巣機能に対するLPSの作用に関する知見は少ない。本稿では、子宮炎牛の血中LPS濃度が分娩後に高値に推移していること、子宮炎牛における同一の卵巣内卵胞でもLPS濃度が異なること、高濃度のLPS濃度を保有している卵胞ではステロイドホルモン産生が減少していることなどについて概説する。

——キーワード：炎症性子宮疾患，顆粒層細胞，卵巣機能，卵胞機能，卵胞膜細胞

.....産業動物臨床医誌 6 (増刊号)：215-220, 2016

はじめに

乳牛においては、分娩後に発症する疾病が受胎率の低下に影響を及ぼしていると考えられている。分娩後の疾病による受胎率の低下は、卵胞嚢腫で0.8%、胎盤停滯で2.5%、乳房炎で2.8%、蹄病で4.3%、難産で6%、子宮炎で8%との報告がある [1]。これらの疾病のうち、子宮炎は受胎率の低下を引き起こす割合が8%と他の疾病に比べ非常に高く、乳牛の繁殖機能障害をもたらす重要な疾病の一つであると考えられる。子宮炎や子宮内膜炎などの炎症性子宮疾患は分娩後の子宮への細菌感染によって引き起こされる疾病であり、その発生率の増加が指摘されているとともに、子宮や卵巣などの生殖器官の機能に影響することが明らかにされつつある。

本稿では、炎症性子宮疾患と卵巣機能との関係性について、細菌由来の内毒素であるリポポリサッカライド (LPS) を中心に、これまでの基礎的研究の成果を紹介するとともに、炎症性子宮疾患を患った乳牛の繁殖機能障害のメカニズムについても述べる。

炎症性子宮疾患牛における血中LPS濃度変化

分娩後に発症する子宮炎および子宮内膜炎などの炎症性子宮疾患は、卵巣周期の再開遅延や黄体遺残など卵巣機能に悪影響を及ぼす。乳牛の炎症性子宮疾患を引き起こす主要な細菌は大腸菌 (*E. coli*) であり、免疫細胞に攻撃された大腸菌がその菌体成分であるLPSを放出する。子宮内から体循環に移行したLPSは卵巣へ到達して卵巣機能に影響を及ぼすと考えられる。著者らが子宮炎牛における分娩前後の血中LPS濃度の推移を経時的に解析した (図1) 結果では、分娩前後の乳牛における血中LPS濃度は、0.3から1.6エンドトキシンユニット (EU)/mlであった。特に子宮炎牛の血中LPS濃度は 0.8 ± 0.03 EU/mlであり、健康牛の血中LPS濃度である 0.5 ± 0.01 EU/mlと比較して有意に高い値で推移していた。子宮炎や子宮内膜炎以外に血中にLPSが認められる疾患として、壊疽性乳房炎およびルーメンバラケラトシスなどがあげられるが [2-5]、著者らが解析した乳牛では、乳房炎やルーメン異常の症状が認められなかったことから、子宮炎牛における血中LPS濃度の上昇は子宮の炎

† 連絡責任者：清水 隆 (帯広畜産大学 畜産衛生学研究部門 動物医科学分野)
〒080-8555 帯広市稲田町西2線11 ☎/FAX 0155-49-5419
E-mail: shimizut@obihiro.ac.jp

症に由来するものと考えられた。著者が解析した全ての個体において、発熱などの全身症状がみられたのは分娩後1週間以内であり、全身症状を伴う急性炎症期に血中LPS濃度が最大値を示さなかったことから、LPSと全身症状との間には関連性が少ないのではないかと考えられた。

血中のLPSは、肝臓にて速やかに代謝されて消失する[6-8]。マウスおよびウサギにおいて、静脈内に投与したLPSの半減期は30分以内であること[8]、ウシでは静脈内投与したLPSは投与後3から30分以内に消失すること[7,9]が報告されている。これらの報告は、血中へのLPSの蓄積が生じない可能性を示唆している。しかし、著者の解析では、分娩後に子宮炎を起こした乳牛の血中LPS濃度は高い値を維持し続けていた(図1)。その要因として、個体の健康状態が大きく影響している可能性がある。Andersenら[9]は、LPSを静脈内投与

図1. 分娩後の健康牛(□, n=5)および子宮炎牛(●, n=5)における血中LPS濃度の変化
数値は平均値±標準誤差で表わしている
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 真方氏の博士論文から引用

