

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

平成 27 年

(2015)

帯広畜産大学大学院 畜産学研究科

博士後期課程 畜産衛生学専攻

真 方 文 絵

**Study on the negative impact of
uterine inflammation-derived endotoxin on ovarian functions
in dairy cows**

2015

MAGATA Fumie

Doctoral Program in Animal and Food Hygiene

Graduate School of Animal Husbandry

Obihiro University

of Agriculture and Veterinary Medicine

目次

略語

第 1 章 緒言

1-1	乳牛の高泌乳化と繁殖性の低下	1
1-2	分娩後の子宮修復および病態とその定義	2
1-3	卵胞発育と卵子形成	5
1-4	繁殖機能に及ぼす炎症性子宮疾患の影響	7
1-5	炎症性子宮疾患に関連する病原細菌	8
1-6	生殖機能に及ぼす LPS の影響	10
1-7	研究の目的と概要	11
1-8	図および表	13

第 2 章 全身の免疫応答に及ぼす炎症性子宮疾患の影響

第 1 節 子宮炎牛における末梢血中 LPS 濃度動態

2-1-1	目的	17
2-1-2	材料および方法	17
2-1-3	結果	21
2-1-4	考察	22
2-1-5	図および表	25

第 2 節 子宮炎牛における白血球ポピュレーションおよび

好中球活性酸素産生能の経時的変化

2-2-1	目的	26
2-2-2	材料および方法	26
2-2-3	結果	32
2-2-4	考察	34
2-2-5	図および表	41

第 3 章 卵胞機能に及ぼす炎症性子宮疾患の影響

第 1 節 子宮炎の一症例における末梢血, 子宮内, 卵胞液中

LPS 濃度の比較

3-1-1	目的	48
3-1-2	材料および方法	49
3-1-3	結果	52
3-1-4	考察	54
3-1-5	図および表	57

第 2 節 子宮の炎症と卵胞液中 LPS 濃度および卵胞機能との関連性

3-2-1	目的	59
3-2-2	材料および方法	59
3-2-3	結果	63
3-2-4	考察	66
3-2-5	図および表	71

第 4 章 卵胞機能および卵母細胞の発生能に及ぼす LPS の影響

第 1 節 卵胞液中 LPS 濃度と卵胞機能との関連性

4-1-1	目的	75
4-1-2	材料および方法	75
4-1-3	結果	79
4-1-4	考察	81
4-1-5	図および表	85

第 2 節 卵母細胞の成熟過程における LPS の影響

4-2-1	目的	91
4-2-2	材料および方法	91
4-2-3	結果	100
4-2-4	考察	102
4-2-5	図および表	107

第 3 節 胚の発生過程における LPS の影響

4-3-1	目的	114
4-3-2	材料および方法	114
4-3-3	結果	118
4-3-4	考察	119
4-3-5	図および表	122

第 5 章 総合考察	127
謝辞	137
引用文献	139
Summary	153

略語

3 β -HSD	3 β -水酸基脱水素酵素, 3 β -hydroxy steroid dehydrogenase
CD	Cluster of differentiation
cAMP	環状アデノシン一リン酸, Cyclic adenosine monophosphate
CYP17	C17 水酸化/C17-20 側鎖切断酵素, 17 α -hydroxylase/17-20-lyase
E2	エストラジオール, Estradiol
<i>E. coli</i>	大腸菌, <i>Escherichia coli</i>
FSH	卵胞刺激ホルモン, Follicle stimulating hormone
FSHr	卵胞刺激ホルモン受容体, Follicle stimulating hormone receptor
GnRH	性腺刺激ホルモン放出ホルモン, Gonadotropin-releasing hormone
GV	卵核胞, Germinal vesicle
IL	インターロイキン, Interleukin
IVF	体外受精, <i>in vitro</i> fertilization
IVM	体外成熟, <i>in vitro</i> maturation
LBP	リポポリサッカライド結合タンパク, Lipopolysaccharide binding protein
LH	黄体形成ホルモン, Luteinizing hormone
LHr	黄体形成ホルモン受容体, Luteinizing hormone receptor
LPS	リポポリサッカライド, Lipopolysaccharide
MI	第一減数分裂中期, Metaphase I
MII	第二減数分裂中期, Metaphase II

MD2	Myeloid differentiation factor-2
MPF	卵成熟促進因子, Maturation-promoting factor
MtDNA	ミトコンドリア DNA, Mitochondrial DNA
NFκB	核内因子 κB, Nuclear factor-kappa B
P4	プロジェステロン, Progesterone
P450arom	アロマターゼ, Aromatase
P450scc	コレステロール側鎖切断酵素, Cholesterol side-chain cleavage enzyme
PGF _{2α}	プロスタグランジン _{2α} , Prostaglandin F _{2α}
PMN	多形核白血球, Polymorphonuclear leukocyte
ROS	活性酸素種, Reactive oxygen species
StAR	コレステロール担体タンパク質, Steroidogenic acute regulatory protein
TLR	Toll 様レセプター, Toll-like receptor

第 1 章

緒言

1-1 乳牛の高泌乳化と繁殖性の低下

近年、遺伝的改良や飼養管理方法の改善によって乳牛の高泌乳化が進んできた。しかし、これとは対照的に、乳牛の繁殖性の低下がみられ、酪農経営において重要な問題になっている。牛群検定が開始された 1975 年の北海道における 305 日乳量は 5,900 kg であったが、2000 年代には 9,000 kg を超えるようになった（家畜改良事業団「平成 25 年度乳用牛群検定能力成績のまとめ」）。一方、空胎日数+妊娠日数で表される分娩間隔については、2013 年の北海道における牛群検定牛では 432 日、都府県における牛群検定牛では 446 日であり、昭和 60 年と比較すると北海道で 34 日、都府県で 37 日延長していることから、発情発見の低下や人工授精受胎率の低下に起因する空胎日数の延長が認められ、現代の乳牛では繁殖性が極めて低下していることが推察される。このような乳牛の繁殖性の問題は、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。世界的な受胎率低下の原因としては、繁殖性を考慮しなかった遺伝改良や泌乳量の増加による栄養状態の低下および分娩後の疾病増加などがあげられる。高泌乳牛では分娩後に疾病が多発する傾向にあり、これらの疾病が受胎率の低下に影響していると考えられる。事実、分娩後の疾病による受胎率の低下はそれぞれ、難産で 6%、胎盤停滞で 2.5%、子宮炎で 8%、卵胞嚢腫で 0.8%、乳房炎で 2.8%、蹄病で 4.3% である（中尾, 2005）。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、繁殖性の改善向上を考えた場合、看過できない重要な疾病の一つである。後述するように、子宮炎に代表される炎症性子宮疾患は分娩後の子宮への細菌感染によって起こる疾病であり、近年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を著しく低下させることが報告されている。そのためこの炎症性子宮疾患は、乳牛が廃用になる三大疾病の一つである繁殖障害の主な要因になっている。

ここで炎症性子宮疾患と経済的損失との関係について述べる。炎症性子宮疾患による損失は、EUでは年間 14 億ユーロ (約 1,900 億円)、アメリカでは 6 億 5 千万ドル (約 700 億円) にものぼるといわれており (Sheldon et al., 2009a), 受胎率の低下だけでなく、不受胎による淘汰率の増加や乳量の低下、さらには治療に多額の費用を要するなど、炎症性子宮疾患が酪農経営に与える経済的損失は大きく、酪農業における解決すべき重大な課題である。

1-2 分娩後の子宮修復および病態とその定義

分娩後の子宮修復および病態への移行に関する諸過程を以下に述べる。子宮の修復とは、分娩後に非妊娠時の正常な大きさおよび機能へと子宮が回復することであり、胎子の成長とともに大きくなった子宮のサイズ減少、剥離した胎盤の壊死片などといった貯留物の排出、胎盤が剥離した後の子宮内膜の再生および子宮内に移入した細菌の排除などが正常に行われることである (Taverne, 1992)。胎子の娩出後、プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) による子宮の強力な収縮により数時間以内に胎盤が排出され、さらに断続的な子宮筋層の収縮が少なくとも分娩後 7 日まで続く。分娩後、子宮は劇的にその容積を減じていくとともに (Gier and Marion, 1968), 子宮筋の収縮活動により子宮内の貯留物や剥離した胎盤の壊死片、さらに感染細菌の排泄が行われる (Frazer, 2005; Bajcsy et al.,

2006)。分娩後 2 週から 4 週にかけて、胎盤子宮部の壊死組織が脱落し、褐色からクリーム色の膿様物として排泄され、同時に子宮内膜上皮が再生される。この時期に、卵巢では卵胞発育が再開され、分娩後最初の排卵が起こることにより黄体が形成されて卵巢周期が回復する。分娩後 6 週間までには、子宮の形態的・機能的修復は完了し、妊娠可能な状態となる (Sheldon et al., 2009b)。

しかしながら、現在の高泌乳牛のうち、前述したような「正常な」子宮修復をする乳牛は半数程度であり、残りの半数は子宮疾患を発生することになる (Sheldon et al., 2009b)。分娩後に生じる主要な子宮疾患として、胎盤停滞や子宮炎および子宮内膜炎などの炎症性子宮疾患があげられる。子宮の炎症により外陰部からの異常な膿様排泄物がみられる乳牛では、分娩後の卵巢周期の再開の遅れや黄体遺残が生じるなど、卵巢周期に悪影響を及ぼすことが報告されている (Opsomer et al., 2000)。

炎症性子宮疾患の種類とそれらの定義について以下に述べる。乳牛において分娩後に発生する炎症性子宮疾患は、子宮炎、子宮内膜炎および子宮蓄膿症の 3 つに大別される。子宮炎および子宮内膜炎は、分娩後の子宮への細菌感染により発生する疾病である。一方、子宮蓄膿症は、子宮腔に膿あるいは膿様滲出物が貯留する状態のことであり、子宮頸管の機能的閉鎖あるいは病的閉塞のために膿が排出されず、子宮腔に貯留する疾病である。したがって、子宮蓄膿症は子宮炎や子宮内膜炎とは発生機序が異なるため、本研究では対象としていない。

次に、子宮炎および子宮内膜炎の定義について述べる。子宮炎は、分娩後 21 日以内に発生する炎症性子宮疾患であると定義される。分娩後最初の 2 週間に 25~40% の乳牛で子宮炎が認められ、分娩後 10 日での発生率が最も高くなることが知られている。子宮炎の特徴として、子宮は大きく拡張して膿様帯下 (水様赤褐色の液体や粘稠性の白色膿様物) の排出を認め、39.5 °C 以上の発熱を含

む全身症状を示す (Drillich et al., 2001; Sheldon et al., 2006)。重症例では、乳量の減少や活動の低下、食欲不振、心拍数の上昇、脱水などの症状を伴うこともある。子宮炎の重篤度は、その症状により以下のように分類される (Sheldon et al., 2009a)。グレード 1 は、拡張した子宮および子宮からの膿様帯下の排泄が認められるものの、発熱はなく、状態が良好である。グレード 2 は、乳量減少や食欲低下および 39.5 °C 以上の発熱などの全身症状を伴っている。さらに、グレード 3 は、グレード 2 の症状に加え、四肢の皮温低下や抑うつなどの毒血症の徴候がみられ、一般に予後不良である。子宮炎の発生は、難産および胎盤停滞によってそのリスクが高められるとともに、不衛生な分娩環境も疾病発生に関係している。

臨床型子宮内膜炎は、分娩後 21 日以降に腔内に子宮からの膿様帯下 (膿の割合が 50% 以上) がみられる疾患、もしくは分娩後 26 日以降に粘液膿性の腔内貯留物 (膿の割合が 50% 未満) がみられる疾患として定義される (Sheldon et al., 2006)。分娩後 21 日以降に子宮炎を発生した乳牛の 10~20%が臨床型子宮炎に移行することが知られているが (Borsberry and Dobson, 1989; LeBlanc et al., 2002)、発熱などの全身症状は示さない (LeBlanc et al., 2002)。臨床型子宮内膜炎の発生要因として最もリスクが高いのは胎盤停滞であり、続いて死産や助産、双子の分娩など、分娩に関連する因子の関与が報告されている (Potter et al., 2010)。

潜在性子宮内膜炎は子宮内膜炎の臨床症状を示さないが、子宮内膜に炎症を起こしている状態と定義されている。潜在性子宮内膜炎の発生率は、37~74% であると報告されている (Gilbert et al., 2005)。潜在性子宮内膜炎における炎症反応は、臨床型子宮内膜炎や子宮組織の損傷あるいは非化膿性の疾患からの回復期に生じるものだと考えられている。分娩後 5 週の時点で臨床型子宮内膜炎の症状が認められず、子宮洗浄やサイトブラシによる子宮内膜の細胞診により、全

細胞に占める多型核好中球 (PMN) の割合が 5.5~10% を超える場合には潜在性子宮内膜炎と診断される (Kasimanickam et al., 2004; Santos et al., 2009)。潜在性子宮内膜炎の診断は子宮炎や臨床型子宮内膜炎の診断と比較して煩雑であるため、しばしば発見が遅れることから、受胎率低下の一因となっている。

1-3 卵胞発育と卵子形成

ここで、本論文の主要な研究対象である生殖内分泌系と卵胞発育の諸過程について述べる。卵胞の発育は、前胞状期・胞状期・前排卵期の 3 段階に分けられ、胎子期に形成された一次卵母細胞を内包する原始卵胞が一次卵胞に発育することで開始される。続いて前胞状期の卵胞 (二次卵胞) は、卵胞液で満たされた腔 (卵胞腔) を形成して胞状卵胞 (三次卵胞) となる。ここで、ほとんどの三次卵胞は胞状期に卵胞閉鎖を起こすが、卵胞選抜により閉鎖を免れた優勢卵胞のみが前排卵期に進んで排卵卵胞 (成熟卵胞) となる。

卵胞発育は、視床下部-下垂体-卵巣軸から構成される生殖内分泌系によって制御されている。視床下部より分泌される性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) は、下垂体に作用して黄体形成ホルモン (LH) や卵胞刺激ホルモン (FSH) といったゴナドトロピンの分泌を刺激する。前胞状卵胞の発育はゴナドトロピン非依存性であるが、胞状期および前排卵期の卵胞発育は、ゴナドトロピンの作用によって制御される。すなわち、FSH は三次卵胞の発育を誘導して卵胞の発育波を開始させ、LH は卵胞選抜後の優勢卵胞の発育に関係する。また、ゴナドトロピンは卵胞発育だけでなく、卵胞の内分泌作用の制御にも働く。卵胞は卵胞膜細胞と顆粒層細胞、そして生殖細胞である卵母細胞から構成される。LH は卵胞膜細胞に作用してコレステロールをプロジェステロンに変換し、アンドロステンジオンを合成する。顆粒層細胞では、FSH により制御されるアロマ

ターゼ酵素によってアンドロステンジオンがエストラジオールに変換される。顆粒層細胞で合成されたエストラジオールは、卵胞液中に分泌され、さらに血液中に移行して卵胞発育や発情発現を誘導するとともに、LH サージを引き起こして優勢卵胞を排卵させる。さらに、LH サージにより卵胞構成細胞の黄体化が開始され、排卵卵胞は黄体となってプロジェステロンを産生する。プロジェステロンは視床下部一下垂体に作用して卵巣周期を調節するとともに、妊娠の開始と維持のために生殖道の準備を整える。妊娠不成立の場合、子宮内膜から分泌される $\text{PGF}_{2\alpha}$ によって黄体は退行し、新たな優勢卵胞が排卵へと向かう。

卵子形成は卵胞発育と密接に関連しており、卵胞発育の開始は卵原細胞が第一減数分裂を開始して一次卵母細胞となった頃に起こる。一層の卵胞上皮細胞が一次卵母細胞を囲んで原始卵胞となり、一次卵母細胞は第一減数分裂前期の複糸期で休止して、発育を停止する。排卵が近付くと、LH サージによって一次卵母細胞は第一減数分裂を再開し、第一極体を放出して二次卵母細胞となる。二次卵母細胞はそのまま第二減数分裂前期に進み、精子と受精することで第二減数分裂を完了して卵子と第二極体が形成される。受精は卵管で起こり、受精卵は卵割を繰り返しながら子宮に到達し、着床することで妊娠が成立する。

このように、卵胞発育と卵子形成を中心とした卵巣機能は、視床下部一下垂体-卵巣軸から構成される生殖内分泌系により相互に調節され、さらに子宮をはじめとする生殖器官の機能とも深く関係している。そのため、炎症性子宮疾患による分娩後の子宮機能の低下は卵巣機能にも影響を及ぼし、卵巣周期に乱れが生じることによって繁殖障害を引き起こす。近年、炎症性子宮疾患における卵巣機能障害のメカニズムを解明するために、分娩後の子宮に感染する病原細菌を中心とした病原学的なアプローチが行われているが、詳細な機序については不明である。

1-4 繁殖機能に及ぼす炎症性子宮疾患の影響

前述の通り、卵巣内では卵胞発育、排卵、黄体形成、および黄体退行が、動物種に適した周期性をもって繰り返されている。子宮内膜炎罹患牛の 40% において、卵胞の発育遅延や黄体が退行せずに存続して、次の周期に起こる卵胞発育・排卵を妨げる遺残黄体がみられる (Opsomer et al., 2000)。このような子宮内膜炎罹患牛では、受胎率が 20% 減少し、平均空胎日数は 30 日延長する。また、子宮内膜炎罹患牛では、不受胎による淘汰率が 3% 上昇することが報告されている (Borsberry and Dobson, 1989; LeBlanc et al., 2002)。潜在性子宮内膜炎においても繁殖機能の低下が問題となっており、受胎率は健康牛の約半分にまで低下することが報告されている (Kasimanickam et al., 2004)。

ここで、炎症性子宮疾患と繁殖機能との関係について、帯広畜産大学フィールド科学センターにおける 2012 年 10 月から 2014 年 3 月の期間に分娩したホルスタイン種経産乳牛 59 頭を対象とした調査について述べる。分娩後 21 日以内に発熱などの全身症状を示した子宮炎牛における授精回数および空胎日数は、健康牛と比べて有意に増加し、子宮炎牛の 120 日以内の受胎率は健康牛と比べて有意に低下した (Table 1.1)。分娩後日数に対する受胎牛の割合を示した生存時間分析においては、子宮炎牛が健康牛に比べ有意に減少した (Fig. 1.1)。一方、発熱などの全身症状を示さず、分娩後 21 日以降に膣からの膿様帯下の排出がみられた子宮内膜炎牛では、前述したような繁殖成績に関するいずれの項目においても、健康牛との間に有意な差は認められなかった (Table 1.2 および Fig. 1.2)。これらの調査から、炎症性子宮疾患は家畜生産を阻害する一つの要因になっていると考えられる。したがって、家畜生産を安定化させるためには、炎症性子宮炎が乳牛の生殖機能をどのように阻害するのかを解明し、その影響を最小限に抑える家畜管理方法等を考案することが重要である。

1-5 炎症性子宮疾患に関連する病原細菌

前述の通り、炎症性子宮疾患を発症したウシでは繁殖性の悪くなることが知られていたが、その直接的な要因については不明な点が多かった。近年、炎症を起こした子宮内の細菌観察の研究が進み、炎症性子宮疾患に関連する細菌の同定および分娩後の細菌動態の変化が調べられるようになった。

妊娠中の子宮は無菌的な環境であるが、分娩後 2 週以内には 90% 以上のウシで子宮から細菌が検出される (Sheldon et al., 2004)。分娩後 3 週以降、子宮から細菌が分離されるウシの割合は減少し、分娩後 31~45 日には 50%、46~60 日には 9% である。ウシの子宮から分離される細菌は、その出現頻度および病原性により 3 つのカテゴリに分類される (Sheldon et al., 2002)。すなわち、子宮疾患の病原性感染細菌、疾病の原因となり得る病原体および日和見細菌の 3 つである。*Escherichia coli* (*E. coli*) および *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*) は炎症性子宮疾患における主要な病原性感染細菌であり、続いて *Prevotella species* や *Fusobacterium necrophorum* (*F. necrophorum*) などの嫌気性細菌が高い頻度で検出される (Elliott et al., 1968; Griffin et al., 1974; Bonnett et al., 1991; Sheldon et al., 2002; Williams et al., 2005)。*E. coli* は他の細菌に先行して感染し、それにより他の細菌の感染が起りやすくなると考えられている。*T. pyogenes* はコレステロール依存的細胞毒である *pyolysin* をコードする遺伝子 (*ply*) を発現しており、強い細胞障害性により子宮内膜組織を破壊する (Silva et al., 2008)。また、*F. necrophorum* は白血球を破壊する毒素であるロイコトキシンを産生し、*Prevotella species* は白血球による貪食を阻害する物質を産生する (Olson et al., 1984)。このように、分娩後の乳牛の子宮内には様々な細菌が感染するが、感染細菌の種類によりその症状や疾病の重篤度が異なる。

ここで、炎症性子宮疾患における主要な感染細菌である *E. coli* とそのエンド

トキシン (内毒素) である LPS について述べる。 *E. coli* を含むグラム陰性細菌は、エンドトキシンを産生することで、発熱や白血球の活性化、致死性ショックなど多岐にわたる障害を引き起こす。エンドトキシンはグラム陰性細菌の細胞壁の構成成分であり、菌体の破壊によって遊離することで細胞に作用し、毒性を示す。このエンドトキシンの本体がリポポリサッカライド (LPS) と呼ばれるリポ多糖であり、強力な炎症誘因物質として知られている。LPS は熱的・化学的に非常に安定な物質であり、オートクレーブや乾熱滅菌では不活化されない (Miyamoto et al., 2009)。LPS の生物活性中心は、LPS の脂質部分であるリピド A であり、抗原性を持たないが、自然免疫系を刺激する。自然免疫においてこの LPS の認識に関与している受容体が、Toll 様レセプター (TLR) である。

TLR は、微生物の構成成分を特異的に認識し自然免疫系の活性化を誘導する。現在までに 10 種類の TLR ファミリーが報告されているが、そのうちの一つである TLR 4 は、LPS の認識に中心的な役割を担っている (Beutler et al., 2003; Takeuchi and Akira, 2010)。生体内で、LPS は LPS binding protein (LBP) と結合して複合体を形成し、細胞膜上に存在する、TLR4 / CD14 (cluster of differentiation 14) / MD2 (myeloid differentiation factor-2) から成る複合受容体により認識される。受容体に結合した LPS は ERK1/2 および p38 のリン酸化を引き起こし、NF κ B (nuclear factor κ B) の核内移行を刺激することで、Interleukin (IL)-1 β , IL-6, Tumor necrosis factor α などの炎症性サイトカインや IL-8 などのケモカインの産生を誘導する (Beutler et al., 2003; Takeuchi and Akira, 2010)。

近年、卵巣機能における *E. coli* や LPS の影響を調べた研究が報告されている。子宮への *E. coli* 感染を起こしているウシでは、分娩後最初の優勢卵胞の発育が遅延すること、また卵胞で合成されその発育や発情発現に関わるエストロジオールの血中濃度が低下することが報告されている (Sheldon et al., 2002;

Williams et al., 2007)。加えて、*E. coli* 感染牛では排卵率が低下するとともに、排卵後に形成される黄体から分泌されるプロジェステロンの血中濃度が低下した。これらのことから、*E. coli* は、分娩後早期に子宮の炎症を引き起こすだけでなく、卵巢の機能にも影響を及ぼす可能性が推察され、炎症性子宮疾患における卵巢機能障害を解明する上で、重要な細菌であるといえる。子宮内膜炎牛において、子宮内貯留液のみならず、血中および卵胞液中でも LPS が存在することが報告されているが (Mateus et al., 2003; Herath et al., 2007)、LPS と生殖機能との関連性については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、この *E. coli* の産生する内毒素である LPS に焦点をあて、LPS が卵巢機能に与える影響を明らかにすることで、乳牛の炎症性子宮疾患における卵巢機能障害のメカニズムを体系的に解明することを目指した。

1-6 生殖機能に及ぼす LPS の影響

乳牛の生殖機能に及ぼす LPS の影響については、これまで子宮を中心に研究が行われており、LPS が子宮内膜の炎症を引き起こすメカニズムについての知見が報告されてきた。まず、LPS は子宮内膜の細胞膜上に存在する TLR4 / CD14 / MD2 複合受容体により認識され、子宮内膜からのサイトカインやケモカインの産生を刺激することで、免疫細胞を活性化することが明らかになっている (Borges et al., 2012)。さらに、LPS は子宮内膜からのプロスタグランジンの分泌を PGF_{2α} から PGE₂ に切り替える (Herath et al., 2009)。PGE₂ は筋弛緩を伴う血管拡張作用を持ち、さらに免疫応答を抑制することで子宮への細菌感染を起りやすくし、また重篤にする (Mateus et al., 2003)。このようなメカニズムにより、LPS によって傷害を受けた子宮内膜では内分泌環境が変化し、人工授精を行ったとしても、精子の輸送や胚の着床に影響を及ぼす可能性が考えられる。

しかしながら、乳牛の炎症性子宮疾患においては、適切な治療が行われ治癒したと思われても、同じ牛群内の正常牛よりも罹患牛で受胎性が低下すること (Borsberry and Dobson, 1989)、また子宮が清浄化した後も卵巣機能の低下が認められることが報告されており (Green et al., 2011)、LPS が子宮だけでなく卵巣機能にも影響すると考えられる。

LPS は下垂体からの LH のサージ状分泌やパルス状分泌を阻害すること、さらに、LH 分泌を統御する視床下部からの GnRH 分泌を阻害することにより、卵胞発育や排卵の遅延をもたらすことが報告された (Battaglia et al., 1999; Suzuki et al., 2001)。これらの知見は、LPS が視床下部―下垂体系を介して間接的に卵巣に作用し、その機能を低下させる可能性を示している。しかしながら、LPS が卵巣機能に及ぼす直接的な影響については未だ明らかになっていない。

1-7 研究の目的と概要

前述のとおり、炎症性子宮疾患は生殖器官の機能を低下させることが推察されている。このような炎症性子宮疾患に起因する乳牛の生殖機能の低下は、我が国および欧米などにおける酪農経営を阻害する重要な問題として取り上げられている。一方、炎症性子宮疾患がどのような機序を介して卵巣機能を阻害するのかについては、未だ不明な点が多い。

これらの背景を踏まえ、本研究では 1) 炎症性子宮疾患罹患牛の免疫学的解析、すなわち炎症性子宮疾患を患った乳牛の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 が卵胞内因子の発現動態や卵子機能をどのように変化させるのか、を解析することにより、炎症性子宮疾患による生殖機能低下の発症要因を明らかにしようとした。

第 1 の課題について、炎症性子宮疾患が細菌感染によって発症するため、生

体内の LPS 濃度動態および免疫細胞機能について、分娩前後の経時的推移を調べる必要がある。すなわち、分娩前 2 週から分娩後 6 週まで週二回の採血および膣内粘液の評価を行い、炎症性子宮疾患の発症および血中 LPS 濃度の経時的推移を調べた (第 2 章第 1 節)。次に、炎症性子宮疾患牛の末梢血白血球のポピュレーションおよび好中球における活性酸素産生能について、分娩前後の経時的変化を解析するとともに、分娩週別の乳牛の LPS に対する好中球の活性酸素産生能を比較検討した (第 2 章第 2 節)。

第 2 の課題である卵胞機能の生理学的解析については、炎症性子宮疾患に罹患した乳牛の卵胞液中における LPS の存在の有無が重要になるため、まず、一症例ではあるが、子宮炎の乳牛における卵胞液中 LPS 濃度および子宮内 LPS 濃度を測定することにより、それらの関係性を検討した (第 3 章第 1 節)。また、子宮に炎症が認められた乳牛において、卵胞液中の LPS 濃度を測定するとともに、卵胞液中エストラジオール濃度、プロジェステロン濃度およびこれらステロイドホルモン産生関連遺伝子の発現を解析することにより、子宮の炎症と、卵胞液中 LPS 濃度動態および卵胞機能との関係性について検討した (第 3 章第 2 節)。さらに、卵胞液中の LPS 濃度と卵胞のステロイドホルモン産生との関連性を検討するとともに (第 4 章第 1 節)、卵胞内に存在する卵母細胞の成熟に LPS がどのように影響するのかについて、体外成熟培養を行い、卵母細胞の核成熟および細胞質成熟に及ぼす LPS の影響を検討した (第 4 章第 2 節)。次いで、LPS 感作された卵母細胞の発生能を明らかにする目的で、体外受精および体外発生培養を行い検討した (第 4 章第 3 節)。なお、本研究における乳牛を用いた動物実験は、帯広畜産大学動物実験取扱規程に基づき承認を受けた。

1-8 図および表

Table 1.1 Reproductive performance of cows without fever ($n = 46$) and with fever ($n = 13$) during the first 3 weeks postpartum.

