

学 位 論 文 要 旨

博士後期 課程 畜産衛生学 専攻

学籍番号 24325

氏 名 真方 文絵



論文題目： 乳牛における炎症性子宮疾患由来エンドトキシンによる
卵巣機能障害に関する研究

要旨

近年，乳牛の高泌乳化が進んできたが，空胎日数の増加や人工授精による受胎率の低下など繁殖性の低下が懸念されている。乳牛の繁殖性低下の問題は，我が国だけでなく酪農先進国であるアメリカやヨーロッパ諸国でも同様に認められる事象であり，繁殖性改善に向けた取り組みが国際的に必要である。乳牛の繁殖機能低下には，分娩後に起こる子宮炎や子宮内膜炎などの炎症性子宮疾患が関与することが示唆されている。このような炎症性子宮疾患に起因する雌家畜の繁殖機能低下は，我が国の家畜生産を阻害する重要な問題として取り上げられるようになったが，炎症性子宮疾患がどのような機序を介して繁殖機能，特に卵巣機能を低下させるのかについては，明らかではない。卵巣機能には卵胞発育に伴うステロイドホルモン産生や免疫細胞の関与など複雑な機構が関連するが，炎症性子宮疾患による卵巣機能低下をこれらの機構と関連付けて解析した研究は極めて少ない。

本研究では，炎症性子宮疾患の起因菌であるグラム陰性細菌が放出するエンドトキシン（リポポリサッカライド：LPS）に着目し，1) 炎症性子宮疾患を患った乳牛の免疫学的解析，すなわち免疫細胞の動態や機能にどのような変化が生じるのか，2) 卵巣機能の生理学的機序すなわち LPS が卵胞構成細胞である顆粒層細胞や卵胞膜細胞および卵子機能にどのように影響するのかを解析し，炎症性子宮疾患による卵巣機能低下の発生要因を明らかにしようとした。

第1の課題について，乳牛の炎症性子宮疾患と LPS との関連性を明らかにするために，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。その結果，分娩後早期に子宮炎を発症した乳牛における血中 LPS 濃度は分娩後長期間にわたり高い値で推移していることが明らかになった。このことは，体循環する LPS が全身の免疫応答を惹起することにより，末梢器官の機能に影響を及ぼす可能性を示唆していることから，子宮炎牛における白血球の数および機能動態を経時的に解析した。その結果，子宮炎牛において，好中球数は分娩 0 週および 1 週で減少すること，リンパ球数，特に CD8 陽性細胞数は分娩後長期間にわたり高い値で推移していることが明らかとなった。さらに，子宮炎牛における好中球の活性酸素産生能をみてみたところ，分娩後に増加することが示された。また，分娩後 0 週から 3 週までの好中球の活性酸素産生能は，LPS による感受性が極めて高いことが明らかとなった。

第 2 の課題である卵胞機能の生理学的解析について、一症例ではあるが、子宮炎の乳牛における卵胞液中、血中および子宮内貯留液中 LPS 濃度を測定した。その結果、卵巣内に存在した 7 つの卵胞のうち 1 つの卵胞において、子宮内貯留液および血中に比べて高濃度の LPS が存在していることが示された。

次に、食肉処理場にて採取した子宮および卵巣を用いて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を調べた。その結果、肉眼的・組織学的に診断した子宮の炎症度合とは関係なく、卵胞液中に LPS が存在することが示された。さらに、卵胞液中の LPS 濃度が高い卵胞では卵胞液中エストラジオール濃度の減少およびプロゲステロン濃度の増加がみられた。また、LPS 濃度の高い卵胞においては、エストラジオール産生に関与する顆粒層細胞の P450 アロマターゼ遺伝子の発現が減少していることが明らかとなった。さらに、顆粒層細胞および卵胞膜細胞に共通する事象として、アポトーシスに関連するカスパーゼ 3 遺伝子の発現増加がみられた。

卵胞は、卵胞構成細胞の他に生殖細胞である卵母細胞を内包している。そこで、卵胞内で起こる卵母細胞の成熟過程を模倣する体外成熟培養法を用いて、卵母細胞の成熟および胚発生能に及ぼす LPS の影響について検証した。その結果、LPS は卵母細胞の核成熟を阻害すること、ミトコンドリアの細胞質拡散の阻害およびミトコンドリア膜電位差の低下 (細胞質成熟阻害) を引き起こすことが明らかとなった。さらに、LPS 存在下で成熟した卵母細胞を体外受精に供したところ、卵割率の低下および胚盤胞期胚への発生率の低下が示された。

以上、本研究の結果から、炎症性子宮疾患による卵巣機能低下において、1) 全身における免疫応答の長期的な変動、すなわち分娩後のリンパ球数の高推移および好中球の機能亢進の関与、および 2) 卵胞液中に存在する LPS による顆粒層細胞および卵胞膜細胞の機能低下や卵子の受精能および胚発生能の低下が要因となっていることが示された。