した場合、健康な乳牛では投与後30分以内に血中からLPSが消失したが、脂肪肝を起こしている乳牛ではLPSの消失が全く起こらず、死亡する個体がいることを報告している。子宮炎に罹患した乳牛では代謝性疾患の併発率は高く、著者が解析した罹患牛においても、脂肪肝による肝機能障害が発生していた可能性がある。このようなことから、子宮炎牛では、分娩後早期に子宮で産生されたLPSが肝臓で代謝されずに血中に蓄積していた可能性は十分に考えられる。

炎症性子宮疾患牛における子宮内貯留液中、血中および卵胞液中LPS濃度の比較

子宮炎牛において、血中LPS濃度が分娩後長期にわたって上昇していたことから、LPSが卵巣へ到達している可能性が考えられる。著者は、子宮炎の自然発生の1症例における血中、子宮内貯留液中および卵胞液中のLPS濃度を比較検討した。解析に用いた乳牛の子宮における病理解剖学的所見は、右子宮角が左子宮角と比べて腫大していた(右子宮角:長さ24.6cm幅6.0cm, 左子宮角:長さ18.0cm幅2.4cm, 図2a)。子宮に割を入れると、膿が貯留して充血していた。病理組織学的所見は、右子宮角の子宮内膜から子宮筋層にかけて好中球、リンパ球、マクロファージおよび形質細胞の重度浸潤を認めた(図2b)。このような子宮炎を発症した乳牛の血中および子宮内貯留液中LPS濃度はそれぞれ0.94 EU/mlおよび6.34 EU/mlであった(表1)。卵胞液の採取が可能であった7個の卵胞における卵胞液中のLPS濃度は、0.62から12.40 EU/mlの範囲であった(2.42 ± 4.40 , Mean $\pm$ SD)。LPS濃度の測定を行った7個の卵胞のうち1個の卵胞において、他の卵胞液中のLPS濃度に比べ10倍以上という高濃度のLPSが検出された(12.40 EU/ml vs. 0.62 - 0.97 EU/ml)。高濃度のLPSが検出された

図2. 子宮炎牛における子宮器官(a)および子宮内膜の組織学的像(b)

右子宮角(RUH)は左子宮角(LUH)に比べて拡張していた(右子宮角,長さ24.6cm,深さ6.0cm;左子宮角,長さ18.0cm,深さ2.4cm)。右子宮角の子宮内膜は好中球,リンパ球,マクロファージなどの浸潤が認められた。子宮内膜腺の消失や萎縮を基にした線維症もみられた(図b中の矢印)。VAG:膣,スケールは200 μ m。参考文献[13]から引用

表 1. 子宮炎牛の臨床所見における卵胞液、子宮内貯留液および血中のリポポリサッカライド (LPS) 濃度

	Follicle position ^a	Follicle diameter (mm)	E/P ratio ^b	LPS (EU/ml)
Plasma	-	-	-	0.94
Uterine fluid	-	-	-	6.34
Follicle 1	LO	10.5	0.26	0.97
Follicle 2	LO	7.9	0.05	12.40
Follicle 3	LO	7.9	0.03	0.62
Follicle 4	RO	12.1	0.32	0.87
Follicle 5	RO	8.9	0.06	0.70
Follicle 6	RO	6.3	0.02	0.71
Follicle 7	RO	7.2	0.01	0.64

^a 卵胞の位置: LO; 左卵巣, RO; 右卵巣

^b 卵胞液中のエストラジオール(E)とプロゲステロン(P)の比
本結果は、参考文献 [13] から引用

卵胞とその他の卵胞における卵胞サイズ、外観、血管分布および卵巣内での位置について比較してみると、いずれの項目においても違いは認められなかった。LPSが卵胞に移行あるいは蓄積するメカニズムについては未だに不明であり、なぜ1個の卵胞にだけ高濃度のLPSが存在していたのかについては不明である。しかしながら、本症例で認められた卵胞間でのLPS濃度の違いは、卵胞への選択的あるいは受動的なLPSの蓄積現象が存在する可能性を示唆している。この特異的なLPSの蓄積に関与する因子として、LPS結合タンパク質 (LPS binding protein, LBP) の存在があげられる。LBPは肝臓で産生される急性相タンパクである。全身を体循環することにより、LPSを捕捉して複合体を形成し、細胞膜上に存在するToll様受容体 (Toll-like receptor, TLR4) などのLPS受容体に認識される [10]。ヒトにおいて、血中のLBP濃度は急性炎症に伴い10から50倍に増加することが報告されている [11]。したがって、本症例においても、子宮の急性炎症によりLBPの産生量が増加し、LBPとLPSが結合して安定な複合体を形成することにより、卵胞への特異的な蓄積が生じたのかもしれない。