	No fever	Fever	<i>P</i> -value
Lactation number	2.9 ± 1.7	3.0 ± 1.8	NS
Days to first AI	83.7 ± 23.9	93.3 ± 32.5	NS
AI number	2.0 ± 1.1	2.9 ± 1.7	<0.05
Days open	119.1 ± 51.9	175.8 ± 63.6	<0.05
First AI conception rate, %	41.3 (19/46)	30.8 (4/13)	NS
Pregnancy rate at 120 DIM, %	60.9 (28/46)	15.4 (2/11)	<0.01

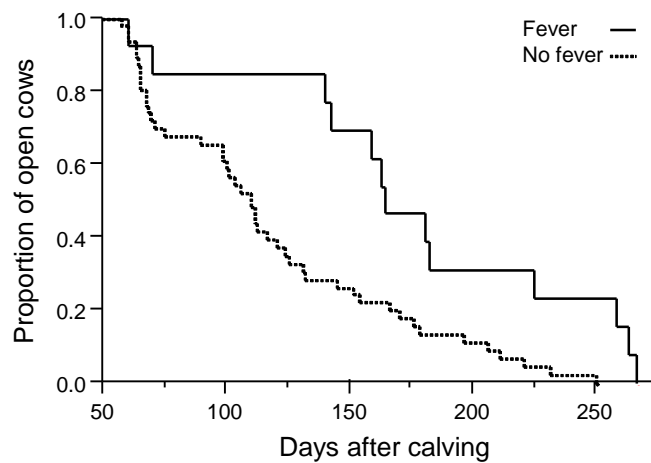


Fig. 1.1 Kaplan-Meier survival curves for proportion of open cows and days after calving. The solid line indicates cows with no fever ($n = 46$) and the dotted line indicates cows with fever ($n = 13$) during the first 3 weeks after calving. Cows without fever became pregnant at a faster rate than cows with fever ($P < 0.01$). Cows that showed fever associated with mastitis were excluded.

Table 1.2 Reproductive performance of cows with vaginal discharge score ≤ 3 ($n = 34$) and cows with vaginal discharge score >3 ($n = 24$) from 3 to 6 weeks after calving.

	Score ≤ 3	Score > 3	<i>P</i> -value
Lactation number	3.1 \pm 1.7	2.7 \pm 1.8	NS
Days to first AI	80.4 \pm 17.7	90.1 \pm 30.7	NS
AI number	2.4 \pm 1.4	2.0 \pm 1.2	NS
Days open	133.3 \pm 58.3	127.8 \pm 61.9	NS
First AI conception rate, %	32.3 (11/34)	45.8 (11/24)	NS
Pregnancy rate at 120 DIM, %	52.9 (18/34)	50.0 (12/24)	NS

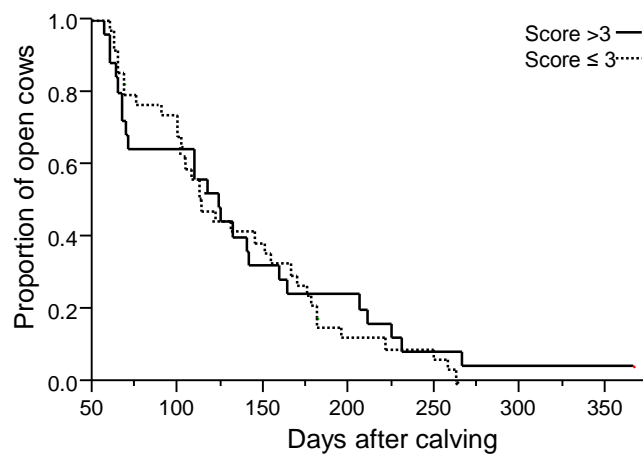


Fig. 1.2 Kaplan-Meier survival curves for proportion of open cows and days after calving. The solid line indicates cows with vaginal discharge score ≤ 3 ($n = 34$) and the dotted line indicates cows with vaginal discharge score >3 ($n = 24$) from 3 to 6 weeks after calving. There was no significant difference between groups ($P > 0.05$).

第 2 章

全身の免疫応答に及ぼす炎症性子宮疾患の影響

第 1 節

子宮炎牛における血中 LPS 濃度の動態

2-1-1 目的

第 1 章で述べたとおり，分娩後に発症する胎盤停滞や子宮炎および子宮内膜炎などの炎症性子宮疾患は，卵巣周期再開の遅延や黄体遺残など卵巣の機能に悪影響を及ぼす。乳牛の炎症性子宮疾患の主要な感染細菌である *E. coli* から LPS が放出されることから，体循環にのった LPS が卵巣へ到達し，卵巣機能に影響していることが考えられる。そこで本実験では，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することにより，乳牛の炎症性子宮疾患と LPS との関連性を明らかにすることを目的とした。

2-1-2 材料および方法

(1) 供試動物

帯広畜産大学畜産フィールド科学センターにおいて，2012 年 10 月から 2014 年 3 月にかけて分娩したホルスタイン種経産乳牛を対象とした。難産や双子，低カルシウム血症，ケトーシス，急性乳房炎および蹄病などの兆候を示した牛は実験対象から除外した。最終授精日から 280 日後を分娩予定日とし，分娩予定日の約 60 日前に急速乾乳処置を行った。乾乳期は屋外のパドック付きフリーストール牛舎もしくはドアフィーダー付き牛舎で飼養し，分娩予定日

の 2 週間前から体温を測定し、身体各部位の変化を観察した。これらの兆候より分娩直前であると判断した牛は屋内分娩房へと移動し、監視の下で分娩を行った。分娩後 1 週間の乳牛は分娩房と同じ舎内のタイストールにて飼養し、その後は屋外のフリーストール牛舎へと移動させた。実験期間中の搾乳は毎日朝夕の 2 回行われた。

(2) 子宮炎の診断

直腸温の測定は、分娩後 1 週間は毎日、分娩後 2-3 週間は週 3 回行った。また、膣内粘液の採取は、分娩後 8 週まで週 1 回、膣粘液採取器 (メトリチェック; Frontier International Ltd., Kawasaki, Japan) を用いて行った。採取した膣内粘液の評価は, McDougall et al. (2007) の報告に基づいて、スコア 1 からスコア 5 までの 5 段階に分類した。すなわち、スコア 1 = 透明な粘液、スコア 2 = 透明な粘液に少量の膿片、スコア 3 = 50% 未満の膿、スコア 4 = 50% 以上の膿、スコア 5 = 50% 以上の膿および悪臭、の 5 段階とした。過去の報告に従い (Cai et al., 1994; Hammon et al., 2006)、分娩後 21 日以内に外陰部から悪臭を伴う赤褐色水様の排出液が認められ、さらに 39.5°C 以上の発熱がみられた場合を子宮炎と診断した ($n = 5$, 平均産次数 2.8 ± 1.6)。子宮炎と診断された個体に対する治療は行わなかった。分娩後 3 週以内に 39.5°C 以上の発熱が認められず、分娩後 8 週以内の膣内粘液スコアが 2 以下であった個体を健康牛とした ($n = 5$, 平均産次数 3.8 ± 1.2)。

(3) 血液の採取

血中 LPS 濃度を測定するため、分娩前 2 週から分娩後 6 週まで、血漿分離用ヘパリン入り真空採血管 (5 ml 採血用, VP-H050K; Terumo, Tokyo, Japan) を用

いて尾静脈から採血を行った。ただし採血は、分娩前は週 1 回、分娩後は週 2 回行った。採取した血液は直ちに氷冷し、採血後 1 時間以内に $1,750 \times g$, 4°C , 15 分間遠心分離して血漿のみをエンドトキシンフリーのシリコナイズドチューブに移し、LPS 測定まで -30°C で保存した。

(4) LPS 濃度の測定

血中 LPS 濃度の測定は、QCL-1000 Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate (LAL) assay kit (Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, MD, USA) を用いて行った。検体中の成分による LAL 反応の阻害を不活化するために、Petsch et al., (1998) の方法に従って Proteinase K 消化による前処理を行った。すなわち、エンドトキシン試験用水で希釈した血漿および卵胞液に、最終濃度が 0.4 mg/ml となるように Proteinase K (Sigma-Aldrich Japan Inc., Tokyo, Japan) を加え、 37°C で 18 時間インキュベーションした。インキュベーション後、Proteinase K を不活化するために、ヒートブロックを用いて 80°C で 10 分間加熱処理を行った。前処理を行った検体に LAL 試薬と基質溶液を加え、ヒートブロックを用いて 37°C で加温し、反応させた。キットに付随しているエンドトキシン標準品 (*E. coli* O111: B4) をエンドトキシン試験用水で希釈して 0.1, 0.25, 0.5 および $1.0 \text{ endotoxin units (EU)/ml}$ ($1 \text{ EU} = 0.1\text{-ng LPS}$) のスタンダード溶液とし、検量線を作成した。前処理による阻害反応の不活化を確認するために、検体を既知濃度 (1 EU/ml) のエンドトキシンでスパイクし、スパイクなしの検体とともにアッセイを行った。両者の定量されたエンドトキシン値の差が、既知量のスパイクの $\pm 20\%$ 以内であることを確認した。

(5) 統計解析

Shapiro-Wilk の W 検定により正規性の検定を行った後、パラメトリック検定による統計処理を実施した。健康牛と子宮炎牛における血中 LPS 濃度の経時的変化には反復測定-分散分析法 (Repeated-measures ANOVA) を用い、疾病グループ間 (健康牛と子宮炎牛)、時間 (分娩後週数)、グループと時間の交互作用について検定した。また、同一の分娩後週数における疾病グループ間の違いを Unpaired *t*-test により検定した。統計学的解析には Stat View 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, USA) および JMP 5.1 (SAS Institute Inc., Cary, USA) を用いた。 $P < 0.05$ の場合に有意差ありとした。全てのデータは mean \pm SEM で示した。

2-1-3 結果

健康牛と子宮炎牛における分娩前後の血中 LPS 濃度の経時的変化を Fig. 2.1.1 に示した。分娩前後の乳牛における血中 LPS 濃度は、0.3 から 1.6 EU/ml の間で分布していた。子宮炎牛の血中 LPS 濃度は、健康牛と比較して有意に高い値で推移した (健康 vs. 子宮炎; 0.5 ± 0.01 EU/ml vs 0.8 ± 0.03 EU/ml, $P < 0.01$)。健康牛および子宮炎牛における分娩後週数 (時間) による LPS 濃度の変動には有意な変化は認められなかった ($P > 0.05$)。また、グループ間 (健康牛と子宮炎牛) と時間 (分娩後週数) との間に有意な交互作用は認められなかった ($P > 0.05$)。分娩後週数における疾病グループ間の特徴についてみると、子宮炎牛における血中 LPS 濃度は分娩後 0, 1, 2 および 3 週において有意に高く ($P < 0.05$)、分娩後 6 週において高い傾向 ($P < 0.1$) を示した。

2-1-4 考察

(1) 子宮炎牛における血中 LPS 濃度の動態

本節の実験では、分娩前後の健康牛および子宮炎牛の血中 LPS 濃度の変動について検討した。血中に LPS が認められる疾患として、子宮炎、壊疽性乳房炎およびルーメンパラケラトシス等があげられる (Hakogi et al., 1989; Motoi et al., 1993; Mateus et al., 2003; Herath et al., 2007) が、本節で用いた乳牛では、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症に由来するものと推察される。Mateus et al. (2003) は、重度の子宮内膜炎牛の血中および子宮内貯留液中から LPS を検出した。Mateus et al. (2003) は、健康牛における血中 LPS 濃度および経時的な測定を行っていないが、子宮内膜炎牛の血中 LPS 濃度は 0.08 – 9.14 EU/ml であると報告しており、本実験で得られた子宮炎牛の血中 LPS 濃度とほぼ同程度であった。本節で用いた 5 頭の子宮炎牛において、血中 LPS 濃度はそれぞれ分娩後 0.5 から 3 週の間には最大値を示した。一方、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 週間以内であった。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ない可能性が示唆された。

(2) 血中への LPS 蓄積の可能性

静脈内に投与された LPS は、肝臓にて速やかに代謝され、消失する (Mori et al., 1973; Maxie et al., 1974; Mathison and Ulevitch, 1979)。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 (Mathison and Ulevitch, 1979), またウシでは、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が報告されている (Maxie et al., 1974; Andersen et al., 1996)。

これらの報告は、血中への LPS の蓄積は生じない可能性を示唆している。しかしながら、血中からの LPS の消失は、個体の健康状態に大きく影響されることが明らかになっている。Andersen et al. (1996) は、LPS を静脈内投与した場合、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、本研究で用い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。そのため、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。また、血中からの LPS の消失は、LPS と安定な複合体を形成する LPS-binding protein (LBP) の存在にも依存する。LBP の一つである HDL と結合した LPS は、LPS 単独の場合と比較して血中からの消失速度が極端に遅く、LBP と複合体を形成することで、LPS が血中に蓄積する可能性が示唆されている (Freundenberg and Galanos, 2000)。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ことから (Zweigner et al., 2001), 本研究で用いた子宮炎牛においても、子宮の炎症により産生された LBP と LPS とが複合体を形成することにより血中への蓄積が生じた可能性は高い。

(3) 結論

分娩後早期に子宮炎を発症した乳牛では、血中の LPS 濃度が分娩後長期にわたって上昇していることが明らかになった。生体内において、LPS は白血球からの炎症性サイトカインやケモカインの産生を誘導するとともに、白血球の増殖や活性化を刺激する (Beutler et al., 2003; Takeuchi and Akira, 2010)。そのため、血中に存在する LPS が白血球の機能や動態を変化させることにより、全身の免

疫応答に影響を及ぼしている可能性が推察される。そこで次章では、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するとともに、分娩後の時期による LPS への感受性の違いについて検討を行った。

2-1-5 図および表

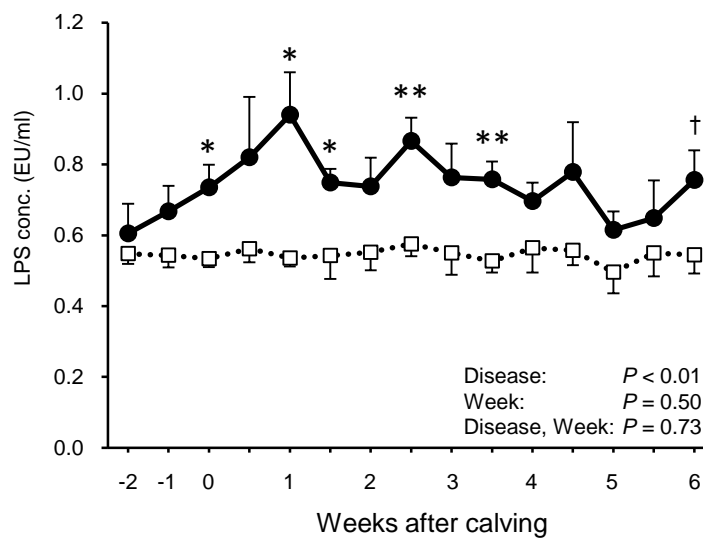


Fig. 2.1.1 The changes of plasma lipopolysaccharide (LPS) concentration in healthy cows (open squares, $n = 5$) and cows with metritis (solid circles, $n = 5$). All values are shown as means \pm SEM. Values with asterisks are different between diseases within the same sampling day (\dagger : $P < 0.1$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$).

第 2 節

子宮炎牛における白血球ポピュレーションおよび

好中球活性酸素産生能の経時的変化

2-2-1 目的

分娩前後の血中 LPS 濃度の経時的変化を健康牛と子宮炎牛とで調べた前節の結果から、子宮炎牛では血中の LPS 濃度が健康牛に比べ高いことが明らかとなった。この結果は、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。炎症性子宮疾患の発生や持続には、病原体に対する生体の免疫防御機構が重要な働きを担っている (Hussain, 1989)。そこで本節では、子宮炎牛における末梢血白血球のポピュレーションおよび好中球活性酸素産生能を経時的に解析することにより、白血球の数および機能に及ぼす炎症性子宮疾患の影響を明らかにすることを目的とした。また、本節では本章第 1 節で明らかになった末梢血中 LPS 濃度動態と合わせて解析を行うことにより、炎症性子宮疾患における LPS と全身の免疫応答との関わりを検証した。

2-2-2 材料および方法

(1) 供試動物

実験に供したホルスタイン種経産乳牛は、第 2 章第 1 節と同様とした。

(2) 子宮炎の診断

子宮炎の診断は、第 2 章第 1 節と同様の手順で行った。白血球ポピュレー

ションおよび好中球活性酸素産生能の測定には健康牛 11 頭 (平均産次数 3.8 ± 1.3) および子宮炎牛 5 頭 (平均産次数 2.8 ± 1.6) を用いた。リンパ球サブポピュレーションの測定には, 前述の実験で用いた 11 頭のうち健康牛 6 頭 (平均産次数 2.8 ± 1.1) および子宮炎牛 3 頭 (平均産次数 2.0 ± 0.0) を用いた。

(3) EDTA 含真空採血管の作製

遮光したビーカーに 111.7 g の Titriplex III および 10 g の Acetylsalicylic Acid を入れ 800 ml の超純水で混合した後, 粒状の NaOH で pH 7.0 (中性) に調整した。溶解後, 5N の NaOH で pH 7.4 に調整し, 1000 ml までメスアップした。これを 20 μ l ずつプレーン真空採血管 (10 ml 採血用, VP-P100K; TERUMO, Tokyo, Japan) に分注し, 使用するまで遮光, 冷蔵保存した。

(4) 末梢血白血球の単離

供試牛において, 分娩前 2 週から分娩後 8 週まで週 1 回, EDTA 含真空採血管を用いて尾静脈から採血を行った。採取した血液は直ちに氷冷し, 全自動血球計数器 (セルタック α ; Nihon Kohden Corporation, Tokyo, Japan) を用いて総白血球数を測定した。また, 採血後 1 時間以内に以下の手順によって白血球を単離した。まず, 100 μ l の全血に 1 ml の溶血剤 (BD Pharm Lyse; BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) を加え, 転倒混和したのち遠心分離 ($500 \times g$, 4°C , 5 分間) を行った。上清を除去した後, 再び 1 ml の溶血剤を加えて懸濁し, 室温の暗所で 10 分間静置した。その後, 再び遠心分離 ($500 \times g$, 4°C , 5 分間) を行い, 上清を除去し, 1 ml の MACS buffer (autoMACS Running Buffer; Miltenyl Biotec, Cologne, Germany) を加えて細胞ペレットを洗浄した後, 遠心分離 ($500 \times g$, 4°C , 5 分間) を行った。ペレットを確認し, MACS buffer を除去して, 500 μ l

の MACS buffer を加えた白血球懸濁液を白血球百分比の測定に供した。

(5) 白血球百分比の測定

白血球百分比の測定はフローサイトメトリ (COULTER EPICS XL Flow Cytometer; Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) を用いて行った。5,000 個の白血球を使用し、前方散乱光 (FS: Forward scattered light) により細胞の大きさを、側方散乱光 (SS: Side scattered light) により細胞内部の複雑さを測定し (Fig. 2.2.1), 顆粒球 (好中球), リンパ球および単球の割合をそれぞれ算出した。全自動血球計測器によって得られた総白血球数およびフローサイトメトリにより計測した白血球百分比を以下の計算式を用いて、顆粒球 (好中球), リンパ球および単球の数を算出した。

計算式: 顆粒球数 [cells/ μ l] = 総白血球数 [cells/ μ l] \times (顆粒球の割合 [%] \times 100)

(6) リンパ球サブポピュレーションの測定

リンパ球サブポピュレーションの測定は、前述した「末梢血白血球の単離」の項で単離した白血球を用いて行った。10 μ l の白血球懸濁液に、希釈した 10 μ l のマウス抗ウシ CD4 抗体 (AbD serotec, Oxford, UK) およびマウス抗ウシ CD8 抗体 (Gene Tex Inc., San Antonio, TX, USA) を加え (Table 2.2.1), 氷上で 30 分間反応させた。反応後, 500 μ l の MACS buffer を加えて洗浄した後, 遠心分離 (500 \times g, 4°C, 5 分間) を行った。ペレットを確認後, MACS buffer を除去し, 500 μ l の MACS buffer を加えた白血球懸濁液をフローサイトメトリに供した。

リンパ球サブポピュレーションの測定には 50,000 個のリンパ球を使用し, FITC (FL1; 抗 CD4 抗体に結合) および RPE (FL2; 抗 CD8 抗体に結合) の蛍

光を検出することにより (Fig. 2.2.2), リンパ球中の CD4 および CD8 陽性細胞の割合を測定した。

(7) 好中球活性酸素産生能の測定

供試牛において、分娩前 2 週から分娩後 8 週まで週 1 回、血漿分離用ヘパリン含真空採血管 (5ml 採血用, VP-H050K; TERUMO, Tokyo, Japan) を用いて尾静脈から採血を行った。採取した血液は直ちに 25°C の保温器に入れて実験室に運び、ルミノール依存性ザイモザン刺激化学発光法により、採血後 30 分以内に活性酸素産生能の測定を行った。PBS (Sigma-Aldrich Japan Inc., Tokyo, Japan) により 5 倍に希釈した 100 μ l の全血に 10 μ l の 3mM ルミノール (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione; Sigma-Aldrich Japan Inc., Tokyo, Japan) および 10 μ l の 25 mg/ml オプソニン化ザイモザン (Zymosan A; Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) を加え、攪拌したのち、マイクロプレート型ルミノメーター (AB-2350 Phelios; Atto Corporation, Tokyo, Japan) を用いて、37°C で 30 分間測定を行った。発光量の測定は全て 3 連で行い、平均値を用いた。30 分間の測定によって得られた発光量の変化 (relative light unit/s) を area under the curve (AUC) として算出した。化学発光法において全血を試料とした場合、好中球の数の増加に比例して発光強度が増加することから (秋山 et al., 2012), Mehrzad et al. (2001) の方法に従い、以下の計算式を用いて好中球数による補正を行った。

計算式：

$$CL_{PMN} (/cell) = CL_{whole\ blood} / [Total\ leukocyte\ number\ (cells/\mu l) \times \%PMN \times 20\ (\mu l)]$$

ここで、 CL_{PMN} とは好中球数により補正した発光量、 $CL_{\text{whole blood}}$ とは全血の測定により得られた発光量、 $\%PMN$ とは白血球における好中球の割合であり、 $20\ \mu\text{l}$ は 1 ウェルあたりに使用した全血の量を表す。補正によって得られた CL_{PMN} の値は、好中球活性酸素産生能として用いた。白血球における好中球の割合は、前述した「白血球百分比の測定」の項と同様の手法により測定した。

(8) 好中球への LPS 処理

LPS が好中球の活性酸素産生能に及ぼす影響を調べるために、健康牛 ($n = 27$) から採取した全血に 0, 0.1, 1, 10 EU/ml となるように LPS (*E.coli* O111: B4; Sigma-Aldrich Japan Inc., Tokyo, Japan) を加えて 37°C で 2 時間インキュベートした。全血に加えた LPS の濃度は、本章第 1 節で得られた子宮炎牛における末梢血中の LPS 濃度を参考にした。LPS を加えてインキュベートした全血は、PBS で 5 倍に希釈し、前述した「好中球活性酸素産生能の測定」の項と同様の手法により、化学発光を測定した。分娩後の時期による LPS への反応性の違いを調べるために、LPS 処理に用いた全血を、採血を行った乳牛の分娩後週数により 3 つのグループに分類して解析を行った。すなわち、分娩前 1–2 週 ($n = 8$)、分娩後 0–3 週 ($n = 11$)、分娩後 4–8 週 ($n = 8$) である。

(9) 統計解析

Shapiro-Wilk の W 検定により正規性の検定を行った後、パラメトリック検定による統計処理を実施した。健康牛と子宮炎牛における白血球ポピュレーション、リンパ球サブポピュレーションおよび化学発光量の経時的変化には反復測定-分散分析法 (Repeated-measures ANOVA) を用い、疾病グループ間 (健康牛と子宮炎牛)、時間 (分娩後週数)、疾病グループと時間との交互作用について検定

を行った。また、同一の分娩後週数におけるグループ間の違いを Unpaired *t*-test を用いて検定を行った。LPS が好中球の活性酸素産生能に及ぼす影響の解析では、同一の群内 (分娩後週数) において分散分析法 (ANOVA) を行い、有意な相互作用が認められた場合、0 EU/ml の LPS 値をコントロールとして Dunnett's test を用いて検定を行った。統計学的解析には Stat View 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, USA) および JMP 5.1 (SAS Institute Inc., Cary, USA) を用いた。 $P < 0.05$ の場合に有意差ありとした。全てのデータは mean \pm SEM で示した。

2-2-3 結果

(1) 白血球ポピュレーションの経時的変化

分娩前後の健康牛および子宮炎牛における末梢血白血球数の経時的変化を Fig. 2.2.3 に示した。総白血球数および好中球数において、健康牛および子宮炎牛との間に有意な差は認められなかったが、分娩後週数および疾病と分娩後週数との交互作用において有意な差が認められた ($P < 0.05$ および $P < 0.01$, Fig. 2.2.3a および b)。子宮炎牛におけるリンパ球数は有意に高い値で推移し、分娩後週数による有意な差が認められた ($P < 0.05$, Fig. 2.2.3c)。子宮炎牛における単球数は、有意に高い値で推移し、分娩後週数および疾病と分娩後週数との交互作用に有意な差が認められた ($P < 0.01$, Fig. 2.2.3d)。

同一の分娩後週数における疾病グループ間の比較において、健康牛に比べ子宮炎牛では分娩後 0 週 および 1 週に好中球数が有意に低下した。また、健康牛に比べ子宮炎牛では分娩前 1 週, 2 週および分娩後 5 週, 6 週および 8 週にリンパ球数が多く、分娩後 0 週, 2 週および 6 週に単球数が多かった。

(2) リンパ球サブポピュレーションの経時的変化

分娩前後の健康牛および子宮炎牛における末梢血リンパ球サブポピュレーションの経時的変化を Fig. 2.2.4 に示した。末梢血リンパ球中の CD4 陽性細胞の割合は、疾病グループ間で有意な差が認められなかったが、分娩後週数による有意な差が認められた ($P < 0.05$, Fig. 2.2.4a)。一方、CD8 陽性細胞の割合は、健康牛に比べ子宮炎牛で高値を示し ($P < 0.05$, Fig. 2.2.4b), CD4+ / CD8+ (CD8 陽性細胞に対する CD4 陽性細胞の割合) の値は低値を示した ($P < 0.05$, Fig. 2.2.4c)。

同一の分娩後週数における疾病グループ間の比較において、子宮炎牛におけ

る CD8 陽性細胞の割合は、分娩前 1 週および分娩後 0 週, 1 週, 2 週および 4 週において健康牛と比べ有意に高かった ($P < 0.05$, Fig. 2.2.4b)。

(3) 好中球活性酸素産生能の経時的変化

健康牛および子宮炎牛における化学発光量の経時的変化を Fig. 2.2.5 に示した。子宮炎牛における好中球の化学発光量は、健康牛と比べて有意に高い値で推移し ($P < 0.05$)、分娩後 0 週, 1 週, 2 週および 7 週において有意な差が認められた ($P < 0.05$)。また、疾病と分娩後週数との間に交互作用が認められた ($P < 0.01$)。

(4) LPS が好中球活性酸素産生能に与える影響

分娩前 1 – 2 週, 分娩後 0 – 3 週および分娩後 4 – 8 週の乳牛から採取した全血に LPS を加えてインキュベートした化学発光量の変化を Fig. 2.2.6 に示した。10 EU/ml の LPS を処理した全血における化学発光量は、分娩前 1 – 2 週, 分娩後 0 – 3 週および分娩後 4 – 8 週の乳牛において有意に増加した ($P < 0.05$)。一方、1 EU/ml の LPS を処理した全血における化学発光量は、分娩後 0 – 3 週の乳牛においてのみ有意な増加が認められた ($P < 0.05$)。

2-2-4 考察

本節では、炎症性子宮疾患の乳牛における分娩前後の末梢血白血球の動態変化を調べるために、末梢血中の好中球、リンパ球および単球のそれぞれの数の経時的変化を解析した。その結果、子宮炎牛では分娩直後に好中球数の減少および単球数の増加が認められた。分娩前後の子宮炎牛における末梢血中リンパ球数は、健康牛と比べて有意に高い値で推移し、特に CD8 陽性細胞の割合が増加した。さらに、子宮炎牛では好中球の活性酸素産性能が増加しており、末梢血中に存在する LPS がこの活性酸素産性能増加に関連していると考えられた。

(1) 自然免疫に及ぼす子宮炎の影響

細菌やウイルスなどの病原微生物の侵入に対する免疫応答は、初期の感染防御に働く生来備わった自然免疫（非特異的防御機構）と、免疫記憶による持続的な感染防御を担う獲得免疫（特異的防御機構）に分類される。自然免疫の主体となるのは好中球、マクロファージおよび樹状細胞などの食細胞である。一方、獲得免疫の主体となるのはリンパ球である。病原体に対する生体防御のためには、自然免疫と獲得免疫が調和して働くことが不可欠である。しかしながら、自然発生の炎症性子宮疾患における免疫機能の変化を調べた研究は少なく、免疫応答の主体となる好中球、マクロファージ（単球）およびリンパ球などの末梢血白血球がどのような動態を示すのか（白血球のポピュレーションの変化）については不明な点が多い。

好中球は、子宮に感染した細菌に対する自然免疫において中心的な役割を果たしている (Hussain, 1989)。本節において、健康牛および子宮炎牛のいずれにおいても、好中球数は分娩前に増加し、分娩直後に減少した。この末梢血白血球数の動態変化は、過去の報告と一致する (Cai et al., 1994; Mateus et al., 2002; Kim

et al., 2005)。血中コルチゾールが好中球数に影響することが報告されていることから (Preisler et al., 2000), 分娩前 1 週において認められた好中球数の一時的な増加は, 分娩に伴う血中コルチゾール濃度の増加によるものであると考えられる。一方, 分娩後の好中球数の減少は子宮や乳房などへの好中球の遊走によるものだと考えられる (Guidry et al., 1976)。また, 分娩後 0 週および 1 週の子宮炎牛の好中球数は, 健康牛と比べて有意に減少していた。Cai et al. (1994) も本研究と同様に, 子宮炎牛における分娩後の末梢血好中球数の減少を報告している。したがって, これらの研究結果は, 子宮の炎症に伴う子宮への好中球の遊走が健康牛よりも増加している可能性を示唆している。

子宮炎牛では, 分娩後 0 週において単球数の有意な増加が認められた。Cai et al. (1994) および Kim et al. (2005) も同様に, 炎症性子宮疾患牛における分娩後の単球数の増加を報告している。子宮炎牛における単球数増加の原因は明らかになっていないが, 分娩直後の胎盤停滞が関与しているのではないかと推察される。本研究で対象とした子宮炎牛は全て, 胎子の娩出から胎盤の排出まで 12 時間以上を要しており, 胎盤停滞であると診断された。末梢血中の単球は, 組織に移行してマクロファージへと分化する。近年, 妊娠牛の子宮へのマクロファージの集積が報告されており (Oliveira and Hansen, 2008), マクロファージが胎盤の排出および分娩後の子宮回復に関与していることが示唆されていることから, 子宮炎牛では子宮の炎症に対応するために, 単球の増殖が促進した可能性が考えられる。さらに胎盤停滞牛では, マクロファージの機能低下が報告されていることから (Miyoshi et al., 2002), 子宮への遊走能の低下により, 末梢血中の単球数が増加した可能性も考えられる。

(2) 獲得免疫に及ぼす子宮炎の影響

本節のリンパ球数の解析に用いた子宮炎牛 5 頭のうち 4 頭は、メトリチェックにより評価した膣内粘液のスコアが分娩後 5 週までに 2 以下となり、子宮の炎症は消失したと診断された。それにも関わらず、子宮炎牛における末梢血リンパ球数は、分娩後 5 週、6 週、7 週および 8 週において健康牛よりも高値を示した。子宮内膜に浸潤したリンパ球は病原体の認識や排除に働くことにより、子宮の獲得免疫に中心的な役割を果たしている (Leung et al., 2000; Singh et al., 2008)。獲得免疫は遅い反応であり、感染後数日から数週間後に活性化することから、本研究でみられた子宮炎牛の高いリンパ球数の長期推移は、子宮の炎症が終息した後も、長期にわたって免疫応答の活性化が起こっていた可能性を示唆しており、獲得免疫の活性化が起こっていたと推察される。

リンパ球のうち T 細胞は、免疫応答の調節を行う CD4 陽性のヘルパー T 細胞と、ウイルス感染細胞などの除去を行う CD8 陽性のキラー T 細胞の 2 種に大別される。乳牛において、リンパ球サブポピュレーションである CD4 および CD8 のバランスは、分娩前後に生じる免疫機能の低下に関連することが示唆されている (Kimura et al., 1999)。本節において、子宮炎牛では健康牛と比べて CD8 陽性細胞の割合が増加し、それに伴って CD4⁺/CD8⁺ (CD8 陽性細胞に対する CD4 陽性細胞の割合) の値は減少した。ウシヘルペスウイルス 4 型は、炎症性子宮疾患の主要な原因ウイルスであり、子宮内膜に向性があるだけでなく、長期にわたってマクロファージに潜伏感染することが知られている (Donofrio and Santen, 2001; Donofrio et al., 2007)。このことから、子宮炎牛における CD8 陽性細胞の増加は、子宮およびマクロファージに感染したウイルスに対応するために生じた可能性が考えられる。

CD8 陽性細胞が乳牛の繁殖性に与える影響については、健康牛において、CD8

陽性細胞の割合が空胎日数と正の相関を示すことが報告されている(Banos et al., 2013)。事実，子宮炎牛における空胎日数は増加することが報告されている(Borsberry and Dobson, 1989; LeBlanc et al., 2002)。さらに，末梢血中の CD8 陽性細胞数の増加は，早期胚死滅や着床障害の増加に関係する可能性が考えられている。これらのことから，炎症性子宮疾患による免疫細胞の変化が繁殖機能低下に及ぼす原因として，子宮や卵巣局所への免疫細胞の影響に加えて，リンパ球サブポピュレーションの変化，特に子宮炎牛における CD4⁺/CD8⁺ の減少が分娩後 8 週まで持続的に認められたことから，子宮の炎症が消失した後も長期にわたって免疫細胞が応答していることだと考えられる。

(3) 化学発光法による好中球活性酸素産生能の検討

好中球の活性酸素産生能を評価するために，チトクローム C やミエロペルオキシダーゼを測定する方法 (Cai et al., 1994; Hammon et al., 2006) が用いられてきたが，好中球を単離する必要があるため，測定に長時間を要した。また，フローサイトメトリを用いる方法もあるが，特別な装置が必要である。近年，好中球が細菌を貪食する際に発する光を，発光増強剤であるルミノールによって増強することで，好中球の産生する活性酸素量を化学発光として簡便に検出できるようになった (Allen et al., 1972; Leino and Paape, 1993; 秋山 et al., 2012)。本節では，ウシ全血を試料とし，ルミノールで増強した化学発光を定量化することで，好中球の活性酸素産生能の評価を行った。好中球だけでなく，単球も細菌の貪食時に活性酸素を産生するが，単球の発する化学発光は好中球と比較して微弱であり，また，末梢血中の細胞数も少ないことから，化学発光は好中球の活性酸素産生能として評価することが可能であり (Lojek et al., 1997)，本節ではこの方法を用いて測定した。

(4) 好中球活性酸素産生能に及ぼす子宮炎の影響

生体内に細菌が侵入すると、好中球はサイトカインやケモカインなどの走化因子に反応して内皮細胞へ粘着し、感染巣に遊走する。感染局所に集まった好中球は、細菌を貪食し、同時に細胞膜に存在する NADPH 酸化酵素が活性化されることによりスーパーオキシド (O_2^-) を産生し、この O_2^- から派生する活性酸素により殺菌を行う (Bellavite, 1988)。健康な乳牛において、分娩前後には好中球の殺菌能が低下することが報告されている (Revelo and Waldron, 2010; Cai et al., 1994; Kehrlı and Goff, 1989)。本節の結果から、子宮炎牛は健康牛と比較して化学発光が高値で推移していたことから、好中球の活性酸素産生能が上昇していたと考えられる。好中球の活性酸素産生能は細菌に対する殺菌能に依存することから、子宮炎牛では子宮内に感染した細菌に反応して全身の免疫応答が活性化し、末梢血中の好中球の殺菌能を促進していたことが考えられる。好中球の過剰な活性化による活性酸素の産生は、炎症への過剰な反応を引き起こし、易感染性へとつながる可能性がある。好中球により産生された活性酸素は、殺菌に働くだけでなく、周囲に存在する正常な細胞を破壊することで、組織障害や臓器不全を引き起こすことが知られている (Shawcross et al., 2010)。そのため、子宮炎牛でみられた過剰な活性酸素の産生は、他の好中球を損傷することによる病原体への抵抗性の減少および組織障害の誘引により疾病を助長しているかもしれない。

本節で得られた結果と対照的に、子宮炎牛では、活性酸素の産生を触媒する酵素であるミエロペルオキシダーゼの活性が分娩後早期に低下するという報告がある (Hammon et al., 2006)。つまり、子宮炎牛では活性酸素の産生が低下する可能性があるということである。本節の結果と Hammon et al. (2006) の結果との相違点として、解析方法の違いが考えられる。本節の研究では全血を試料とし

て用いているのに対し、Hammon et al. (2006) は、全血から単離した好中球を用いて解析を行っている。本節の実験のように全血を使用した場合、他の免疫担当細胞やサイトカインとの相互作用により、好中球の活性酸素産生能が影響を受ける可能性があり、より生体内での反応に近い状態を反映していると考えられる。一方、好中球の単離操作は、細胞の生存性やその活性、さらには受容体発現に影響を与える可能性が考えられる (Papp and Smits, 2007; Krumrych et al., 2013)。したがって、本節の結果は子宮炎牛の生体内をより反映した現象をみていると考えられ、活性酸素産生能の持続的増加は免疫機能の亢進によるものであることを示唆している。

(5) 好中球活性酸素産生能に及ぼす LPS の影響

分娩後 0 週 から 2 週の間、子宮炎牛における活性酸素産生能の有意な上昇がみられた。この時期は、本章第 1 節において測定した血中 LPS 濃度がそれぞれのウシにおいてピークに達した時期 (分娩後 0.5 週から 3 週) と一致する。このことは、血中 LPS 濃度と好中球活性酸素産生能との間に何らかの関連性があることを示唆している。事実、子宮炎牛の血中で検出された LPS 濃度とほぼ同レベルである 1 EU/ml の LPS 処理により、分娩後 0 週から 3 週の健康牛から採取した血液の活性酸素産生能は有意に増加した。同様に、LPS は健康な乳牛の血液より単離した好中球の化学発光を増加させることが報告されている (Revelo and Waldron, 2012)。このことから、子宮の炎症により生じた末梢血中の LPS が好中球に直接作用して、もしくは LPS により刺激された単球などの産生するサイトカインにより、活性酸素の産生能が増加した可能性が考えられる。LPS により刺激されるサイトカインのうち、インターロイキン 8 は子宮内腔への好中球の遊走を促進し、活性酸素の産生を増加させることが知られて

いることから (Zerbe et al., 2003), 子宮への細菌感染により生じた LPS が, 好中球の活性酸素産生に影響を与えることにより免疫機能を変化させている可能性が考えられる。1 EU/ml の LPS 処理は, 分娩後 0 週 から 3 週 (分娩後早期) のウシにおいてのみ活性酸素の産生能を増加させた。このことから, 分娩後早期は他の時期と比較して LPS に対する反応性が高いことが推察される。しかしながら, 分娩後の時期による LPS への反応性の違いを詳細に調べるためには, 分娩後の乳牛への LPS 投与など, さらなる研究が必要とされる。

子宮炎牛における好中球活性酸素産生能の増加は二峰性を示し, 分娩後早期だけでなく, 分娩後 7 週においても健康牛と比較して有意に増加していた。この二峰性増加の発生機序は不明だが, 子宮炎牛の血中 LPS 濃度が分娩後 6 週において, 健康牛と比較して有意に高い傾向が認められたことから, 末梢血中に継続的に存在する LPS による影響の関与が推察される。

(6) 結論

以上のとおり, 子宮炎牛では末梢血白血球のポピュレーションが変化していることが明らかになり, 子宮の炎症が全身の免疫応答に影響を与える可能性が示された。また, 子宮炎牛では好中球の活性酸素産性能が増加しており, 過剰な活性酸素の産生により病原体への抵抗性が減少している可能性が示された。さらに, 末梢血中に存在する LPS がこの活性酸素産生能増加と関連していると考えられた。末梢血白血球の数および機能の変化は子宮の炎症が消失した後も継続していたことから, 分娩後早期の炎症が長期にわたって全身の免疫応答に影響を与え続ける可能性が示唆された。炎症性子宮疾患では, 治癒後も卵巣への影響が持続するキャリアオーバー効果の存在が示唆されているが (Green et

al., 2011), この現象には分娩後早期の炎症による末梢血白血球への長期的な影響が関与しているのかもしれない。

2-2-5 図および表

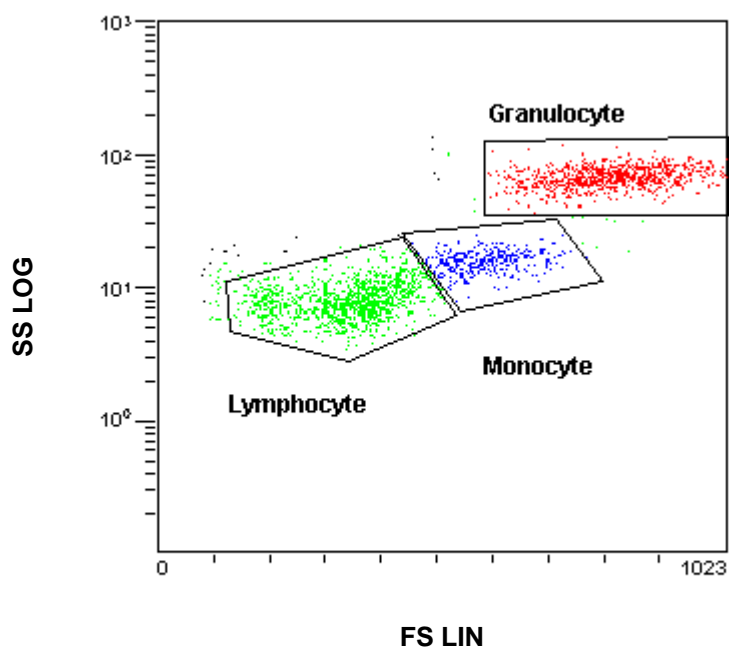


Fig. 2.2.1 Representative acquisition dot plots to analyze differential counts of bovine peripheral blood leukocytes. Forward (x-axis) and side (y-axis) scatter plots to analyze cells on the basis of size (x-axis) and granularity (y-axis). The granulocytes, monocytes, and lymphocytes gates are circled.

Table 2.2.1 Monoclonal antibodies (mAb) to bovine blood leukocyte used for the flow cytometric analysis

Specificity	mAb	Ig isotype	Conjugation	Dilution
CD4	CC8	IgG _{2a}	FITC ^a	1/50
CD8	CC58	IgG ₁	RPE ^b	1/10

^aFluorescein Isothiocyanate, ^bR-phycoerythrin

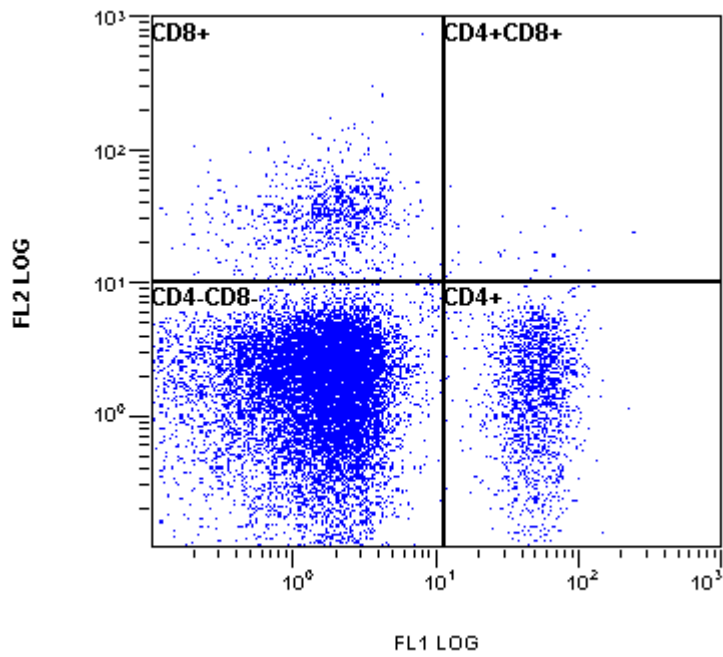


Fig. 2.2.2 Representative acquisition dot plots to analyze differential counts of bovine peripheral blood leukocytes. Dual labeling for CD4+ (x-axis) and CD8+ (y-axis) among the cells in the lymphocyte gate.

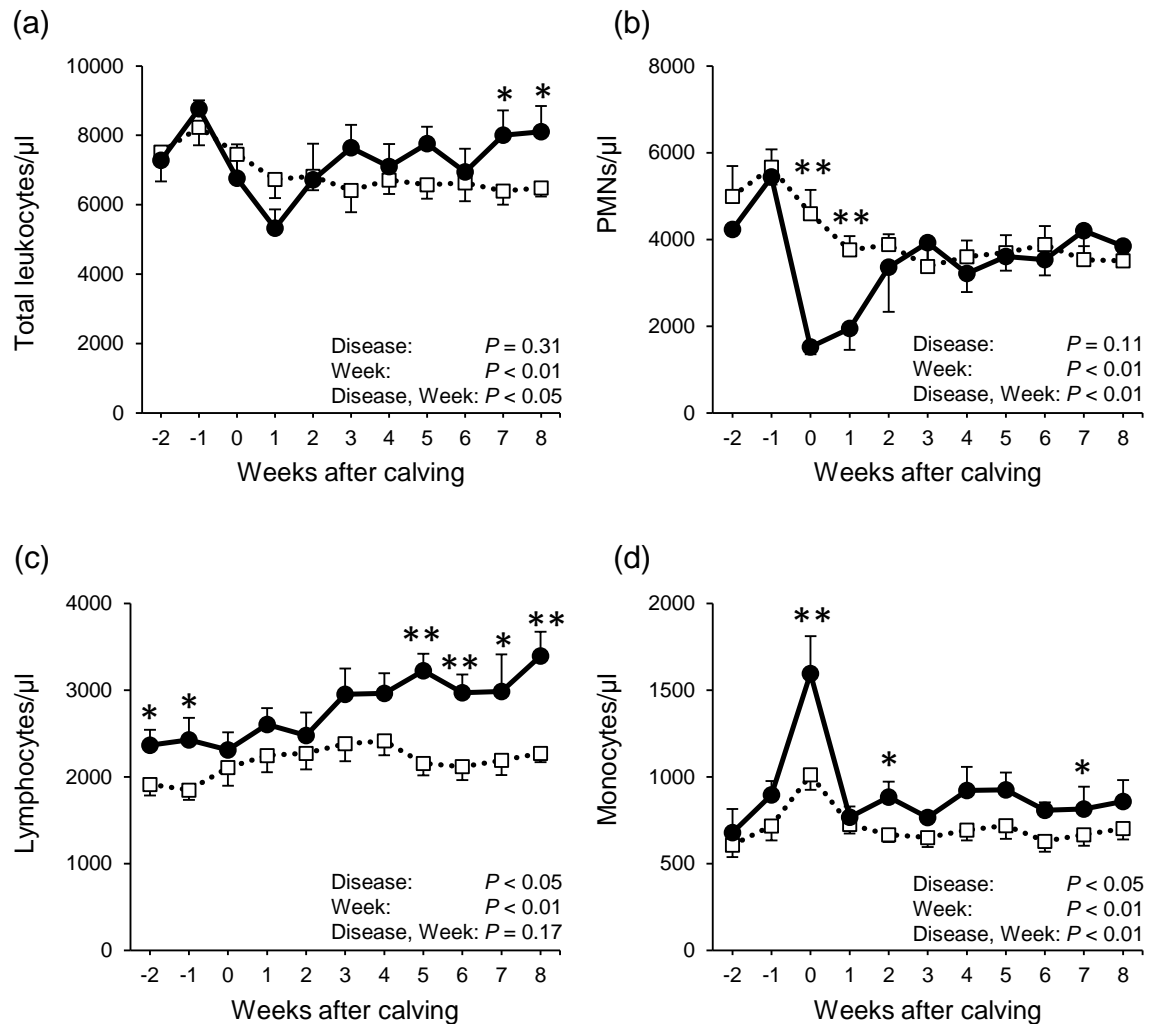


Fig. 2.2.3 The changes of the number of (a) total leukocytes, (b) neutrophils, (c) lymphocytes, and (d) monocytes in healthy cows (open squares, $n = 11$) and cows with metritis (solid circles, $n = 5$). All values are shown as means \pm SEM. Values with asterisks are different between diseases within the same sampling day (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$).