子宮の炎症度合と卵胞液中LPS濃度および卵胞機能との関連性

子宮炎牛の卵胞液中にLPSが検出されたことから、著者らは子宮の炎症度合と卵胞液中LPS濃度および卵胞機能との関係性を検証することにした。多くの子宮および卵巣を解析するため、子宮と卵巣のサンプルは食肉処理場から入手した。子宮内貯留液や子宮内膜の充血度といった肉眼的評価により、子宮の炎症度合を軽度、中程度および重度に分類した。また、卵胞液中LPS濃度については、0.2 ~ 2.0 EU/mlの範囲で分布しており (0.6 ± 0.1 EU/ml)、LPS濃度の中央値が 0.5 EU/mlであった

図 3. 子宮の炎症度合 (重度, 中程度, 軽度) と卵胞液中LPS濃度との関連性

ことから、卵胞液中のLPS濃度が 0.5 EU/ml 未満であったものを低LPS卵胞 (0.4 ± 0.01 EU/ml, n = 13), 0.5 EU/ml 以上であったものを高LPS卵胞 (0.9 ± 0.1 EU/ml, n = 13) として分類した。

子宮の炎症度合と卵胞液中のLPS濃度との関係性を調べた結果、肉眼的評価による子宮の炎症度合と卵胞液中LPS濃度の高値あるいは低値との間に関連性は認められなかった (図 3)。このことは、子宮の炎症度合の進行が卵胞液中の LPS 濃度に影響を与えないことを示唆している。したがって、卵胞内のLPSの有無に関わらず子宮に炎症がある場合には、グラム陰性菌の子宮内感染が当然考えられるが、今回の結果からは、子宮に炎症が認められないにも関わらず卵胞内にLPSが存在することが認められた。このように、子宮に炎症が認められず卵胞内にLPSが存在していた理由として、以下のことが考えられた。すなわち、子宮へのグラム陰性細菌の感染により生じたLPSが、子宮の炎症が消失した後も卵胞液中に蓄積した可能性である。卵胞において、LPSがどのような経路で移行し、代謝されて消失するのかについての研究報告はなく、卵胞液中へのLPSの蓄積が生じるメカニズムは明らかになっていない。子宮から卵胞へのLPSの移行に関しては、子宮から血中といった全身的な循環系を介するという考え方 [4] と、プロスタグランジンF_{2α}の伝達が生じる対向流機構のような、子宮-卵巣間での特殊な局所循環が存在するという考え方 [5] があるが、どちらも推測の域を出ない。子宮から卵胞へのLPSの移行、蓄積、そして消失といった時間的・空間的変動が生じる機構についてはさらなる研究が必要とされるが、著者らの研究から、子宮の炎症とは独立して卵胞液中にLPSが存在することが明らかになり、卵胞液中にLPSが蓄積する可能性が考えられた。

卵胞液中LPS濃度と卵胞機能との関連性

著者らは、前項のサンプルを用いて、卵胞液中LPS濃

度と卵胞機能との関係性を検証することにした。その結果、卵胞液中のエストラジオール濃度は、低LPS卵胞に比べ高LPS卵胞で有意に低かった(図4a)。また、卵胞液中のプロジェステロン濃度については、高LPS卵胞が低LPS卵胞に比べて有意に高かった(図4b)。顆粒層細胞における黄体形成ホルモン受容体(LHr)および卵胞刺激ホルモン受容体(FSHr)の遺伝子発現は、低LPS卵胞に比べ高LPS卵胞で有意に低下していた(図5aおよび5b)。エストラジオール産生に関わるアロマターゼの顆粒層細胞における遺伝子発現は、低LPS卵胞に比べ高LPS卵胞で有意に低かった(図5c)。また、卵胞膜細胞

図4. 卵胞液中のLPS, エストラジオール(a)およびプロジェステロン濃度(b)の関連性

卵胞液中LPS濃度が、0.5EU/ml以上のものを高LPS卵胞(n=13), 0.5EU/ml以下のものを低LPS卵胞(n=13)に区分した。全ての数値は、平均値±標準誤差で表わしている。異なる肩文字の間に有意差あり(p<0.05) 参考文献[14]から引用