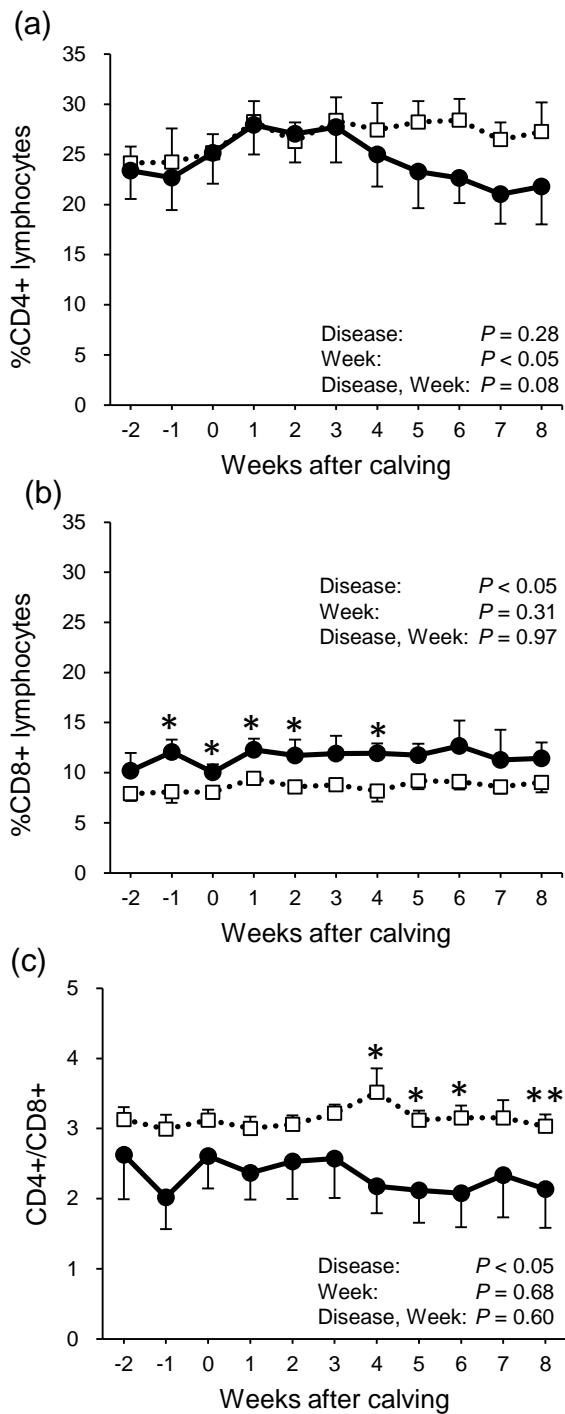


Fig. 2.2.4 Changes in blood lymphocyte subpopulations during peripartum period. Percentage of (a) CD4⁺ T cells and (b) CD8⁺ T cells, and (c) CD4⁺/CD8⁺ ratio in healthy cows (open squares, $n = 6$) and cows with metritis (solid circles, $n = 3$). All values are shown as means \pm SEM. Values with asterisks are different between diseases within the same sampling day (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$).

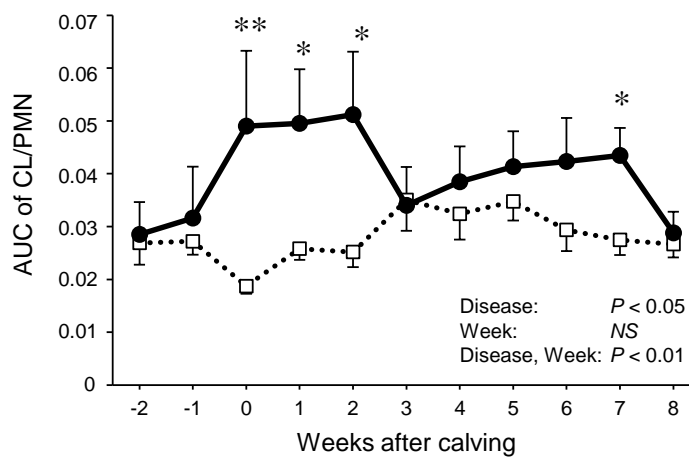


Fig. 2.2.5 The changes of (a) area under curve (AUC) of chemiluminescence (CL) per a PMN in healthy cows (open squares, $n = 11$) and cows with metritis (solid circles, $n = 5$). All values are shown as means \pm SEM. Values with asterisks are different between diseases within the same sampling day (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$).

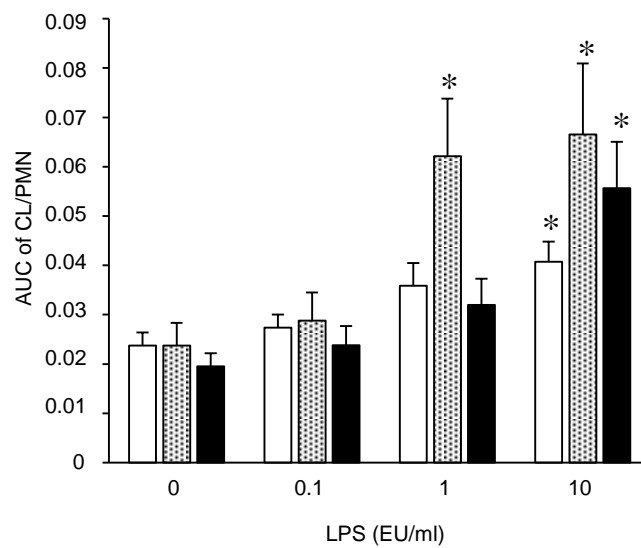


Fig. 2.2.6 Effect of lipopolysaccharide (LPS) on chemiluminescence (CL) activity of cows in 2 to 1 week before calving (white bar, $n = 8$), 0 to 3 weeks postpartum (gray dotted bar, $n = 11$), and 4 to 8 weeks postpartum (black bar, $n = 8$). All values are shown as means \pm SEM. Values with asterisks are different from values at control group within the same postpartum period (*: $P < 0.05$).

第 3 章

卵胞機能に及ぼす炎症性子宮疾患の影響

第 1 節

子宮炎の一症例における

末梢血，子宮内，卵胞液中 LPS 濃度の比較

3-1-1 目的

第 2 章において，子宮炎に罹患した牛では血中 LPS 濃度が長期にわたって上昇していることが明らかになった。このことから，子宮内で産生された LPS が何らかの経路によって血中に移行する可能性が考えられる。また Herath et al. (2007) は，重度の子宮内膜炎牛において，卵胞液中から LPS が検出されたことを報告している。このことは，子宮への細菌感染により生じた LPS が，血中のみならず卵胞液中にも移行する可能性を示唆している。しかしながら，血中もしくは卵胞液中への LPS の移行を実証した研究はなく，その経路についても明らかになっていない。産褥期の乳牛の LPS 濃度に関する過去の研究は，卵胞液中の LPS 濃度のみを調べた研究 (Herath et al., 2007)，もしくは末梢血中と子宮内貯留液中の LPS 濃度を調べた研究 (Dohmen et al., 2000; Mateus et al., 2003) であり，同一個体内での末梢血，子宮内および卵胞液における LPS 濃度の測定および比較は行われていない。そこで本節では，子宮炎の自然発生症例における血中，子宮内貯留液中および卵胞液中の LPS 濃度を比較検討することにより，LPS が子宮以外の器官に移行する可能性について検証することを目的とした。

さらに、子宮の炎症と LPS との関連性をより明確にするため、子宮の細菌学的および病理組織学的解析を行った。

3-1-2 材料および方法

(1) 症例

症例は北海道十勝管内にて飼養されていたホルスタイン種乳牛 (2011 年 10 月 2 日生まれ, 雌) であり, 2013 年 9 月 12 日に正常分娩した後, 食欲不振を主訴として, 同年 9 月 14 日 (2 歳, 第 1 病日) に初診となった。分娩後 2 週間以上にわたり, 39.5°C 以上の発熱および食欲不振を呈し, 外陰部からは悪臭を伴う水様赤褐色の膿様帯下の排出を認めた。第 6 病日までは, テトラサイクリン製剤の子宮内および静脈内投与が連日行われ, 以降第 13 病日まではセフチオフルナトリウムの筋肉内投与が行われたが, 解熱しなかった。5-MHz リニアプローブ (HS-101V; Honda Electronics Co., Ltd., Toyohashi, Japan) を装着した超音波画像診断装置 (HLV-155; Honda Electronics Co., Ltd.) を用いたエコー検査により, 子宮の拡張と膿の貯留が確認された。乳房炎やその他炎症性疾患の徴候がみられなかったことから子宮炎と診断され, 第 23 病日に病理解剖を行った。

(2) 血液の採取

病理解剖を実施する前日 (第 22 病日) に血漿分離用ヘパリン含真空採血管 (5 ml 採血用, VP-H050K; TERUMO, Tokyo, Japan) を用いて尾静脈から採血を行った。採取した血液は直ちに氷冷し, 採血後 1 時間以内に遠心分離 (1,750 × g, 4°C, 15 分間) を行った。上清として得られた血漿は, エンドトキシンフリーのシリコナイズドチューブに移し, LPS 測定まで -30°C で保存した。

(3) 病理組織学的検査

左右子宮角および子宮体より採取した組織は 10% ホルマリン溶液 (帯広畜産大学 基礎獣医学研究部門 病態病理学教室より提供) を用いて固定し、パラフィン包埋を施した。包埋した組織は 4 μm 厚に薄切し、脱パラフィン処理を行った後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡を用いて観察した。

(4) 細菌学的検査

左右の子宮角より滅菌綿棒 (Eiken Chemical, Obihiro, Japan) を用いて無菌的にスワブを採取し、好気培養および嫌気培養を行い、細菌同定を行った。細菌の同定は、民間の検査センター (Daiichi Kishimoto Clinical Laboratory, Obihiro, Japan) に依頼した。

(5) 子宮内貯留液の採取

18G 注射針を装着した 20 ml シリンジを用いて、右子宮角より子宮内貯留液を無菌的に採取した。左子宮角には採取可能な貯留液は認められなかった。採取した子宮内貯留液は遠心分離 ($600 \times g$, 4°C , 30 分間) し、上清部分をエンドトキシンプリーのシリコナイズドガラス試験管に取り、LPS 測定まで -30°C で保存した。

(6) 卵胞液の採取

22G 注射針を装着した 2.5 ml シリンジを用いて、卵巣の表面に見える卵胞の側面より卵胞液を吸引採取した。卵胞液は遠心分離 ($1,500 \times g$, 4°C , 1 分間) し、

上清部分をエンドトキシンフリーのシリコナイズドガラス試験管に取り，LPS 測定まで -30°C で保存した。卵胞液の吸引は，卵巢の表面上に見える全ての胞状卵胞より行った ($n = 7$)。

(7) LPS 濃度測定

血漿，子宮内貯留液および卵胞液中 LPS 濃度の測定は，第 2 章第 1 節と同様の手順で行った。

(8) 卵胞液中のステロイドホルモン濃度測定

2 抗体法 Enzyme Immunoassay (EIA) により，卵胞液中のプロジェステロンおよびエストラジオールの濃度を測定した (Miyamoto et al., 1992)。卵胞液中からのステロイドホルモン抽出処理は行わなかった。プロジェステロンの濃度測定は， $100\ \mu\text{l}$ のプロジェステロン抗体溶液 (1 : 300,000) と $100\ \mu\text{l}$ の Horseradish peroxidase (1 : 60,000) を $15\ \mu\text{l}$ の卵胞液に加えて混和し， 4°C にて 20 時間以上振盪させた。プロジェステロンの標準曲線は，50 から 50,000 pg/ml の範囲であり，アッセイ内変動およびアッセイ間変動はそれぞれ 6.5% および 8.7% であった。エストラジオールの濃度測定は， $100\ \mu\text{l}$ のエストラジオール抗体溶液 (1 : 150,000) を $15\ \mu\text{l}$ の卵胞液に加えて混和し， 4°C にて 24 時間振盪させた。その後，抗体溶液と卵胞液の混合溶液を捨て， $100\ \mu\text{l}$ の Horseradish peroxidase (1 : 40,000) を加えて混和し， 4°C にて 2 時間振盪させた。エストラジオールの標準曲線は，2 から 2,000 pg/ml の範囲であり，アッセイ内変動およびアッセイ間変動はそれぞれ 7.7% および 4.9% であった。

3-1-3 結果

(1) 病理解剖学的所見

子宮の病理解剖学的所見において、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 24.6 cm 幅 6.0 cm, 左子宮角; 長さ 18.0 cm 幅 2.4 cm, Fig. 3.1.1a)。子宮に割を入れると、子宮体部から右子宮角にかけて緑色白色から黄白色クリーム状の膿が貯留していた。右子宮の子宮内膜粘膜面に粟粒大の硬結感を有する結節が散在しており、左右子宮角の子宮内膜は充血していた。肝臓は左葉を中心に橙黄色に褪色し、断面では肝実質も同様に褪色していた。子宮および肝臓以外の部位に異常は認められなかった。

(2) 病理組織学的所見

右子宮角では、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 (Fig. 3.1.1b)。また子宮内膜では、線維化を伴う子宮腺上皮細胞の変性、脱落が散見された。左子宮角でも同様の病変がみられたが、右子宮角よりも軽度であった。

(3) 細菌学的所見

右子宮角の子宮内貯留液からは、好気性のグラム陽性細菌である *β-streptococcus group C* が検出された。

(4) 血液、子宮内貯留液および卵胞液中 LPS 濃度

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 (Table 3.1.1)。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 ($2.42 \pm$

4.40, Mean \pm SD)。

(5) 卵胞液中のステロイドホルモン濃度

卵胞液中のエストラジオール (E) 濃度とプロジェステロン (P) 濃度の比である E/P 比を Table 3.1.1 に示した。卵胞液中の E/P 比は 0.01 から 0.32 であった (0.11 \pm 0.13, Mean \pm SD)。卵胞液中の LPS 濃度と E/P 比との相関関係をピアソンの相関係数検定により解析したところ, $r = -0.17$ および $P = 0.73$ であり, 有意な相関関係は認められなかった。

3-1-4 考察

本節では、子宮炎の自然発生症例における血中、卵胞液中および子宮内貯留液中の LPS 濃度の測定および比較を行った。その結果、本症例における卵胞液中の LPS 濃度は、血中とほぼ同じレベルであり、子宮内貯留液中の LPS 濃度より低いことが明らかになった。

(1) 卵胞への特異的な LPS 蓄積の可能性

LPS 濃度の測定を行った 7 つの卵胞のうち 1 つの卵胞において、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 つの卵胞の卵胞液中にだけ高濃度の 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-binding protein (LBP) の存在が挙げられる。LBP は肝臓で産生される急性相タンパクであり、全身を体循環し、LPS を捕捉して複合体を形成し、細胞膜上に存在する TLR4 などの LPS 受容体に認識される (Schumann et al., 1990)。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 (Zweigner et al., 2001)。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可能性が推察される。

(2) 卵胞液中 LPS 濃度と卵胞機能との関連性

卵胞の機能的指標の一つに、卵胞液中のエストラジオール (E) 濃度とプロジェステロン (P) 濃度の比である E/P 比が用いられている。この評価方法において、E/P 比が 1 以上の卵胞はエストラジオール活性型、つまり活発にステロイドホルモン産生を行っている卵胞であり、E/P 比が 1 未満の卵胞はエストラジオール不活性型として分類され、閉鎖に向かう卵胞であることが報告されている (Ireland and Roche, 1983; Grazul-Bilska et al., 2007)。本症例で解析を行った 7 つの卵胞の E/P 比は全て 1 未満であり、閉鎖に向かう卵胞であることが示されたが、卵胞液中の E/P 比と LPS 濃度との間に有意な相関関係は認められなかった (ピアソンの相関係数 $r = -0.17$, $P = 0.73$)。本節で用いた病態牛の性周期は不明であるが、分娩後 2 週間以上にわたり、 39.5°C 以上の発熱および食欲不振を呈し、外陰部からは悪臭を伴う水様赤褐色の膿様帯下の排出を認めたことから、卵巣機能が極めて低下していたと考えられる。

(3) 卵胞液中 LPS 濃度と子宮の炎症との関連性

LPS は、*E. coli* を始めとするグラム陰性細菌から産生されるが、本症例では子宮内貯留液からグラム陰性細菌は検出されなかった。Williams et al. (2007) は、子宮への *E. coli* の感染が起こるのは主に分娩後最初の 1 週であり、2 週目以降は生理的な子宮の修復とともに減少することを報告している。同様に、本症例は分娩直後の急性炎症からの回復期であり、子宮内に感染していた *E. coli* は子宮の修復とともに既に排泄されていた可能性が考えられる。事実、子宮内膜の病理組織学的評価により、症例は急性炎症から慢性炎症への移行期の病態であったことが示されている。この卵胞液中の LPS 濃度と子宮の炎症状態との不

一致は、子宮の炎症が消失した後も、卵胞液中に LPS が蓄積し、存在し続けるという可能性を示唆している。

(4) 結論

本節では、子宮炎の自然発症症例における血中、卵胞液中および子宮内貯留液中の LPS 濃度の相互連関が明らかになった。卵胞液中の LPS 濃度は、血中とほぼ同じレベルであり、子宮内貯留液中の LPS 濃度よりも低かった。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よりもはるかに高濃度の LPS が存在していたことから、子宮の炎症によって生じた LPS が、特異的もしくは選択的に卵胞に蓄積する可能性が示唆された。一方、高濃度の LPS を含む卵胞が存在していたにも関わらず、子宮からは LPS を産生するグラム陰性細菌が検出されなかった。そのため、卵胞液中に存在していた LPS と子宮の炎症との関連性は明確にはならなかった。本節で得られた知見は単一の症例に限定されたものであり、さらに症例数を増やした詳細な検討が必要であると考えられる。

3-1-5 図および表

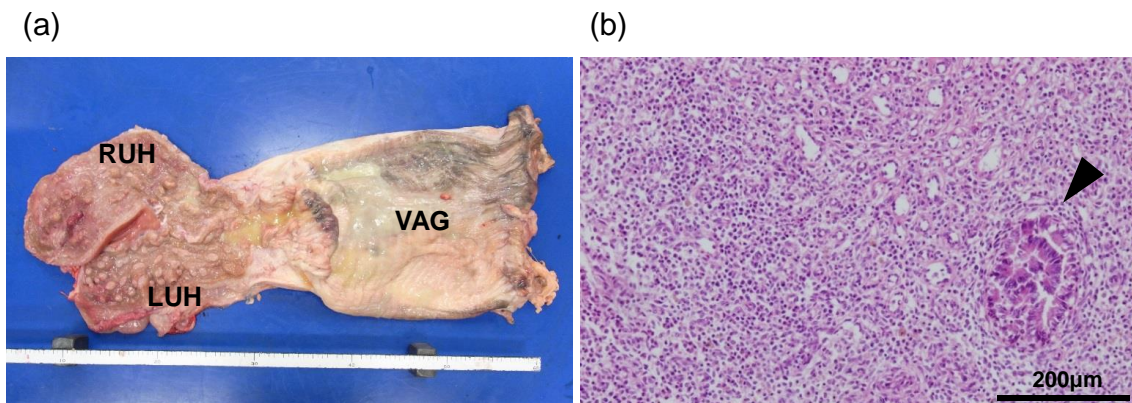


Fig. 3.1.1 (a) The right uterine horn was enlarged compared to the left uterine horn (right uterine horn; length of 24.6 cm and width of 6.0 cm, left uterine horn; length of 18.0 cm and width of 2.4 cm), and the mucosa of both uterine horns was congested. RUH: right uterine horn, LUH: left uterine horn, VAG: vagina. (b) The uterine endometrium of the right uterine horn shows prominent infiltration of neutrophils, lymphocytes, macrophages, and plasma cells. Fibrosis with atrophy and depletion of endometrial glands (arrowhead) were observed. Haematoxylin and eosin staining. Scale bar = 200 μ m.

Table 3.1.1 Concentrations of lipopolysaccharide (LPS) in plasma, uterine fluid, and follicular fluid of a clinical case of bovine metritis.

	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 Follicle position: LO; left ovary, RO; right ovary

^b The ratio of estradiol and progesterone concentration in the follicular fluid

第 2 節

子宮の炎症と卵胞液中 LPS 濃度および卵胞機能との関連性

3-2-1 目的

本章第 1 節の結果から、子宮炎の自然発生症例では、子宮内貯留液および血中よりも高濃度の LPS を卵胞液中に含む卵胞が存在したことが明らかとなった。しかしながら、子宮では LPS を産生するグラム陰性細菌の感染が認められず、子宮の炎症と卵胞液中に存在していた LPS との関連性は明確にならなかった。ウシ生体内での LPS 濃度の上昇が報告されている疾病としては、子宮炎、乳房炎およびルーメンパラケラトシス等が挙げられる (Motoi et al., 1993; Mateus et al., 2003; Hakogi et al., 1989; Herath et al., 2007)。本章第 1 節で解析を行った症例では、乳房およびルーメンに異常が認められなかったことから、卵胞液中の LPS は子宮の炎症に由来していた可能性が極めて高いと考えられる。そこで本節では症例数をさらに増やし、肉眼的および組織学的に評価した子宮の炎症度合と、卵胞液中の LPS 濃度との関連性を調べることにより、子宮の炎症による卵胞への LPS 蓄積の可能性について検証することを目的とした。また、子宮の炎症度合と卵胞の性ホルモン産生との関連性についても解析し、炎症性子宮疾患が卵胞機能に及ぼす影響について検証した。

3-2-2 材料および方法

(1) 子宮および卵巣の採取

北海道畜産公社十勝事業所家畜処理場で屠殺された 26 頭のホルスタイン種経産牛から採取した子宮および卵巣を実験に用いた。個体の月齢、性周期およ

び産歴については考慮せず、卵巣疾患が認められるものは除外した。子宮および卵巣は屠殺後 20 分以内に摘出した。

子宮は 後述する 「子宮の肉眼的評価」の項に示す手順で肉眼的評価を行った後、子宮内膜と子宮筋層の両方を含むように子宮を切り出した。採取した子宮は、10% ホルマリン溶液 (帯広畜産大学 基礎獣医学研究部門 獣医病理学教室より提供) に浸漬して固定を行い、組織学的評価に供した。

摘出した卵巣の表面に付着した血液および組織片を取り除いた後、0.03 mg/ml の Streptomycin (Sigma-Aldrich Japan Inc., Tokyo, Japan) および 0.75 µg/ml の Amphotericin B solution (Sigma-Aldrich Japan Inc., Tokyo, Japan) 含有 PBS で洗浄し、直ちに同溶液に浸漬した後、BSA 検査の判定結果が出る翌日まで公社内保管室の冷蔵庫 (4°C) で保管した。

(2) 子宮の肉眼的評価

子宮の外観として色、左右対称性および触感を記録し、さらに断割後に子宮内膜の充血度合および厚み、貯留液の量および臭いと性状、浮腫の有無、子宮小丘の大きさを記録した。これらの所見をもとに子宮の炎症度合は、軽度、中等度および重度の 3 つに分類した。

(3) 子宮の組織学的評価

ホルマリン固定した組織をパラフィン包埋した後、2 µm 厚に薄切した。薄切切片は脱パラフィン処理を行い、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して光学顕微鏡 (倍率 400 倍) により観察した。

子宮への炎症性細胞の浸潤評価は、顕微鏡の一視野 (3.6 mm²) あたりの好中球、リンパ球およびマクロファージの数をそれぞれ計測して行った。細胞の計

測は子宮内膜では 3 箇所、子宮筋層では 2 箇所において行い、それぞれの平均値を算出した。炎症性細胞数の計測は、3 人の観察者がそれぞれ行い、3 人の計測値の平均値を解析に用いた。

(4) 卵胞液の採取

22G の注射針を装着した 2.5 ml シリンジを用いて、卵巣表面に見える卵胞の側面から卵胞液を吸引採取した。卵胞液を 1.5 ml マイクロチューブに移し、卵胞液の重さを計測した。卵胞の大きさは、吸引採取した卵胞液の重さから、以下の計算式を用いて算出した (Murasawa et al., 2005)。

計算式： $y = 12.96x^{0.31}$ ($y =$ 卵胞直径 [mm], $x =$ 卵胞液の重さ [g])

卵巣内に共存する卵胞の数や黄体の有無に関わらず、最も直径の大きい卵胞 (F1 卵胞, 平均直径 14.1 ± 0.6 mm, $n = 23$) および 2 番目に直径の大きい卵胞 (F2 卵胞, 平均直径 11.4 ± 0.6 mm, $n = 15$) を実験に用いた。実験に用いた卵胞は全て直径 8 mm 以上であった。卵胞液は遠心分離 ($1,500 \times g$, 4°C , 1 分間) した後、上清をエンドトキシンフリーのシリコナイズドガラス試験管に取り、LPS 測定まで -30°C で保存した。沈殿した顆粒層細胞は、RNA 抽出まで -80°C で保存した。

(5) 卵胞液中 LPS 濃度の測定

卵胞液中の LPS 濃度の測定は、第 2 章第 1 節と同様の手順で行った。

(6) 卵胞液中のステロイドホルモン濃度測定

卵胞液中のプロゲステロンおよびエストラジオールの濃度の測定は、第 3 章第 1 節と同様の手順で行った。

(7) 統計解析

卵胞液中 LPS 濃度と子宮内膜への好中球の浸潤数との関連性においては、Shapiro-Wilk の W 検定により正規性の検定を行った後、Unpaired *t*-test を用いて検定を行った。卵胞液中 LPS 濃度およびステロイドホルモン濃度と肉眼的評価による子宮の炎症度合との関連性においては、Analysis of variance (ANOVA) 法を用いて検定を行った。卵胞液中のステロイドホルモン濃度と子宮内膜への炎症性細胞の浸潤数との関連性においては、Pearson's correlation coefficient を求めた。統計学的解析には Stat View 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, USA) および JMP 5.1 (SAS Institute Inc., Cary, USA) を用い、 $P < 0.05$ の場合に有意差があると判断した。

3-2-3 結果

(1) 子宮への炎症性細胞の浸潤

子宮内膜および子宮筋層の組織像を Fig. 3.2.1 に示した。健康な子宮内膜 (Fig. 3.2.1a) では炎症性細胞の浸潤は認められなかったが、炎症を起こしている子宮内膜 (Fig. 3.2.1b) および子宮筋層 (Fig. 3.2.1c) において、好中球、リンパ球およびマクロファージの浸潤が認められた。子宮内膜における顕微鏡一視野あたりの好中球、リンパ球およびマクロファージの浸潤細胞数は、それぞれ $0 - 84.2$ (14.4 ± 23.6 , Mean \pm SD) 個, $11.3 - 110.9$ (37.2 ± 20.8) 個および $0.7 - 55.9$ (6.4 ± 10.2) 個であった (Fig. 3.2.1d)。一方、子宮筋層への好中球、リンパ球およびマクロファージの浸潤細胞数は、それぞれ $0 - 14.0$ (1.5 ± 3.5) 個, $0.5 - 18.3$ (5.0 ± 4.0) 個および $0 - 2.0$ (0.4 ± 0.5) 個であり (Fig. 3.2.1e), 子宮内膜においてより多くの炎症性細胞の浸潤が認められた。

(2) 卵胞液中の LPS 濃度

ウシ大卵胞における卵胞液中 LPS 濃度の結果を Fig. 3.2.2 に示した。ウシ大卵胞において、卵胞液中の LPS 濃度は $0.2 - 2.0$ EU/ml の範囲で分布した (0.6 ± 0.1 EU/ml, Mean \pm SD, Fig. 3.2.2)。LPS 濃度の中央値が 0.5 EU/ml であったことから、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 (low LPS; 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 (high LPS; 0.9 ± 0.1 EU/mL, $n = 13$) として分類した。以降の解析は全て低 LPS 卵胞と高 LPS 卵胞との比較を行った。

(3) 肉眼的評価および組織学的評価による子宮の炎症度合と卵胞液中 LPS 濃度との関連性

肉眼的評価および組織学的評価による子宮の炎症度合と卵胞液中 LPS 濃度の結果を Fig. 3.2.3 に示した。肉眼的評価による子宮の炎症度合において、低 LPS 卵胞に付属する 13 個の子宮における炎症度合の分布は、軽度炎症が 3 個、中等度炎症が 6 個、重度炎症が 4 個であった (Fig. 3.2.3a)。一方、高 LPS 卵胞に付属する 13 個の子宮における炎症度合の分布は、軽度炎症が 3 個、中等度炎症が 7 個、重度炎症が 3 個であり、卵胞液中の LPS 濃度による炎症度合の違いは認められなかった。

組織学的評価による子宮の炎症度合において、高 LPS 卵胞と低 LPS 卵胞のそれぞれに付属していた子宮の子宮内膜における好中球、リンパ球およびマクロファージの浸潤細胞数は、低 LPS 卵胞と高 LPS 卵胞との間に有意な差は認められなかった (Fig. 3.2.3b-d)。

(4) 肉眼的評価および組織学的評価による子宮の炎症度合と卵胞液中ステロイドホルモン濃度との関連性

肉眼的評価および組織学的評価による子宮の炎症度合と卵胞液中ステロイドホルモン濃度の結果を Fig. 3.2.4 に示した。肉眼的評価により炎症の度合が軽度、中等度および重度だと診断した子宮に付随する卵巣内卵胞において、いずれの炎症度合においても卵胞液中のエストラジオール濃度に変化は認められなかった (Fig. 3.2.4a)。また、卵胞液中のプロゲステロン濃度および E/P 比のいずれにおいても、子宮の炎症度合との間に関連性は認められなかった (データ記載なし, $P > 0.05$)。

組織学的評価による子宮内膜への炎症性細胞の浸潤数と卵胞液中エストラジオール濃度との関係についてみてみると、炎症性細胞の浸潤数におけるピアソンの相関係数はそれぞれ好中球で $r = 0.05$ 、リンパ球で $r = 0.21$ 、マクロファエー

ジで $r = -0.14$ (いずれも $P > 0.05$) であり, 有意な相関関係は認められなかった (Fig. 3.2.4b-d)。また, 卵胞液中のプロゲステロン濃度および E/P 比においても, 子宮内膜への炎症性細胞浸潤数との間に有意な相関関係は認められなかった (データ記載なし, いずれも $|r| < 0.4$, $P > 0.05$)。

3-2-4 考察

本節では、子宮の炎症による卵胞への LPS 蓄積の可能性について検証するため、食肉処理場にて採取した子宮および卵巣を用い、子宮の炎症度合と卵胞液中の LPS 濃度および卵胞機能との関連性を調べた。その結果、卵胞液中の LPS 濃度および卵胞でのステロイドホルモン産生のいずれにおいても、肉眼的および組織学的に評価した子宮の炎症度合との間に関連性は認められなかった。

(1) 組織学的評価による子宮の炎症度合の診断

これまで、炎症性子宮疾患の診断においては、子宮の超音波検査や膣内粘液の性状の評価、子宮内貯留液の細菌検査などの方法が用いられてきた (Dohmen et al., 1995; Kasimanickam et al., 2004; McDougall et al., 2007; Senosy et al., 2012; López-Helguera et al., 2012)。しかし、これらの方法は子宮の炎症による粘液の貯留や細菌の感染を間接的に評価しており、子宮自体の炎症を直接評価していない。サイトブラシによる子宮内膜の細胞診は、子宮内膜表面に付着している炎症性細胞の定量評価を可能にしたが、子宮組織、特に子宮筋層に浸潤している細胞を含めた総合的な評価は不可能であった。子宮の炎症度合を直接的かつ客観的に評価するためには、組織学的な評価が重要であるが、組織の採取は侵襲が大きく、生体では困難である。

本節では、食肉処理場にて採取した子宮を用いることにより、子宮内膜および子宮筋層の炎症度合を組織学的に定量化することが可能となった。子宮内膜および子宮筋層における好中球、リンパ球およびマクロファージの浸潤は、子宮筋層よりも子宮内膜において顕著であった。また、筋層への炎症性細胞の顕著な浸潤が認められた子宮の内膜では、筋層への細胞浸潤が軽度であったものよりも、炎症性細胞の浸潤数が増加していた。このことから、子宮の炎症は子

宮内膜側，つまり子宮の内腔より筋層に向かって波及していくと推察された。さらに，炎症の度合が重篤な場合において，子宮内膜だけでなく筋層にも炎症性細胞が浸潤する可能性が示された。

子宮の組織学的評価により子宮の炎症度合を評価した研究は少ない (Bonnett et al., 1991; Moraitis et al., 2004)。そのため，本研究で指標として用いた好中球・リンパ球・マクロファージの浸潤数がどのような意味を持つのかについては慎重に検討する必要がある。Moraitis et al. (2004) は，分娩後 26 日の乳牛における子宮内膜の微量生体採取法 (バイオプシー) を用いて採取した子宮の組織学的評価により，重度の子宮内膜炎罹患牛では子宮内膜への好中球およびマクロファージの浸潤数が増加していたことを報告している。また，Bonnett et al. (1991) は，子宮への *T. pyogenes* の感染細菌数と，子宮内膜への好中球の浸潤数に正の相関があることを示している。これらの研究報告および肉眼的評価によって軽度と診断した子宮と比較して，中等度もしくは重度と診断した子宮では，子宮内膜への好中球の浸潤数が有意に高かった (データ記載なし， $P < 0.05$) という本節の研究結果から，子宮への炎症性細胞の浸潤数が多いほど，子宮の炎症が重篤であると考えられ，炎症性細胞の浸潤と子宮の炎症度合との間に関連性のあることが推察された。

(2) 卵胞液中の LPS 濃度

ウシ卵巢に存在する直径 8 mm 以上の大卵胞の卵胞液からは，様々な濃度の LPS が検出された。本研究において卵胞液中から検出された LPS の濃度は 0.2 から 2.0 EU/ml であり，Herath et al. (2007) が報告した子宮内膜炎牛の卵胞液中の LPS 濃度 ($1,761 \pm 1,120$ EU/ml, Mean \pm SD) と比較すると低いことがわかる。この原因として，分娩後日数の違いが考えられる。本研究で使用した卵巢は食

肉処理場より採取したものであるため分娩後の日数は不明であるが, Herath et al. (2007) は, 分娩後 40 から 60 日の乳牛の卵巣を用いている。この分娩後日数の違いが卵胞液中の LPS 濃度に影響を与えた可能性が推察される。これに加え, 炎症の重篤度の違いにより, 卵胞液中の LPS 濃度に違いが生じた可能性も考えられる。

(3) 子宮の炎症と卵胞液中 LPS 濃度との関連性

卵胞液中の LPS 濃度と肉眼的および組織学的に評価した子宮の炎症度合との関連性を調べた本節の結果から, 肉眼的および組織学的評価による子宮の炎症度合と卵胞液中 LPS 濃度との間に関連性は認められなかった。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。このように, 子宮の炎症度合に関係なく卵胞液中に LPS が存在していた原因として, 以下の 2 つのことが考えられる。まず, *E. coli* 性の乳房炎やルーメンパラケラトーシスといった他の疾病の要因による末梢血中の LPS 濃度増加の可能性である。グラム陰性細菌の感染による重篤な壊疽性乳房炎や濃厚飼料の多給によりルーメン内環境が変化したウシでは, 血中から LPS が検出されている (Hakogi et al., 1989; Motoi et al., 1993)。しかし, これらの疾病を患ったウシの卵胞液中から LPS が検出されるかどうかは不明である。次に, 子宮へのグラム陰性細菌感染により生じた LPS が, 子宮の炎症が消失した後も卵胞液中に蓄積する可能性である。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 (Mateus et al., 2003) と, プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ の伝達が生じる対向流機構のような, 子

宮－卵巢間での特殊な局所循環が存在するという考え方 (Herath et al., 2007) 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、本節の研究から、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示唆された。

(4) 子宮の炎症と卵胞機能との関連性

子宮内膜炎牛の 40% において、卵胞の発育遅延や黄体が退行せずに存続して次の周期の卵胞発育・排卵を妨げる遺残黄体が見られる (Opsomer et al., 2000)。また、子宮内膜炎牛では、血中のエストラジオールおよびプロジェステロン濃度が低下することが報告されている (Sheldon et al., 2002; Williams et al., 2007)。このことから、子宮の炎症は卵巢の機能に影響を及ぼし、卵胞でのステロイドホルモン産生を低下させる可能性が推察される。しかしながら、本節の研究において、卵胞液中のエストラジオールおよびプロジェステロン濃度と肉眼的および組織学的に評価した子宮の炎症度合との間に関連性は認められなかった。過去の研究において、サイトブラシを用いた子宮内膜の細胞診により子宮内膜炎と診断され、その後治癒して子宮内膜からの多型核好中球の消失が確認された乳牛では、卵胞液中のエストラジオール濃度が低下し、プロジェステロン濃度が増加していたことが報告されている (Green et al., 2011)。このことは、子宮の炎症が治ったとしても、卵胞への影響が持続していたということを示していることから、子宮の炎症の卵巢機能へのキャリーオーバー効果の存在を示唆している。したがって、本研究においても同様に、子宮の炎症が治癒した後も、持続的に卵胞のステロイドホルモン産生に対して影響していたことが十分に推察される。

(5) 結論

肉眼的および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。このことは，子宮の炎症が消失した後も LPS が卵胞液中に蓄積していたことを示している。また，子宮の炎症度合と卵胞のステロイドホルモン産生との間にも関連性は認められなかった。子宮内膜炎から治癒したウシにおいて持続的な卵胞機能の低下が認められるキャリーオーバー効果の背景には，卵胞への LPS 蓄積による卵胞機能への影響が関与している可能性が推察された。

3-2-5 図および表

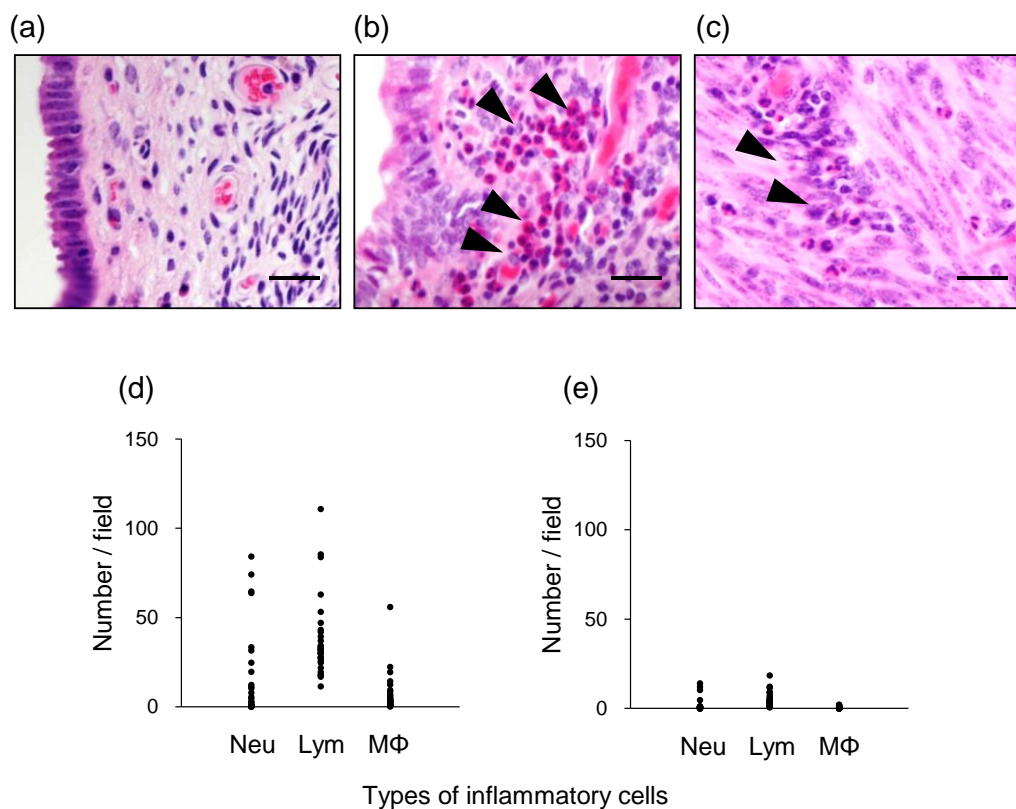


Fig. 3.2.1 (a) Healthy uterine endometrium and the infiltration of neutrophils (arrowhead) into uterine (b) endometrium and (c) myometrium. Number of neutrophils (Neu), lymphocytes (Lym), and macrophages (M ϕ) infiltrating the uterine (d) endometrium and (d) myometrium per microscopic field. Haematoxylin and eosin staining. Scale bar = 20 μ m.

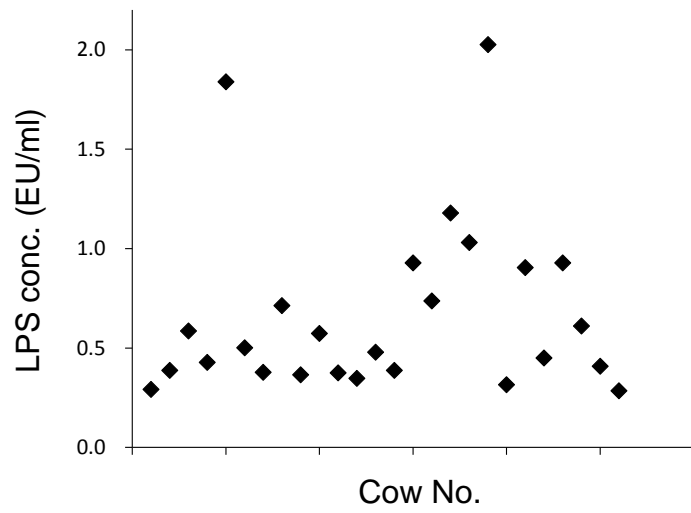


Fig. 3.2.2 The distribution of LPS concentration in follicular fluid. Each plot represents a cow ($n = 26$).

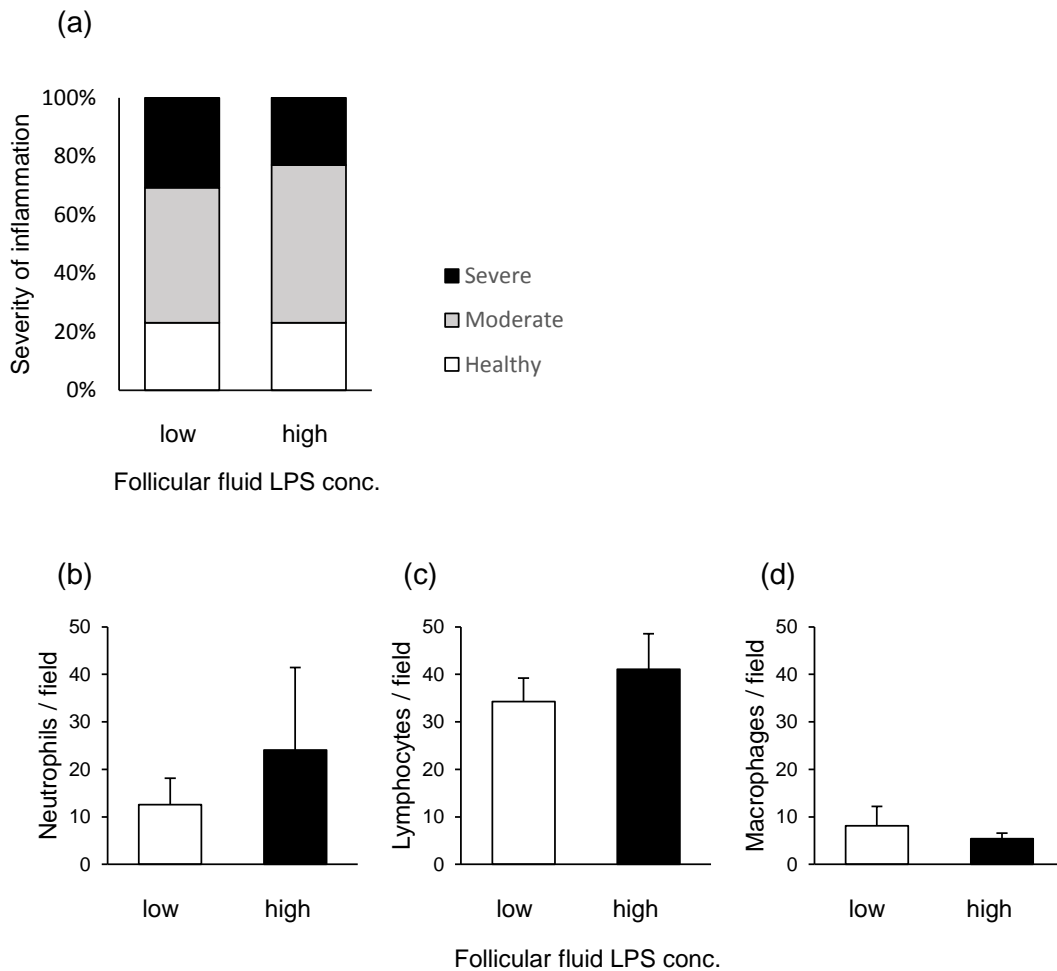


Fig. 3.2.3 The relationship between LPS concentration in the follicular fluid of large follicles (>8 mm diameter) from bovine ovaries and (a) the severity of uterine inflammation and the number of (b) neutrophils (Neu), (c) lymphocytes (Lym), and (d) macrophages (M ϕ) infiltrating the uterine endometrium. Cows with a follicular fluid LPS concentration of less than 0.5 EU/mL were categorized as ‘low’ (white bar, n = 13) and those with a concentration greater than 0.5 EU/mL were categorized as ‘high’ (black bar, n = 13). Values in Fig. 3.2.2 (b), (c), and (d) are shown as means \pm SEM.

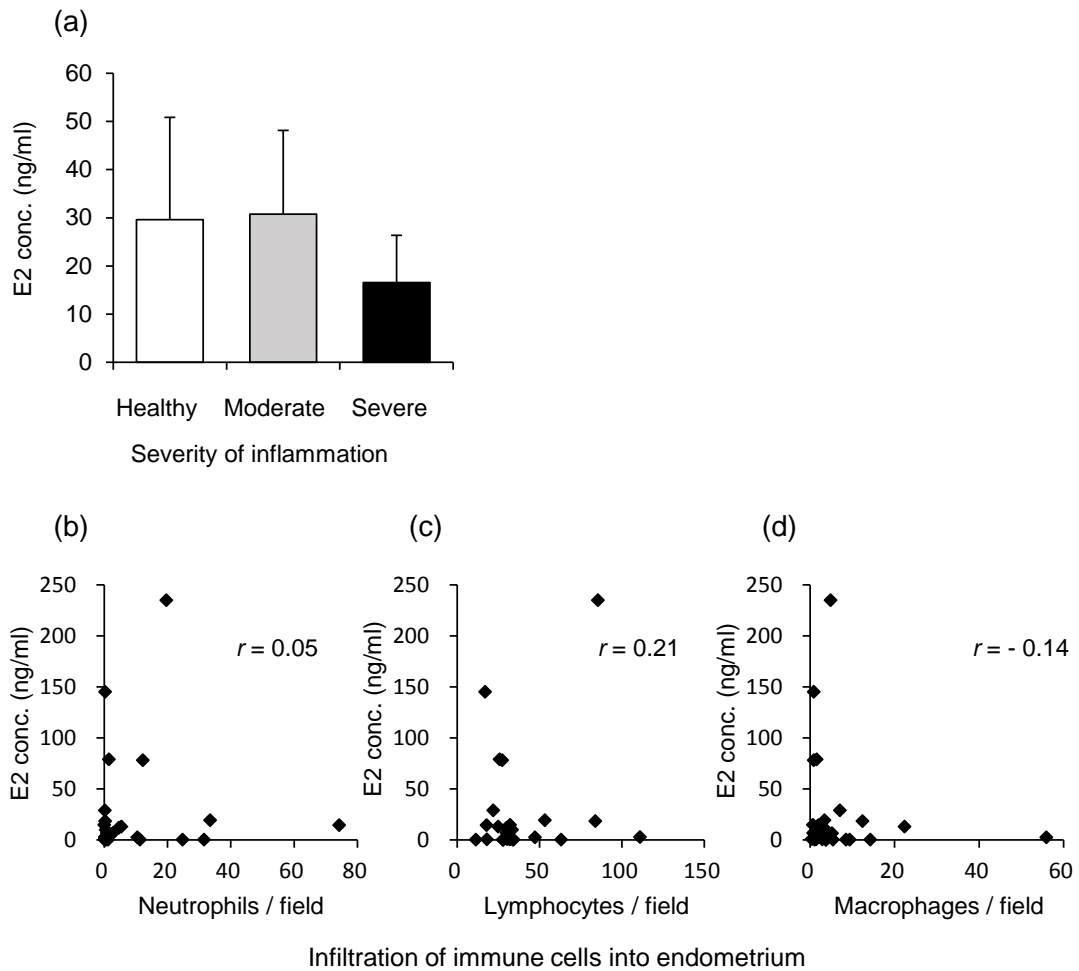


Fig. 3.2.4 The relationship between estradiol (E2) concentration in the follicular fluid of large follicles (>8 mm diameter) from bovine ovaries and (a) the severity of uterine inflammation (Healthy; white bar, $n = 6$, Moderate; gray bar, $n = 13$, Severe; black bar, $n = 7$) and the number of (b) neutrophils, (c) lymphocytes, and (d) macrophages infiltrated uterine endometrium. Values in Fig. 4.3.2a are shown as means \pm SEM. Pearson's correlation coefficients (r) are shown in Fig. 3.2.3b-d.