図5. 高LPS濃度および低LPS濃度卵胞の顆粒層細胞におけるLH受容体(a), FSH受容体(b)およびP450アロマターゼ(c)遺伝子の発現

卵胞液中LPS濃度が、0.5EU/ml以上のものを高LPS卵胞(n=13), 0.5EU/ml以下のものを低LPS卵胞(n=13)に区分した。全ての数値は、平均値±標準誤差で表わしている。異なる肩文字の間に有意差あり(p<0.05) 参考文献[14]から引用

胞においてプロジェステロンからアンドロステンジオン産生への変換に関わる因子であるCYP17, P450sccおよびLHrの遺伝子発現をみると、高LPS卵胞は低LPS卵胞に比べ有意に低かった(図6a, 6bおよび6d)。卵胞の重要な機能であるステロイドホルモンの産生は、顆粒層細胞と卵胞膜細胞の共同作業によって成り立っている。卵胞膜細胞において産生されたプロジェステロンは、CYP17によってアンドロステンジオンに変換される。顆粒層細胞では、卵胞膜細胞で合成されたアンドロステンジオンがP450aromの働きによってエストラジオールに変換合成される。著者らの解析において、高LPS卵胞で認められた卵胞液中エストラジオール濃度の低下の原因として、以下の2つのメカニズムが考えられる。1つ目のメカニズムとして、高LPS卵胞における卵胞膜細胞のCYP17遺伝子の発現が低下していたことから、卵胞膜細胞におけるアンドロステンジオン産生が低下したことで、エストラジオール産生のための基質供給が減少していた可能性が考えられる。2つ目のメカニズムとして、顆粒層細胞におけるP450arom遺伝子の発現が低下していたことから、顆粒層細胞におけるエストラ

図6. 高LPS濃度および低LPS濃度卵胞の卵胞膜細胞におけるLH受容体(a), CYP17(b), StAR(c), P450scc(d)および3βHSD(e)遺伝子の発現

卵胞液中LPS濃度が、0.5EU/ml以上のものを高LPS卵胞(n=13), 0.5EU/ml以下のものを低LPS卵胞(n=13)に区分した。全ての数値は、平均値±標準誤差で表わしている。異なる肩文字の間に有意差あり(p<0.05) 参考文献[14]から引用

ジオール産生自体も阻害されていた可能性があげられる。このようにアンドロステンジオンの基質供給の低下とP450aromによる合成阻害といった2つのメカニズムによる複合的な作用によって、高LPS卵胞におけるエストラジオール産生が減少したものと推察できる。一方、高LPS卵胞における卵胞液中のプロゲステロン濃度の上昇は、プロゲステロン産生の亢進によるものではなく、アンドロステンジオンへの変換抑制によるプロゲステロンの卵胞液中への蓄積による可能性が考えられる。卵胞構成細胞におけるステロイドホルモンの合成に関係するゴナドトロピンは、卵胞膜細胞ではLHであり、顆粒層細胞ではFSHである [12]。高LPS卵胞では、卵胞膜細胞および顆粒層細胞におけるこれらゴナドトロピンの受容体であるLHRおよびFSHRの遺伝子発現が低下していたことから、卵胞液中に存在するLPSは、ゴナドトロピンに対する反応性を低下させることによってステロイドホルモンの産生を抑制している可能性も考えられる。

まとめ

産褥期の乳牛において、子宮への細菌感染によって生じる炎症性子宮疾患は、繁殖障害の主要因の一つである。子宮炎や子宮内膜炎などの炎症性子宮疾患を発症した乳牛における繁殖能力の低下が、大腸菌由来のLPSによる卵巣機能障害によって引き起こされる可能性が考えられた。子宮に炎症像が見えなくても卵胞内にLPSが検出されたことから、子宮の炎症が治癒した後もなかなか受胎しないような乳牛では、卵胞内に蓄積したLPSが持続的に卵巣機能であるステロイドホルモン産生を低減させているのかもしれない。どのようにして卵胞内にLPSが蓄積するのか、そのメカニズムが解明されれば、卵胞内へのLPS蓄積を抑えることが可能となり、炎症性子宮疾患を発症した乳牛における繁殖性の改善に繋がる。また、炎症性子宮疾患が発見、診断されずに見過ごされていることが多いことから、臨床獣医師がこの疾患を簡便で迅速に診断できる方法を開発することも必要であると考えられる。