第 4 章

卵胞機能および卵母細胞の発生能に及ぼす LPS の影響

第 1 節

卵胞液中 LPS 濃度と卵胞機能との関連性

4-1-1 目的

第 3 章において、子宮の炎症が治癒した後も、卵胞液中の LPS が持続的に卵胞の機能に影響することにより、子宮の炎症がキャリーオーバー効果として卵胞機能に発現すると考えられた。そこで第 4 章では、卵胞機能に焦点を当て、卵胞を構成する卵胞膜細胞、顆粒層細胞および生殖細胞である卵母細胞のそれぞれに及ぼす LPS の影響を検証した。

まず本節では、卵胞液中の LPS が卵胞の機能に及ぼす影響を明らかにするために、ウシ生体内における卵胞液中の LPS 濃度と卵胞構成細胞におけるステロイドホルモン産生との関連性について検証した。

4-1-2 材料および方法

本節では、第 3 章第 2 節において測定した卵胞液中のステロイドホルモン濃度および LPS 濃度を用いて解析を行った。したがって、卵胞液の採取、卵胞液中のステロイドホルモン濃度および LPS 濃度の測定は第 3 章第 2 節と同様の手順で行った。また、第 3 章第 2 節「卵胞液の採取」の項に記述した通り、採取した卵巣内に存在する卵胞の大きさを分類した。卵巣内に共存する卵胞の数や黄体の有無に関わらず、最も直径の大きい卵胞 (F1 卵胞, 直径 $14.1 \pm$

0.6 mm, $n = 23$) および 2 番目に直径の大きい卵胞 (F2 卵胞, 直径 11.4 ± 0.6 mm, $n = 15$) を本節の実験に用いた。実験に用いた卵胞は全て直径 8 mm 以上であった。LPS 濃度の中央値が 0.5 EU/ml であったことから, 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 (low LPS; 0.4 ± 0.01 EU/mL, $n = 23$), そして 0.5 EU/ml 以上であったものを高 LPS 卵胞 (high LPS; 0.9 ± 0.1 EU/mL, $n = 15$) として分類した。

(1) 卵胞膜細胞および顆粒層細胞の採取

高 LPS 卵胞および低 LPS 卵胞からの卵胞膜細胞および顆粒層細胞の採取方法は, Allegrucci et al. (2003) の方法に従った。卵胞液を吸引した後, ピンセットを用いて卵巣から卵胞を袋状に剥離し, 卵胞膜細胞周囲の間質細胞を除去した後, PBS で満たされたシャーレの中に保持した。実体顕微鏡を用いて卵胞膜細胞の内側に付着している顆粒層細胞をミクロスパーテルでかき出した。顆粒層細胞を除去した卵胞膜細胞は, RNA 抽出まで -80°C で保存した。卵胞膜細胞よりかき出した顆粒層細胞を 400 μl の PBS に浸し, 遠心分離 ($100 \times g$, 4°C , 10 分間) を行った。遠心分離後, 上清を除去して顆粒層細胞のペレットとし, 卵胞液の遠心分離により得られた顆粒層細胞と合わせて RNA 抽出まで -80°C で保存した。

(2) Reverse Transcription (逆転写) による cDNA の合成

逆転写は TaKaRa PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time, TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) を用い, 以下の方法で行った。まず, 1 μg の RNA を含む RNA 溶液 (7 μl) に 1 μl の gDNA Eraser および 2 μl の $5 \times$ gDNA Eraser Buffer を加えて室温で 5 分間静置し, ゲノム DNA 除去反応を行っ

た。続いて、1 μ l の PrimeScript RT Enzyme Mix I, 4 μ l の 5 \times PrimeScript Buffer 2, 1 μ l の RT Primer Mix および 4 μ l の RNase Free dH₂O を加えて 37°C で 15 分間および 85°C で 5 秒間インキュベートし、cDNA を作製した。

(3) プライマーの設計

プライマーのターゲットとなる塩基配列を Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>: NCBI) を用いて検索し、Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) を用いてプライマー設計を行った。さらに、BLAST (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast-j.html>) を用いて、設計したプライマーの精度を確認した。プライマー合成は、北海道システムサイエンスに依頼した。各標的遺伝子 (luteinizing hormone (LH) receptor (LHr), follicle stimulating hormone (FSH) receptor (FSHr), steroidogenic acute regulatory protein (StAR), cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme (P450scc), 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD), 17 β -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17), P450 aromatase (P450arom), caspase-3 および GAPDH) のプライマー塩基配列を Table 4.1.1 に示した。

(4) リアルタイム Polymerase Chain Reaction (PCR)

定量的 PCR は、QuantiTectTM SYBR[®] Green PCR (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を使用し、iQ5cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Tokyo, Japan) を用いて行った。3.9 μ l の RNase Free dH₂O, 5 μ l の SYBR Green PCR Master Mix, 0.1 μ l の Forward および Reverse Primer (50 μ M) を Watson 96-well PCR プレート (FUKAE KASEI Co., LTD., Kobe, Japan) に分注し、最後に 1 μ l の cDNA を加えて iQ5cycler にセットした。95°C で 10 分間の denature 反応を行った後、

95°C で 15 秒 (denature), それぞれのプライマーに合わせたアニーリング温度で 30 秒 (annealing), そして 72°C で 30 秒間 (extension) の反応を 50 サイクル行った。融解曲線分析は 0.1 °C/sec で 70°C から 90°C まで温度を上げて行い, 20 °C/min で 40°C まで下げた後, 30 秒間冷却した。それぞれの mRNA 発現量は, 内部標準として GAPDH を用い, その発現との割合で求めた。

(5) 統計解析

Shapiro-Wilk の W 検定により正規性の検定を行った後, パラメトリック検定による統計処理を行った。群間比較 (低 LPS 卵胞と高 LPS 卵胞の比較) には Unpaired *t*-test を用いた。統計学的解析には Stat View 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, USA) および JMP 5.1 (SAS Institute Inc., Cary, USA) を用いた。P < 0.05 の場合に有意差ありとした。全てのデータは mean ± SEM で示した。

4-1-3 結果

(1) 卵胞液中の LPS 濃度とステロイドホルモン濃度の関連性

卵胞液中の LPS 濃度の高低に関係なくすべての卵胞 (F1 卵胞と F2 卵胞) における卵胞液中のエストラジオール (E) 濃度, プロジェステロン (P) 濃度および E/P 比を Table. 4.1.2 に示した。F1 卵胞および F2 卵胞における E2 濃度は, それぞれ 48.2 ± 13.3 ng/ml (Mean \pm SD) および 22.2 ± 11.4 ng/ml であった。また, F1 卵胞と F2 卵胞における卵胞液中のプロジェステロン濃度は, それぞれ 191.8 ± 53.0 ng/ml および 256.9 ± 54.9 ng/ml であった。

F1 卵胞および F2 卵胞における高 LPS および低 LPS 卵胞の卵胞液中エストラジオール (E) 濃度, プロジェステロン (P) 濃度および E/P 比の結果を Fig. 4.1.1 に示した。F1 卵胞の卵胞液中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 ($P < 0.05$)。また F2 卵胞の卵胞液中エストラジオール濃度は, 低 LPS 卵胞に比べ高 LPS 卵胞で低い傾向がにられた ($P < 0.1$, Fig. 4.1.1a)。一方, 卵胞液中のプロジェステロン濃度についてみると, F1 および F2 卵胞ともに, 高 LPS 卵胞では低 LPS 卵胞に比べ有意に高かった ($P < 0.05$, Fig. 4.1.1b)。さらに, エストラジオール濃度とプロジェステロン濃度の比である E/P 比についてみると, F1 卵胞では高 LPS 卵胞は低 LPS 卵胞に比べ有意に低く ($P < 0.05$), また F2 卵胞では高 LPS 卵胞が低 LPS 卵胞に比べて低い傾向がみられた ($P < 0.1$, Fig. 4.1.1c)。F1 卵胞および F2 卵胞における卵胞液中のエストラジオールおよびプロジェステロン濃度を比較してみたところ, 両卵胞間に有意な差は認められなかった (それぞれ $P = 0.19$ および $P = 0.43$)。このため, 卵胞膜細胞と顆粒層細胞における遺伝子発現では, F1 卵胞と F2 卵胞のデータを合わせて解析を行った。

(2) 卵胞液中の LPS 濃度と卵胞膜細胞におけるステロイドホルモン産生関連遺伝子発現との関連性

卵胞液中 LPS 濃度と卵胞膜細胞における CYP17, LHr, StAR, P450scc および 3 β -HSD の遺伝子発現の結果を Fig. 4.1.2 に示した。卵胞膜細胞における LHr, CYP17 および P450scc 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 ($P < 0.05$, Fig. 4.1.2a, 2b および 2d)。一方、卵胞膜細胞における StAR および 3 β -HSD の遺伝子発現は、高 LPS 卵胞と低 LPS 卵胞との間で有意な差は認められなかった (Fig. 4.1.2c および 2e)。

(3) 卵胞液中の LPS 濃度と顆粒層細胞におけるステロイドホルモン産生関連遺伝子発現との関連性

卵胞液中 LPS 濃度と顆粒層細胞における LHr, FSHr, P450arom, StAR, P450scc および 3 β -HSD の遺伝子発現の結果を Fig. 4.1.3 に示した。顆粒層細胞における LHr, FSHr, および P450arom 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 ($P < 0.05$, Fig. 4.1.3a-c)。一方、顆粒層細胞における StAR, P450scc, および 3 β -HSD の遺伝子発現は、高 LPS 卵胞と低 LPS 卵胞との間で有意な差は認められなかった (Fig. 4.1.3d-f)。

(4) 卵胞液中の LPS 濃度と卵胞膜細胞顆粒層細胞における caspase-3 遺伝子発現との関連性

卵胞液中 LPS 濃度と顆粒層細胞および卵胞膜細胞における caspase-3 の遺伝子発現の結果を Fig. 4.1.4 に示した。卵胞膜細胞および顆粒層細胞における caspase-3 の遺伝子発現は、低 LPS 卵胞に比べ高 LPS 卵胞で高かった ($P < 0.05$, Fig. 4.1.4a および 4b)。

4-1-4 考察

本節において、高 LPS 卵胞では、卵胞液中のエストラジオール濃度が低く、プロゲステロン濃度の高いことが明らかになった。さらに、卵胞膜細胞および顆粒層細胞におけるステロイドホルモン産生関連遺伝子の発現低下が認められた。このことから、ウシ生体内において、卵胞液中に存在する LPS が卵胞のステロイドホルモン産生に影響を与える可能性が示された。

(1) 卵胞のステロイドホルモン産生に及ぼす LPS の影響

生殖内分泌機構における LPS の効果に関するこれまでの報告をみると、LPS が卵胞発育や排卵を制御する下垂体からの LH のパルス状分泌やサージ状分泌を阻害すること、また LH 分泌を統御する視床下部での GnRH の分泌を阻害することにより卵胞発育や排卵の遅延をもたらすことが報告されている (Battaglia et al., 1999; Suzuki et al., 2001)。一方、LPS は下垂体からの LH のパルス状分泌には影響せず、卵胞で合成されるエストラジオールの分泌を阻害することも報告されている (Battaglia et al., 2000)。これらの研究報告は、LPS が視床下部・下垂体の内分泌機構に影響するだけでなく、卵巣へも直接的に影響を及ぼしている可能性を示唆している。しかし、卵胞液中に存在する LPS が、卵胞構成細胞である顆粒層細胞や卵胞膜細胞の細胞機能に与える影響については不明な点が多い。

LPS が卵胞の機能に影響するためには、卵胞を構成する顆粒層細胞や卵胞膜細胞に LPS を受容するためのレセプターが発現していなくてはならない。本研究室で行われた過去の研究により、ウシ顆粒層細胞および卵胞膜細胞において、LPS 受容体の遺伝子が発現している (Shimizu et al., 2012; Magata et al., 2014) ことが明らかとなっていることから、卵胞液に存在する LPS をこれらの細胞が常

に受容していることが推察される。さらに、顆粒層細胞や卵胞膜細胞の *in vitro* の研究において、LPS はウシ顆粒層細胞のエストラジオール産生を阻害すること、また卵胞膜細胞のプロジェステロンおよびアンドロステンジオン産生を阻害することが報告されている (Shimizu et al., 2012; Magata et al., 2014)。これらのことから、ウシ生体内においても、卵胞液中に存在する LPS が卵胞の機能に直接影響を与える可能性が考えられる。

本研究において卵胞液中から検出された LPS の濃度は 0.2 から 2.0 EU/ml の範囲であり、Herath et al. (2007) が報告した子宮内膜炎牛の卵胞液中の濃度 ($1,761 \pm 1,120$ EU/ml, Mean \pm SD) と比較すると低い。興味深いことに、本研究における高 LPS 卵胞の LPS 濃度は Herath らの報告と比較して低いにも関わらず、高 LPS 卵胞の卵胞膜細胞および顆粒層細胞におけるステロイドホルモン産生は低下していた。*In vitro* において、顆粒層細胞および卵胞膜細胞のステロイドホルモン産生に影響を与えた LPS の最小濃度は 1,000 EU/ml であったことから (Magata et al., 2014; Shimizu et al., 2012)、生体内では、体外培養系での反応よりもさらに高い感度で LPS を受容し、細胞の機能に影響を与えている可能性が考えられる。高 LPS 卵胞における卵胞液中のエストラジオール濃度の低下とプロジェステロン濃度の上昇は、F1 卵胞と F2 卵胞のいずれにおいても認められた。このことは、卵胞の大きさに関わらず、卵胞液中の LPS が卵胞の機能に影響を与えている可能性を示唆している。

(2) LPS が卵胞構成細胞のステロイドホルモン産生に影響を与える機構

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。本研究において、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は、以下の二つのメカニズムが考えられる。1 つ目の機構として、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 つ目の機構として、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と推察できる。一方、プロジェステロン合成に関わる StAR, P450scc および 3 β -HSD の遺伝子発現には変化が認められなかった。このことから、高 LPS 卵胞における卵胞液中のプロジェステロン濃度の上昇は、プロジェ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ジェステロンの卵胞液中への蓄積によるものであった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 (Silva and Price, 2000; Magoffin, 2005)。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。

(3) LPS による卵胞構成細胞のアポトーシス誘導の可能性

第 3 章で記述したとおり、卵胞の機能的指標の一つとして、卵胞液中のエストラジオール濃度とプロジェステロン濃度の比である E/P 比が挙げられ、E/P 比が 1 未満の卵胞はエストラジオール非活性型として分類され (Grazul-Bilska et al., 2007), 閉鎖に向かう卵胞であることが報告されている (Ireland and Roche, 1983)。本研究において、高 LPS 卵胞における E/P 比は低 LPS 卵胞の E/P 比に比べて有意に低く、また全ての卵胞において 1 未満であったことから、高 LPS 卵胞は閉鎖に向かう卵胞であったことが推察された。卵胞閉鎖は卵胞構成細胞のアポトーシスにより生じるが (Tilly et al., 1991), 顆粒層細胞のアポトーシスは caspase-3 の活性化が引き金となる (Johnson and Bridgham, 2002)。本研究において、卵胞膜細胞および顆粒層細胞ともに、高 LPS 卵胞における caspase-3 の遺伝子発現が上昇していた。Bosu et al. (1996) は、ウシ卵巢より単離した卵胞の体外器官培養において、LPS が顆粒層細胞のアポトーシスを誘導したことを報告している。本研究においても同様に、卵胞液中に存在する LPS により誘起されたアポトーシスによって卵胞閉鎖が起こっていた可能性が考えられた。

(4) 結論

ウシ生体内において、卵胞液中に存在する LPS は低濃度であるにも関わらず、卵胞構成細胞のステロイドホルモン産生を低下させることが明らかになった。さらに、LPS は卵胞構成細胞のアポトーシスを誘導することによって卵胞の閉鎖にも関与している可能性が考えられる。これらの知見より、卵胞液中の LPS による局所的な卵胞機能の抑制が、炎症性子宮疾患における卵巢機能障害の一因となっている可能性が示された。

4-1-5 図および表

Table 4.1.1 Primer pairs used for the detection of mRNA

Genes	Primer sequence (5' → 3')	Size (bp)	Genbank accession No.
<i>Gonadotropin receptor</i>			
LHr	For: AGG AAA ATG CAC GCC TGG AG Rev: GTG GCA TCC AGG AGG TTG GT	202	U20504
FSHr	For: TGG CAT ACC ATC ACC CAT GC Rev: TGA CCA CAA AGG CCA GGAC A	232	L22319
<i>Progesterone production</i>			
StAR	For: GTG GAT TTT GCC AAT CAC CT Rev: TTA TTG AAA ACG TGC CAC CA	203	NM174189
P450scc	For: CTG CAA ATG GTC CCA CTT CT Rev: CAC CTG GTT GGG TCAAAC TT	209	K02130
3-HSD	For: TCC ACA CCA GCA CCA TAG AA Rev: AAG GTG CCA CCA TTT TTC AG	118	X17614
<i>Androstenedione production</i>			
CYP17	For: TGG ATC GTG GCC TAC CTC CT Rev: AGG TCG CCAATG CTG GAG TC	215	M12547
<i>Oestradiol production</i>			
P450arom	For: TTG CAAAGC ATC CCC AGG TT Rev: AGG TCC ACAACG GGC TGG TA	151	Z32741
<i>Apoptosis</i>			
Caspase-3	For: TGG TAC AGA CGT GGA TGC AG Rev: TCG CCA GGAAAA GTAACC AG	427	BC123503
<i>Internal standard</i>			
GAPDH	For: CTC TCA AGG GCA TTC TAG GC Rev: TGA GAAAGT CGT TGA GG	120	U85042

Table 4.1.2 Mean follicle size and steroid concentration in follicular fluid of the largest (F1) and the second largest (F2) follicles

	F1 follicles (<i>n</i> = 25)	F2 follicles (<i>n</i> = 13)	<i>P</i> -value
Diameter (mm)	14.1 ± 0.6	11.4 ± 0.7	0.01
Estradiol (ng/ml)	48.2 ± 13.3	22.2 ± 11.4	0.19
Progesterone (ng/ml)	191.8 ± 53.0	256.9 ± 54.9	0.43
E/P ratio	1.1 ± 0.3	0.5 ± 0.3	0.17

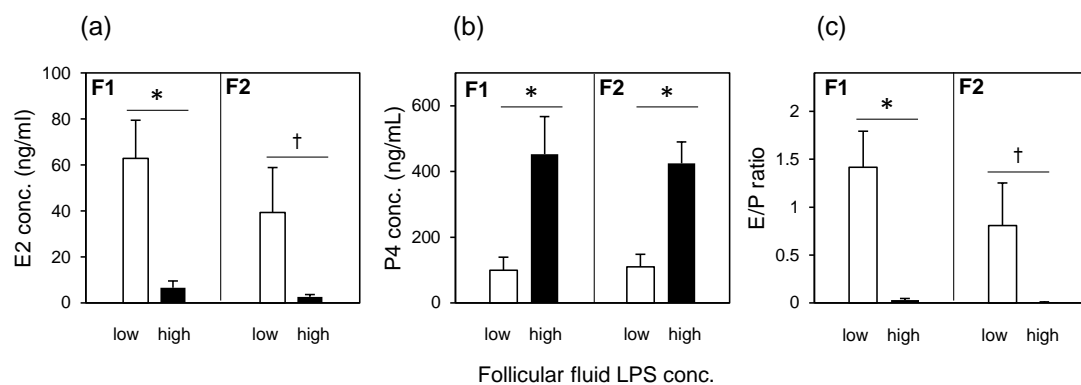
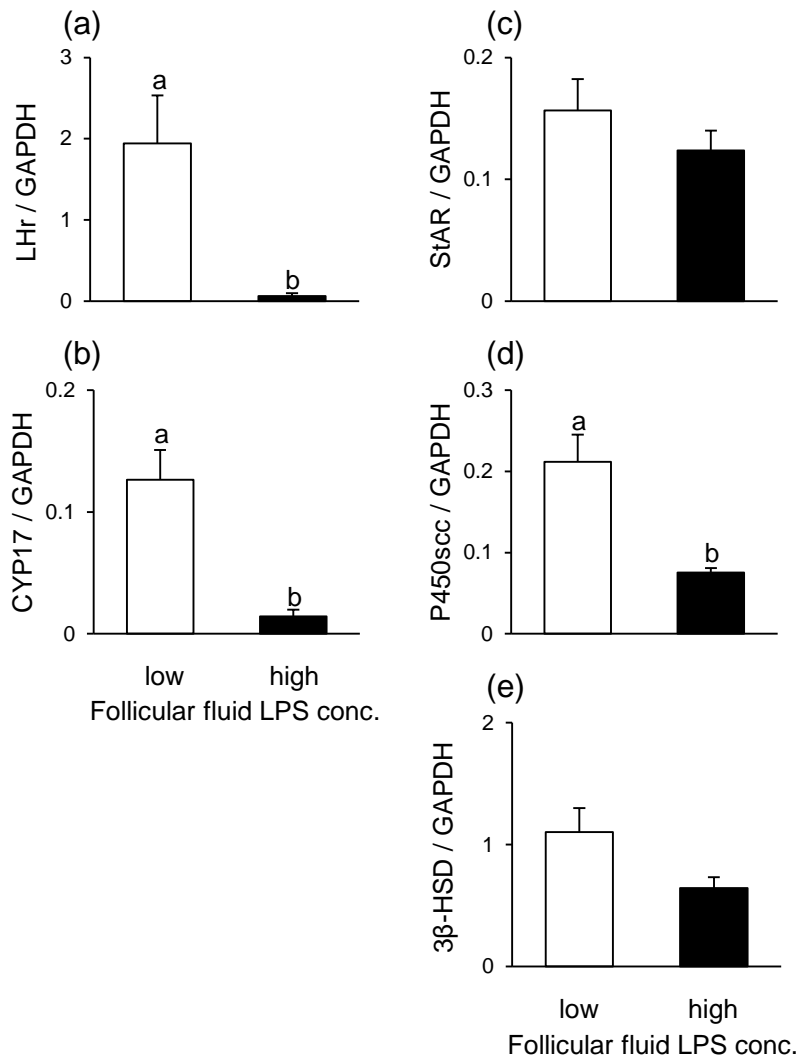


Fig. 4.1.1 (a) Estradiol (E2) and (b) progesterone (P4) concentration and (c) the ratio of E2 and P4 production (E/P ratio) in the follicular fluid of the largest (F1) follicles or the second largest (F2) follicles from bovine ovary. Cows with a follicular fluid LPS concentration of less than 0.5 EU/mL were categorized as ‘low’ (white bar, F1, $n = 17$; F2, $n = 8$) and those with a concentration greater than 0.5 EU/mL were categorized as ‘high’ (black bar, F1, $n = 6$; F2, $n = 7$). All values are shown as mean \pm SEM. Values with asterisks are different and values with dagger are tended to be different between groups (*; $P < 0.05$, †; $P < 0.1$)



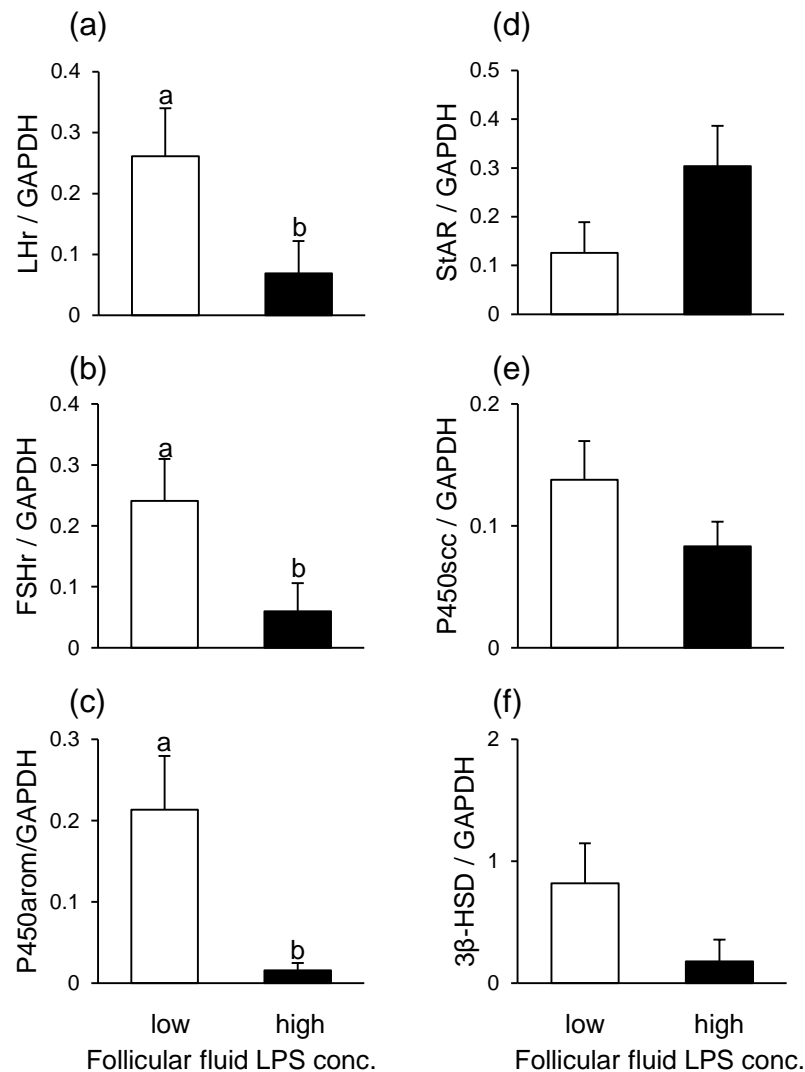


Fig. 4.1.3 mRNA expression of (a) LHr, (b) FSHr, (c) P450arom, (d) StAR, (e) P450scc, and (f) 3β-HSD in the granulosa cells of large follicles (>8 mm diameter) from bovine ovaries. Cows with a follicular fluid LPS concentration of less than 0.5 EU/mL were categorized as 'low' (white bar, $n = 13$) and those with a concentration greater than 0.5 EU/mL were categorized as 'high' (black bar, $n = 13$). All values are shown as mean \pm SEM. Values with different letters (a, b) are different between groups ($P < 0.05$).

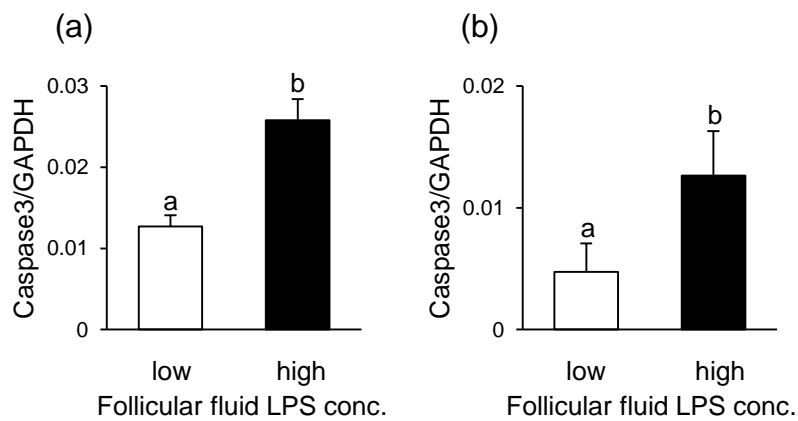


Fig. 4.1.4 mRNA expression of caspase-3 in the (a) theca cells and (b) granulosa cells of large follicles (> 8 mm diameter) from bovine ovaries. Cows with follicular fluid LPS concentration of less than 0.5 EU/ml were categorized as 'low' (white bar, $n = 13$), and greater than 0.5 EU/ml were categorized as 'high' (black bar, $n = 13$). All values were shown as means \pm SEM. Values with different letters (a, b) are different between groups ($P < 0.05$).

第 2 節

卵母細胞の成熟過程における LPS の影響

4-2-1 目的

第 4 章第 1 節において、卵胞液中の LPS は卵胞構成細胞のステロイドホルモン産生を低下させるとともに、アポトーシスによる卵胞閉鎖の誘導にも関与する可能性が示された。卵胞は、生殖細胞である卵母細胞および卵胞構成細胞から成る。卵母細胞と卵胞構成細胞はそれぞれ相互にコミュニケーションをとりながら発育するため、LPS は卵胞構成細胞だけでなく、卵胞内に内包される卵母細胞にも影響を及ぼす可能性が考えられる。

哺乳類の卵母細胞（一次卵母細胞）は第一減数分裂の前期で細胞周期を停止させ、長い休止期に入るが、LH サージを受けて排卵が近付くと卵核胞が崩壊し（卵核胞崩壊）、減数分裂を再開させる。第一極体を放出した二次卵母細胞はそのまま第二減数分裂を進行させ、分裂中期（MII 期）で再び停止した状態で排卵される (Eppig 1996)。この一連の過程は、「卵母細胞の成熟」と呼ばれ、受精およびその後の胚発生に向けて必要不可欠な過程である。近年、LPS の受容体である TLR4 がマウス卵母細胞の成熟機構に関わっている可能性が示唆されているが (Shimada et al., 2008)、LPS が卵母細胞に与える影響については明らかになっていない。そこで本節では、LPS がウシ卵母細胞の成熟過程に及ぼす影響について検討することを目的とした。

4-2-2 材料および方法

(1) 卵巣の採取

卵巣の採取は第 3 章第 2 節と同様の手順で行った。

(2) 体外成熟培地の作製

Medium 199 (Earl's salts with 25 mM HEPES and sodium bicarbonate; Sigma-Aldrich Japan Inc., Tokyo, Japan) に 100 µg/ml の kanamycin (Sigma-Aldrich Japan Inc., Tokyo, Japan) を添加した培地を基礎培地とし、使用前日に作製して CO₂ インキュベーター内 (38.5 °C, 5% CO₂, 95% air, 湿度飽和気相) に静置することによってガス平衡化を行った。培養当日、基礎培地に 100 µg/ml の L (+) Glutamine (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) を加え、洗浄用培地とした。さらに、1 µg/ml の Estradiol (β-estradiol, Sigma-Aldrich Japan Inc., Tokyo, Japan) および 0.02 IU/ml の FSH (bovine FSH, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, biopotency 604 ng/IU) を加えて培養用培地とした。

(3) 卵丘細胞－卵母細胞複合体の採取

18 G 鈍角針を装着した 20 ml シリンジを用いて、卵巣の表面に見える直径 2 – 5 mm の小卵胞の側面より卵胞液を吸引した。直径 90 mm のシャーレにシリンジの内容物全てを移し、実体顕微鏡下で卵丘細胞－卵母細胞複合体を吸引し、3 ml の洗浄用培地を分注した直径 35 mm のディッシュに移した。洗浄用培地に集めた卵丘細胞－卵母細胞複合体は、新しい洗浄用培地の入ったディッシュに移し替えることにより、卵胞液などの希釈と顆粒層細胞などの夾雑物を廃棄しながら洗浄を行った。洗浄は 4 枚のディッシュを用い、順次移し替えて行った。洗浄の過程で卵母細胞の選別を行い、卵丘細胞が緊密に 3 層以上付着しており、均一な細胞質を持つ卵母細胞のみを LPS 受容体遺伝子の発現解析および体外成熟培養に供した。

(4) 卵母細胞の裸化

体外成熟培養前の未成熟な卵丘細胞-卵母細胞複合体を、PBS を分注した 1.5 ml マイクロチューブに移した。マイクロチューブを 5 分間ボルテックスにかけて卵丘細胞を卵母細胞から分離させ、5 秒程度遠心して卵母細胞をマイクロチューブの底に集めた後、実体顕微鏡下で卵丘細胞を含む上清を別の 1.5 ml マイクロチューブに回収した。卵母細胞の入ったマイクロチューブに 100 μ l の PBS を加え、再び 5 分間ボルテックスにかけて 5 秒間遠心した後上清を取り除いた。この操作を 3 回繰り返す、卵母細胞から卵丘細胞を完全に取り除いた。

(5) 卵母細胞および卵丘細胞からの RNA 抽出

卵丘細胞のマイクロチューブに卵母細胞が入っていないことを確認し、遠心分離 (1,000 \times g, 4°C, 10 分間) を行った。卵丘細胞のペレットを確認した後、上清を除去し、200 μ l の TRIZOL® (Life Technologies, Inc., DriveRockville, MD, USA) を加えて RNA 抽出まで -80°C で保存した。裸化した卵母細胞にも 200 μ l の TRIZOL® を加え、-80°C で保存した。卵母細胞および卵丘細胞からの RNA 抽出は、第 4 章第 1 節と同様の手順で行った。

(6) Reverse Transcription (逆転写) による cDNA の合成

未成熟卵母細胞および卵丘細胞から抽出した RNA からの cDNA の合成は、第 4 章第 1 節と同様の手順で行った。

(7) プライマーの設計

プライマーの設計は、第 4 章第 1 節と同様の手順で行った。標的遺伝子

(TLR 4, CD 14, MD 2 および TLR 2) のプライマー塩基配列を Table 4.2.1 に示した。

(8) Polymerase Chain Reaction (PCR) 法

未成熟卵母細胞および卵丘細胞における LPS 受容体遺伝子の発現を解析するために、PCR 解析を行った。PCR の反応には rTaq DNA Polymerase (TaKaRa Taq™; TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) を使用し、Thermal cycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) を用いて行った。19.2 μ l の RNase Free dH₂O, 2.5 μ l の 10 \times PCR Buffer, 2 μ l の 2.5 mM dNTP Mixture, 0.2 μ l の Forward および Reverse Primer Mix (各 25 μ M) および 0.1 μ l の Taq DNA Polymerase を混合して 200 μ l の PCR チューブに分注し、最後に 1 μ l の cDNA を加えて Thermal cycler にセットした。PCR サイクルの反応は 95°C で 5 分間の denature 反応を行った後、95°C で 1 分 (denature), それぞれのプライマーに合わせたアニーリング温度で 1 分 (annealing), そして 72°C で 1 分間 (extension) の反応を 40 サイクル行った。PCR 産物は 2% アガロースゲル (Agarose S; Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) を用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイド (EtBr Solution; Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) によりゲルを染色して可視化した。

(9) 体外成熟培養および LPS 処理

培養用培地に、最終濃度が 0, 1 および 10 μ g/ml となるように LPS (*E. coli* O111: B4; Sigma-Aldrich Japan Inc., Tokyo, Japan) を添加した。湿潤状態を保つために 96 穴プレートの外側の well に滅菌水 300 μ l を分注し、さらに内側の well に 95 μ l の培養用培地を分注した。洗浄した 10 個の卵丘細胞-卵母細胞

複合体を 5 μ l の洗浄用培地と共に吸引し、培養用培地を分注した well に移して、CO₂ インキュベーター内 (38.5 °C, 5% CO₂, 95% air, 湿度飽和気相) で 23 時間体外成熟培養を行った。各 LPS 処理区には 20 個もしくは 30 個の卵丘細胞-卵母細胞複合体を体外成熟培養に供した。成熟培養前後の卵丘細胞-卵母細胞複合体の様子を Fig. 4.2.1 に示した。

(10) ホールマウント標本の作製

体外成熟培養終了後、卵丘細胞-卵母細胞複合体を処理区ごとにまとめ、PBS を分注した 1.5 ml マイクロチューブに移した。前述した「卵母細胞の裸化」の項と同様の手順で卵母細胞を裸化し、100 μ l の PBS を加えてホールマウント標本の作製に供した。

スライドグラスに、ワセリン-パラフィン混合物 (ワセリン : パラフィン = 5 : 1) で 4 つのスポットを置き、裸化した卵丘細胞を 10 μ l の PBS と共にスポットの中央に置いた。その上にカバーガラスをのせ、実体顕微鏡下でピンセットを用いてスポットを少しずつ圧定した。PBS がカバーガラスに接したところで実体顕微鏡の倍率を上げ、卵母細胞をつぶさないように気をつけながら、卵母細胞の細胞質が広がるまで圧定を継続した。圧定後、スライドグラスとカバーガラスの間に PBS を流し込み、卵母細胞が流れないことを確認した。

実体顕微鏡下にスライドグラスを置いたまま、カバーガラスの 1 辺に固定液 (酢酸 : 99% エタノール = 1 : 3) を流し、反対側から浸出してきた PBS をろ紙で吸い取り、完全に置換させた。透明帯が溶け、卵母細胞の細胞質に含まれる脂肪滴が溶解した事を確認した後、乾燥しないように固定液を染み込ませたるろ紙と共にタッパーに移して一晩固定した。

固定後、タッパーから取り出したスライドグラスの水分を軽く拭き取り、固

定と同様の手順で 50 μ l の染色液（核染色用酢酸オルセイン染色液；Sigma-Aldrich Japan Inc., Tokyo, Japan）を流し込み、固定液と置換させた。乾燥しないようにタッパーに入れ、30 分間染色した。染色後、染色液を酢酸グリセリン液（グリセロール：酢酸：蒸留水 = 1:1:3）で置換し、完全に置換を終えたところで、カバーガラスの 4 辺にマニキュアを塗布して封入を行った。

(11) 核相の観察

光学顕微鏡を用いてホールマウント標本を観察することにより、減数分裂過程にある卵母細胞の核相を以下の 4 つに分類した。

GV (第一減数分裂前期)：卵核胞を有している。

MI (第一減数分裂中期)：染色体が赤道面上に並び、紡錘体を形成している。

卵核胞の崩壊 (GVBD) が生じた後の段階。

ATI (第一減数分裂後期)：染色体が両極に分かれている。

MII (第二減数分裂中期)：赤道面上に整列している染色体と第一極体がある。

このうち、MII 期に進行した卵母細胞を成熟卵母細胞とし、核の成熟率を算出した。細胞質の変性が認められた卵母細胞は、成熟率の算出からは除外した。

(12) 成熟卵母細胞におけるミトコンドリア DNA コピー数の評価

成熟卵母細胞におけるミトコンドリア DNA (MtDNA) のコピー数に及ぼす LPS の影響を調べるために、卵母細胞 1 個からの MtDNA 抽出を行った。体外成熟培養終了後、前述した「卵母細胞の裸化」の項と同様の手順で卵母細胞を裸化し、10 μ l の PBS と共に 1.5 ml マイクロチューブに移した。そこに、20

μl の 5 mg/ml protease (protease type XIV from *Streptomyces griseus*; Sigma-Aldrich Japan Inc., Tokyo, Japan) を加え、実体顕微鏡下で透明帯が溶けるまで 20 回程度ピペッティングを行った。透明帯を除去した卵母細胞を 1 個ずつ新たな 1.5 ml マイクロチューブに移し、微量 DNA 抽出キット (QIAamp DNA Micro Kit; QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を用いて MtDNA を精製した。MtDNA の精製はキット付属のプロトコルに従って行った。

成熟卵母細胞 1 個から抽出した MtDNA を用いて、定量的 PCR により解析を行った。定量的 PCR は、第 4 章第 1 節と同様の手順で行った。Bovine MtDNA のプライマー塩基配列を Table. 4.2.1 に示した。

(13) 成熟卵母細胞におけるミトコンドリア局在の評価

成熟卵母細胞におけるミトコンドリアの局在に及ぼす LPS の影響を調べるために、MitoTracker (Mito Tracker® Orange CM-H₂ TMRos; Invitrogen™, Life Technologies, Inc., DriveRockville, MD, USA) を用いてミトコンドリアの染色を行った。体外成熟培養終了後、卵丘細胞-卵母細胞複合体の入った well から培養液 100 μl を取り除き、38.5 °C に加温した 250 μl の 300 nM Mito Tracker を加え、CO₂ インキュベーター内 (38.5 °C, 5% CO₂, 95% air, 湿度飽和気相) で 30 分間染色を行った。染色後、0.1% BSA を加えた PBS (PBS-BSA) 300 μl を分注した 1.5 ml マイクロチューブに卵丘細胞-卵母細胞複合体を移し、前述した「卵母細胞の裸化」の項と同様の手順で卵母細胞を裸化しながら洗浄を行った。3 回目のボルテックスの後上清を取り除き、38.5 °C に加温した 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) 300 μl を加えて CO₂ インキュベーター内 (38.5 °C, 5% CO₂, 95% air, 湿度飽和気相) で 15 分間固定した。固定後、マイクロチューブを 5 秒間遠心した後上清を取

り除き、200 μ l の PBS-BSA を加えて室温で 5 分間インキュベートし、洗浄を行った。この洗浄操作を 3 回繰り返した後、100 μ l の PBS-BSA と共にワセリンスポットしたスライドグラスにのせた。カバーガラスをかけ、スライドグラスとカバーガラスの間に PBS を流し込み、つぶさないようにマニキュアで封入した後、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SP5; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) を用いて蛍光観察を行った。

(13) 成熟卵母細胞におけるミトコンドリア膜電位差の評価

成熟卵母細胞におけるミトコンドリアの膜電位差に及ぼす LPS の影響を調べるために、Mitochondrial Permeability Transition Detection Kit (MitoPTTM JC-1; ImmunoChemistry Technologies LLC., Bloomington, MN, USA) を用いてミトコンドリアの染色を行った。体外成熟培養終了後、卵丘細胞-卵母細胞複合体の入った well から培養液 100 μ l を取り除き、100 倍に希釈し、38.5 $^{\circ}$ C に加温した 250 μ l の Mito Tracker を加え、CO₂ インキュベーター内 (38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95% air, 湿度飽和気相) で 15 分間染色を行った。染色後、0.1% BSA を加えた 1 \times Assay Buffer 250 μ l を分注した 1.5 ml マイクロチューブに卵丘細胞-卵母細胞複合体を移し、前述した「卵母細胞の裸化」の項と同様の手順で卵母細胞を裸化しながら洗浄を行った。洗浄後、10 μ l の 1 \times Assay Buffer とともにワセリンスポットしたスライドグラスの上に置き、カバーガラスをのせて実体顕微鏡下で圧定した。圧定後、スライドグラスとカバーガラスの間に 1 \times Assay Buffer を流し込み、マニキュアを用いて封入後、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SP5; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) を用いて蛍光観察を行った。JC-1 は、ミトコンドリアの脂質二重膜に取り込まれ、膜電位差を有するミトコンドリアでは凝集して存在し、赤色蛍光を発する。一方、ミトコンドリアの膜電位

差が消失するとモノマー状に拡散し、緑色蛍光を発する。本研究では、488 nm の励起により検出された赤色蛍光 (548 – 641 nm で検出) と緑色蛍光 (471 – 548 nm で検出) の蛍光強度の比を算出し、ミトコンドリア膜電位差の指標とした。

(14) 統計解析

ミトコンドリア DNA コピー数およびミトコンドリア膜電位差の解析には、Shapiro-Wilk の W 検定により正規性の検定を行った後、パラメトリック検定を用いて統計処理を行った。分散分析法 (ANOVA) により有意差が認められた場合、posthoc test として無処理区の値をコントロールとし、Dunnett's test を用いて検定を行った。この場合、統計単位は卵母細胞 1 個とした。卵母細胞の核成熟率およびミトコンドリア局在の解析にはカイ二乗検定を用い、無処理区に対する 1 $\mu\text{g/ml}$ および 10 $\mu\text{g/ml}$ の LPS 処理区それぞれの組み合わせで検定を行った。期待値が 5 以下であった場合、イェーツ補正を行った。統計学的解析には Stat View 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, USA) および JMP 5.1 (SAS Institute Inc., Cary, USA) を用いた。P < 0.05 の場合に有意差ありとした。ミトコンドリア DNA コピー数およびミトコンドリア膜電位差のデータは mean \pm SEM で示した。

4-2-3 結果

(1) 卵母細胞および卵丘細胞における LPS 受容体遺伝子の発現

未成熟卵母細胞および卵丘細胞における LPS 受容体遺伝子の発現の結果を Fig. 4.2.2 に示した。卵母細胞および卵丘細胞において、TLR 4, MD 2 および TLR 2 の遺伝子発現が認められた。一方、CD 14 の遺伝子発現は卵母細胞と卵丘細胞のいずれにおいても認められなかった。

(2) 卵母細胞の核成熟に及ぼす LPS の影響

LPS 処理後の卵母細胞における体外成熟培養後の核成熟率の結果を Fig. 4.2.3 に示した。1 $\mu\text{g/ml}$ および 10 $\mu\text{g/ml}$ の LPS 処理における核成熟率は、それぞれ 68.2% および 59.6% であり、無処理区 (84.9%) に比べ有意に低下していた ($P < 0.01$)。

(3) 卵母細胞のミトコンドリア DNA コピー数に及ぼす LPS の影響

LPS 処理後の卵母細胞における体外成熟培養後のミトコンドリア DNA コピー数の相対値の結果を Fig. 4.2.4 に示した。1 $\mu\text{g/ml}$ および 10 $\mu\text{g/ml}$ の LPS 処理におけるミトコンドリア DNA コピー数は、無処理区と同程度であり、有意な差は認められなかった。

(4) 卵母細胞のミトコンドリア局在に及ぼす LPS の影響

LPS 処理後の卵母細胞における体外成熟培養後のミトコンドリアの局在変化の結果を Fig. 4.2.5 に示した。ミトコンドリアの細胞局在において、無処理区が細胞質全体に分布している割合が 75.0% であるのに対して、1 $\mu\text{g/ml}$ および 10 $\mu\text{g/ml}$ の LPS 処理区では、それぞれ 47.2% および 38.9% と無処理区に比べ有

意に低かった ($P < 0.01$)。

(5) 卵母細胞のミトコンドリア膜電位差に及ぼす LPS の影響

LPS 処理後の卵母細胞における体外成熟培養後のミトコンドリア膜電位差の変化の結果を Fig. 4.2.6 に示した。1 $\mu\text{g/ml}$ および 10 $\mu\text{g/ml}$ の LPS 処理におけるミトコンドリア膜電位差は、無処理区に比べ有意に低下した ($P < 0.01$)。

4-2-4 考察

本節では、ウシ卵母細胞の体外成熟過程における LPS の影響を検討した。その結果、LPS は卵母細胞の減数分裂を阻害するとともに、細胞質に存在するミトコンドリアの局在を変化させること、またミトコンドリアの膜電位差を低下させることが明らかとなった。このことから、LPS は卵母細胞の成熟を阻害することにより、受精やその後の胚発生に影響を及ぼす可能性が示唆された。

(1) ウシ卵母細胞および卵丘細胞における LPS 受容体遺伝子の発現

生体内における LPS は、細胞膜上に存在する TLR4 / CD14 / MD2 から成る複合受容体により認識される。マウス卵丘細胞-卵母細胞複合体における TLR 4 および CD 14 遺伝子の発現が報告されているが (Shimada et al., 2006), ウシ卵母細胞における LPS 受容体遺伝子の発現に関する情報はない。本研究において、卵丘細胞と卵母細胞のいずれにおいても TLR 4 および MD 2 の遺伝子が発現していたが、CD 14 の遺伝子発現は認められなかった。CD 14 には、膜上受容体と遊離受容体の二種類が存在する。生体内では血漿中の遊離 CD 14 を介しても LPS が認識されること (Yang et al., 1996), さらに CD 14 欠損マウスにおいても LPS への反応が認められることから (Akira and Hoshino, 2003), LPS の認識に膜上 CD 14 の発現は必須ではないと推察される。また、ペプチドグリカンの受容体として知られる TLR 2 は、ペプチドグリカンを認識する機構以外に、LPS を認識する機構が存在することが明らかになっている (Yang et al., 1998)。ウシ卵母細胞および卵丘細胞においても、TLR 2 の遺伝子発現が強く認められたことから、卵母細胞においては TLR 2 が LPS の認識に強く関与している可能性も考えられる。これらのことを踏まえると、ウシ卵母細胞および卵丘細胞ともに、LPS の刺激を直接受容することができる可能性は高いと考えられる。

(2) 卵母細胞の核成熟における LPS の影響

ほとんどの哺乳類において卵母細胞の成熟は、卵巣の卵胞内で起こる卵形成過程の最終段階である。卵母細胞の成熟過程には、卵核胞の崩壊、第一極体の放出による第一減数分裂の完了、そして MII 期染色体の形成などが含まれる。本節の結果から、LPS は MII 期に進行する卵母細胞の数を減少させ、核成熟率を低下させることが明らかとなった。Bromfield and Sheldon (2011) も同様に、LPS は正常なウシ卵母細胞の減数分裂の進行を抑制したことを報告していることから、LPS は卵母細胞の核成熟を阻害すると考えられる。LPS による核成熟抑制のメカニズムは明らかになっておらず、卵母細胞への直接作用なのか、あるいは卵丘細胞を介した間接的な作用なのかは不明である。卵母細胞の核成熟機構の初期段階として重要である卵母細胞の減数分裂の再開は、以下に示す 2 つの機構が関与していると考えられている。一つは、卵成熟促進因子 (Maturation-promoting factor; MPF) の合成と活性化であり、もう一つは、卵母細胞内 cAMP レベルの低下である (Bilodeau-Goeseels, 2012)。ウシ卵母細胞における MPF の活性化機構に関しては不明な点が多いが、LPS、もしくは LPS により産生された炎症性サイトカインなどの他の因子が MPF の機能調節に何らかの影響を及ぼしているのかもしれない。また哺乳類では、LH サージによって卵丘細胞が膨化することにより卵母細胞-卵丘細胞間のギャップジャンクションが消失する。その結果、卵丘細胞による cAMP 維持機構が破綻し、卵母細胞内の cAMP が下降することにより減数分裂が再開する (Thomas et al., 2004)。つまり、LH が減数分裂再開の引き金として重要な役割を担っている。本章第 1 節において、卵胞液中の LPS 濃度が高い卵胞 (高 LPS 卵胞) では顆粒層細胞における LH 受容体の遺伝子発現が低下していることが明らかになった。このことから、LPS の作用により卵丘細胞における LH への感受性が低下することによ