謝 辞

本研究に際して、病理診断および症例提供を頂きました帯広畜産大学病態予防学分野の古林与志安教授ならびに予防獣医学分野の猪熊壽教授に感謝致します。本稿は、2014年に帯広畜産大学大学院畜産衛生学専攻にて学位を取得した真方文絵氏の学位論文を参考にしたものである。本稿を執筆する機会を与えてくださいました宮崎大学産業動物臨床繁殖学研究室の北原豪先生ならびに本誌編集委員長の安田準先生に心から感謝申し上げます。

引用文献

1. 中尾敏彦, 高産乳牛の生理的变化に対応した繁殖管理の実践. あなたは高産乳牛についていけるか? 29-48 デーリイジャパン, 東京 (2005)
2. Hakogi E, et al. : Endotoxin levels in milk and plasma of mastitis-affected cows measured with a chromogenic limulus test, *Vet Microbiol*, 20, 267-274 (1989)
3. Motoi Y, et al. : Turbidimetric-kinetic assay of endotoxin in rumen fluid or serum of cattle fed rations containing various levels of rolled barley, *J Vet Med Sci*, 55, 19-25 (1993)
4. Mateus L, et al. : Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE2 and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis, *Anim Reprod Sci*, 76, 143-154 (2003)
5. Herath S, et al. : Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function, *Reproduction*, 134, 683-693 (2007)
6. Mori K, et al. : On the in vivo clearance and detoxification of endotoxin by lung and liver, *Ann Surg*, 177, 159-163 (1973)
7. Maxie MG, et al. : Studies with radioactive endotoxin
1. Clearance of 51Cr-labelled endotoxin from the blood of calves, *Can J Comp Med*, 38, 347-366 (1974)
8. Mathison JC, Ulevitch RJ : The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits, *J Immunol*, 123, 2133-2143 (1979)
9. Andersen PH, et al. : Studies on in vivo endotoxin plasma disappearance times in cattle, *J Vet Med Ser A*, 43, 93-101 (1996)
10. Schumann RR, et al. : Structure and function of lipopolysaccharide binding protein, *Science*, 249, 1429-1431 (1990)
11. Zweigner J, et al. : High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes, *Blood* 98, 3800-3808 (2001)
12. Silva E, et al. : Genomic characterization of *Arcanobacterium pyogenes* isolates recovered from the uterus of dairy cows with normal puerperium or clinical metritis, *Vet Microbiol*, 132, 111-118 (2008)
13. Magata F, et al. : Comparison of bacterial endotoxin lipopolysaccharide concentrations in the blood, ovarian follicular fluid and uterine fluid: a clinical case of bovine

- metritis, J Vet Med Sci, 77, 81-84 (2015)
14. Magata F, et al. : Lipopolysaccharide in ovarian follicular fluid influences the steroid production in large follicles of dairy cows. Anim, Reprod Sci, 144, 6-13 (2014)

Ovarian function and inflammatory uterine disease in dairy cattle

T. Shimizu^{1)†}, S. Haneda²⁾, F. Magata³⁾

1) *Graduate School of Animal and Food Hygiene, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine*

2) *Department of Clinical Veterinary Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine*

3) *Research and Development Group, Zen-noh Embryo Transfer (ET) Center*

ABSTRACT In dairy cows, bacterial, inflammatory uterine diseases such as metritis and endometritis are associated with ovarian dysfunction. However, the exact mechanism of how ovarian dysfunction develops from these uterine diseases is unclear. Lipopolysaccharide (LPS), a component of the bacterial cell wall, influences physiological events in animals, although there are few reports on the effect of LPS on ovarian function. In this review, we discuss biological insights into the pathogenesis of post-metritis ovarian dysfunction by highlighting some research findings that include post-parturient high blood LPS concentrations, varying LPS concentrations in the follicular fluid within the same individual follicles and association between high follicular LPS concentration and low steroid hormone production in metritis cows.

—**Key Words** : inflammatory uterine disease, ovarian function, granulosa cells, theca cells, follicular function

† Correspondence to : Takashi Shimizu (Graduate School of Animal and Food Hygiene, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)
Inada, Obihiro, Hokkaido 080-8555, JAPAN
TEL/FAX : 0155-49-5419 E-mail : shimizut@obihiro.ac.jp

.....Jpn. J. Large Anim. Clin. 6 (supple) : 215-220, 2016