って卵丘細胞の膨化が抑制された可能性が推察される。

(3) 卵母細胞の細胞質成熟に及ぼす LPS の影響

卵母細胞の成熟過程では、核分裂の進行に加えて、細胞質においても細胞内小器官のダイナミックな変化が生じる。核分裂に伴って起こる細胞質の変化は細胞質成熟と呼ばれ、受精や胚発生に必要な不可欠な過程である (Eppig, 1996)。核成熟と細胞質成熟は同調して起こるが、第一減数分裂中期 (MI 期) で核成熟の進行を停止させた卵母細胞でも細胞質成熟が進行することが示されており、細胞質の成熟は核分裂とは独立した現象であることが示唆されている (Eppig et al., 1994)。ミトコンドリアは、卵母細胞の細胞質に最も豊富に存在する細胞内小器官であり、エネルギー生産器官として働く。さらに、卵母細胞の成熟に伴うミトコンドリアの成熟や局在変化は、受精や胚発生のために必須の過程である (Thouas et al., 2004)。本節では、卵母細胞の細胞質成熟を評価するためにミトコンドリアに着目し、その数や機能における LPS の影響について検討した。まず、ミトコンドリアの数の変化を調べるために、ミトコンドリア DNA の相対コピー数を測定した。卵母細胞の成熟に伴い、ミトコンドリアはその数を増加させる (Van Blerkom et al., 1995)。ヒトにおいて、卵母細胞内のミトコンドリア DNA のコピー数の低下が卵子成熟および受精の障害に関連する可能性のあることが報告されている (Reynier et al., 2001)。本研究の結果から、体外成熟過程の卵母細胞に含まれるミトコンドリア DNA の相対コピー数は、LPS 処理による影響を受けないことが示された。このことから、LPS は卵母細胞内のミトコンドリアの合成や分解には影響を及ぼさない可能性が考えられる。

前述したように、LPS が卵母細胞の成熟過程におけるミトコンドリア DNA のコピー数に影響をしなかったことから、次に、卵母細胞の成熟過程における

ミトコンドリアの局在に対する LPS の影響について調べた。卵母細胞の成熟に伴うミトコンドリアの局在変化は、細胞質成熟と密接に関連していることが示されている。ウシにおいて、十分な細胞質成熟を起こした卵母細胞では、活性化したミトコンドリアが細胞質全体に拡散する割合が高いのに対し、細胞質成熟が不十分な卵母細胞では、ミトコンドリアが細胞質全体に拡散することなく表層部に凝集したままの状態の卵母細胞の割合の高いことが報告されている (Stojkovic et al., 2001)。本節において、LPS の存在下で卵母細胞を成熟させたとき、ミトコンドリアが細胞質全体に拡散している卵母細胞の割合は減少した。LPS が何らかの機序により細胞質成熟を阻害したと考えられるが、現在ではその阻害機構を考察するのに十分な情報がない。体細胞におけるミトコンドリアの細胞質内の拡散移動には細胞骨格である微小管やモータータンパク質であるダイニンやキネシンが関与することが一般的に知られている。したがって、卵母細胞の細胞質においても、これらの関連因子が LPS によって影響を受けている可能性が推察される。

次に、卵母細胞の成熟過程におけるミトコンドリアの膜電位に対する LPS の影響について考察する。ミトコンドリアの内膜をまたぐプロトン勾配と、それにより生じる膜電位差は、ATP の合成と輸送に必要不可欠である。この膜電位差が消失すると、ミトコンドリアは脱共役を起こし、ATP 合成が低下する。Thouas et al. (2004) は、光増感物質によりミトコンドリアの膜電位差を低下させたマウス卵母細胞では、胚盤胞への発生率が低下したことを報告している。本研究では、LPS 処理によってミトコンドリアの膜電位差が低下した。このことから、LPS 存在下で成熟した卵母細胞では ATP 産生が低下し、受精後の胚発生が阻害される可能性が推察される。また、ミトコンドリア膜電位差の低下は初期のアポトーシスの指標としても用いられている。本章第 1 節において、卵

胞液中の LPS 濃度は卵胞構成細胞における caspase-3 遺伝子発現の増加との関連性があることが認められ、LPS によるアポトーシス誘導の可能性が示唆された。卵母細胞においても同様に、LPS がアポトーシスを誘導することで、ミトコンドリア膜電位差の低下が生じたのかもしれない。

(4) 結論

LPS は卵母細胞の核成熟および細胞質成熟を阻害することが明らかになった。卵母細胞の成熟過程において、LPS は卵母細胞の減数分裂の進行を抑制して核成熟を阻害することで、排卵後の受精を起こりにくくすると考えられた。また細胞質において、LPS はミトコンドリアの数ではなく、成熟に伴うミトコンドリアの細胞質への拡散や膜電位活性などの機能に影響を与えることが明らかになった。このミトコンドリアの機能不全による卵母細胞の細胞質成熟阻害は、受精後の胚発生に悪影響を与える可能性が示唆された。

4-2-5 図および表

Table 4.2.1 Primer pairs used for the detection of mRNA and DNA

Genes	Primer sequence (5' → 3')	Size (bp)	Annealing temp.(C)	GenBank Accession No.
<i>LPS receptor</i>				
TLR4	For: CTT GCG TAC AGG TTG TTC CTA A Rev: CTG GGA AGC TGG AGA AGT TAT G	153	56	NM174198
CD14	For: GGG TAC TCT CTG CTC AAG GAA C Rev: CTT GGG CAA TGT TCA GCA C	199	56	NM174008
MD2	For: GGG AAG CCG TGG AAT ACT CTA T Rev: CCC CTG AAG GAG AAT TGT ATT G	204	54	DQ319076
<i>Mitochondrial DNA copy number</i>				
MtDNA	For: TAT TGG CCG TAG CAT TCC TTA CG Rev: TGC ATC GGC GAT GGG TTG AAG	115	54	KJ789953.1

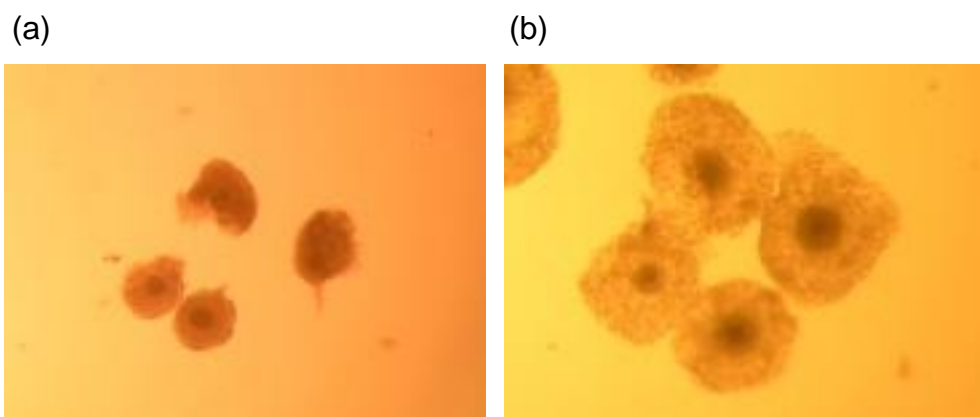


Fig. 4.2.1 (a) Bovine cumulus-oocyte complexes (COCs) before in vitro maturation (IVM). Immature oocytes were surrounded by multilayered cumulus investment. (b) COCs after IVM. Matured oocytes were surrounded by expanded cumulus investment. COCs for IVM were isolated from small follicles (2 to 5 mm in diameter).

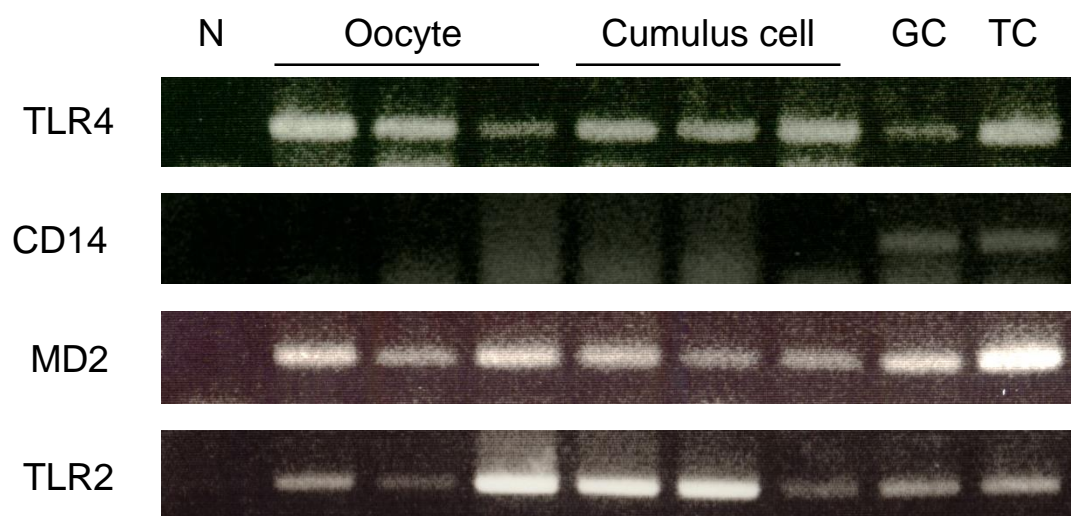


Fig. 4.2.2 Analysis of mRNA expression associated with LPS receptors in oocytes and cumulus cells before *in vitro* maturation. Oocytes and cumulus cells were isolated from small follicles (2 to 5 mm in diameter). GC: bovine granulosa cells TC: bovine theca cells.

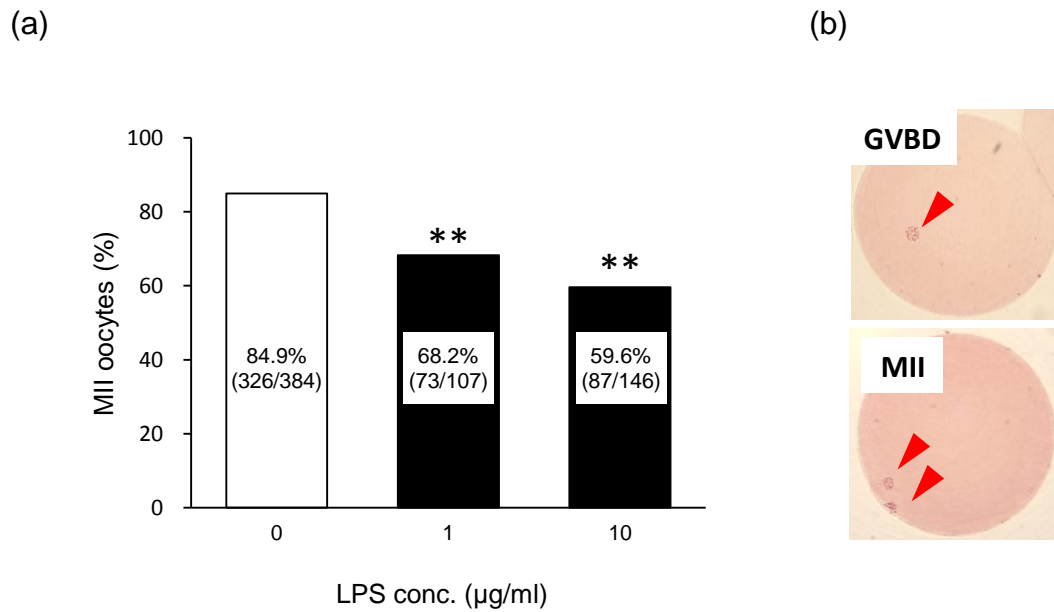


Fig. 4.2.3 Effect of LPS during oocyte maturation on (a) Meiotic progression rate to metaphase-II (MII) oocyte after 23 h of culture. (b) Oocyte at germinal vesicle break down (GVBD) and MII stage. Evaluation was performed on 5 independent experiments with >100 COCs per a group. Arrowhead; chromosome. All values are shown as means \pm SEM. Values with asterisks are different compared with control (**: $P < 0.01$).

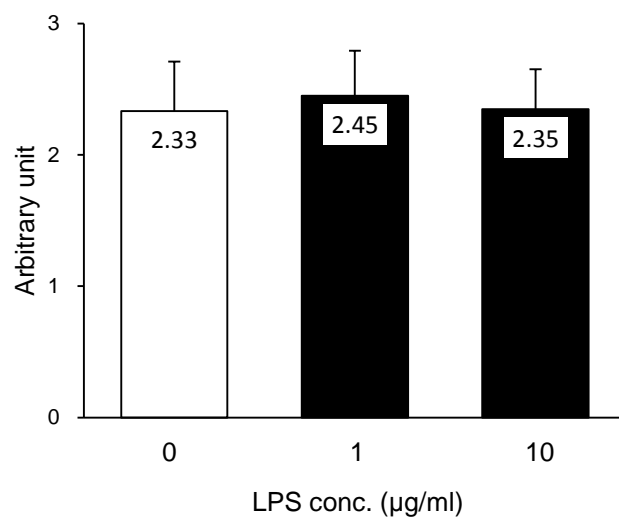


Fig. 4.2.4 Effect of LPS during oocyte maturation on mitochondrial DNA (MtDNA) copy number after 23 h of culture. Evaluation was performed on 5 independent experiments with >50 COCs per a group. All values are shown as means \pm SEM.

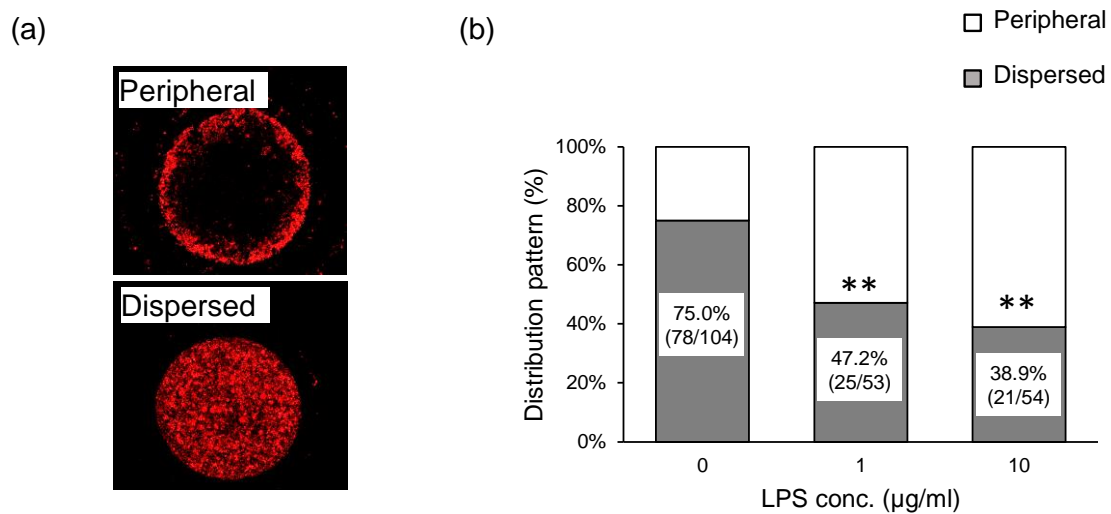


Fig. 4.2.5 Effect of LPS during oocyte maturation on mitochondrial after 23 h of culture. (a) Peripheral or dispersed distribution of mitochondria determined by MitoTracker Orange in oocytes. (b) The ratio of distribution pattern. Evaluation was performed on 5 independent experiments with >50 COCs per a group. All values are shown as means \pm SEM. Values with asterisks are different compared with control (**: $P < 0.01$).

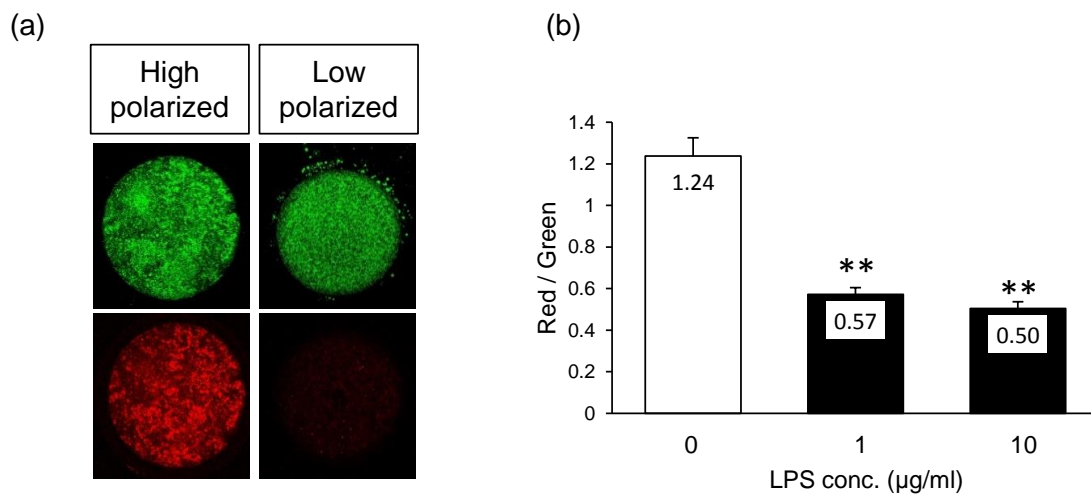


Fig. 4.2.6 Effect of LPS during oocyte maturation on mitochondrial membrane potential after 23 h of culture. (a) Oocytes with high polarized or low polarized mitochondria detected by JC-1 dye. (b) Relative mitochondrial membrane potential expressed as the ratio of intensity red (J-aggregate; high membrane potential) and green (J-monomer; low membrane potential). Evaluation was performed on 5 independent experiments with >50 COCs per a group. All values are shown as means \pm SEM. Values with asterisks are different compared with control (**: $P < 0.01$).

第 3 節

胚の発生能における LPS の影響

4-3-1 目的

成熟した卵母細胞に精子が侵入すると、卵母細胞は第二減数分裂を再開して第二極体を放出し、雌性前核を形成する。卵母細胞の細胞質で精子は雄性前核を形成し、雌性前核と雄性前核の融合によって受精が成立する。受精卵は有糸分裂を伴う卵割を繰り返して胚盤胞へと発生し、拡張した胚盤胞が子宮に到達して着床することにより妊娠が成立する。すなわち、卵母細胞の成熟は受精や胚発生において必須の過程である。

本章第 2 節で行ったウシ卵母細胞の体外成熟培養において、LPS はウシ卵母細胞の核成熟および細胞質成熟を阻害することが明らかになった。LPS により卵母細胞の核成熟や細胞質成熟が阻害されることにより、排卵後の受精や胚発生が起こりにくくなる可能性が考えられるが、LPS が胚発生能に与える影響は明らかになっていない。そこで本節では、LPS による核成熟および細胞質成熟の阻害作用が受精や胚発生に及ぼす影響について明らかにするために、LPS 存在下で成熟させた卵母細胞を用いて体外受精を行い、受精卵の発生能を検証した。

4-3-2 材料および方法

(1) 卵巣の採取

卵巣の採取は第 3 章第 2 節と同様の手順で行った。

(2) 体外成熟培地の作製

体外成熟培地の作製は、第 4 章第 2 節と同様の手順で行った。

(3) 卵丘細胞－卵母細胞複合体の採取

卵丘細胞－卵母細胞複合体の採取は、第 4 章第 2 節と同様の手順で行った。

(4) 体外成熟培養および LPS 処理

卵母細胞の体外成熟培養および LPS 処理は、第 4 章第 2 節と同様の手順で行った。

(5) 体外受精および発生培地の作製

BO 液 (媒精用基本液; Research Institute for the Functional Peptides Co. Ltd., Higashine, Japan) に 7.5 mg/ml のヘパリンナトリウム (180 USP units/mg; Sigma-Aldrich Japan Inc., Tokyo, Japan) および 5 g/ml のウシ血清アルブミン (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) を添加して濾過滅菌し、精子洗浄用培地とした。媒精には、媒精用培養液 (IVF 100; Research Institute for the Functional Peptides Co. Ltd., Higashine, Japan) を用い、成熟卵母細胞の洗浄用に 300 μ l, 媒精用に 100 μ l のドロップを 35 mm ディッシュ上に作製し、ドロップの周囲を流動パラフィンで覆った。受精卵の発生培養には裸化受精卵培養液 (IVD 101; Research Institute for the Functional Peptides Co. Ltd., Higashine, Japan) を用い、受精卵の洗浄用に 300 μ l, 発生培養用に胚 1 個当たり 10 μ l の大きさのドロップを作製し、流動パラフィンで覆った。培地は全て使用前日に作製し、BO 液および媒精用培地は CO₂ インキュベーター内 (38.5 °C, 5% CO₂, 95% air, 湿度飽和気相) に、発生培地はマルチガスインキュベーター内 (38.5 °C, 5% CO₂,

5% O₂, 90% N₂, 湿度飽和気相) に静置してガス平衡を行った。

(6) 精子洗浄

ウシ凍結精液 (ジェネティクス北海道より提供, JP3H54718, ルマン, H25/2/4) を 35 °C のお湯の中で 30 秒間融解し, 融解精液は 38.5 °C に加温した精子洗浄液 6 ml 内に懸濁した後遠心分離 (500 × g, 室温, 5 分間) を行った。上清を除去した後, 38.5 °C に加温した 6 ml の精子洗浄液を加えてゆっくりと攪拌し, 再び遠心分離 (500 × g, 室温, 5 分間) を行った。上清を除去した後, 1 ml の精子洗浄液を加えて精子を懸濁した。10 μl の精子懸濁液を 990 μl の 3% NaCl 溶液と混合して精子を非動化し, Thoma 血球計算版を用いて精子数のカウントを行った。精子洗浄液を用いて 10 × 10⁶ 精子/ml となるように精子懸濁液を希釈し, 媒精に供した。

(7) 媒精

濃度調整後の精子懸濁液 100 μl を媒精用ドロップに滴下し, 実体顕微鏡下で精子の活性を確認した (精子の最終濃度; 5 × 10⁶ 精子/ml)。体外成熟後の卵丘細胞-卵母細胞複合体を洗浄用ドロップに移し, 3 個のドロップを移動させながら洗浄を行った。洗浄した卵丘細胞-卵母細胞複合体を媒精用ドロップに移し, CO₂ インキュベーター内 (38.5 °C, 5% CO₂, 95% air, 湿度飽和気相) で 8 時間媒精させた。

(8) 裸化および発生培養

媒精後, 精子洗浄液 100 μl を入れた 1.5 ml マイクロチューブに受精卵を移し, マイクロチューブを 3 分間ボルテックスにかけて卵丘細胞を受精卵から分

離させた。卵丘細胞を除去する前後の受精卵の様子を Fig. 4.3.1 に示した。マイクロチューブの中身を全て 35 mm ディッシュに移し、実体顕微鏡下でマウスピースに接続したガラスキャピラリーを用いて受精卵をピックアップし、受精卵洗浄用ドロップに移した。受精卵は、3 つのドロップを順次移動させながら洗浄を行い、洗浄した受精卵を発生培養用ドロップに移してマルチガスインキュベーター内 (38.5 °C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, 湿度飽和気相) で 9 日間培養を行った。胚の形態観察は毎日行い、退行・発生停止胚は別のドロップに移しながら発生培養を行った。胚発生の様子を Fig. 4.3.2 に示した。3 日おきに発生培養用ドロップの半量を交換した。交換用の発生培地は 1.5 ml チューブに必要量を用意し、流動パラフィンで覆って蓋をあけ、マルチガスインキュベーター内 (38.5 °C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, 湿度飽和気相) で 1 時間以上ガス平衡を行った。発生培養 2 日目に卵割率の、8 日目に胚盤胞発生率の評価を行い、それぞれ以下の計算式により算出した。

卵割率 [%] : (2-8 細胞期胚の数) / (媒精した卵母細胞の数) × 100

胚盤胞発生率 [%] : (胚盤胞の数) / (卵割した受精卵の数) × 100

(9) 統計解析

受精卵の卵割率および胚盤胞発生率の解析にはカイ二乗検定を用い、無処理区に対する 1 µg/ml および 10 µg/ml の LPS 処理区それぞれの組み合わせで検定を行った。期待値が 5 以下であった場合、イエーツ補正を行った。統計学的解析には Stat View 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, USA) および JMP 5.1 (SAS Institute Inc., Cary, USA) を用いた。P < 0.05 の場合に有意差ありとした。

4-3-3 結果

(1) 受精卵の卵割に及ぼす LPS の影響

発生培養 2 日目の胚における卵割率の結果を Fig. 4.3.3 に示した。1 $\mu\text{g/ml}$ および 10 $\mu\text{g/ml}$ の LPS 存在下で体外成熟培養を行った卵母細胞における媒精後の卵割率はそれぞれ 65.9% および 69.9% であり，無処理の卵母細胞の卵割率 (79.1%) に比べ有意に低下した ($P < 0.01$)。本章第 2 節において得られた卵母細胞の核成熟率に対する卵割率の割合 (Cleavage/MII) を Table 4.3.1 に示した。核成熟率に対する卵割率の割合においては，LPS 存在下で体外成熟培養を行った卵母細胞と無処理の卵母細胞との間に有意な差は認められなかった。

(2) 胚盤胞への発生に及ぼす LPS の影響

発生培養 8 日目の胚における胚盤胞発生率の結果を Fig. 4.3.4 に示した。1 $\mu\text{g/ml}$ および 10 $\mu\text{g/ml}$ の LPS 存在下で体外成熟培養を行った卵母細胞における胚盤胞への発生率はそれぞれ 26.4% および 24.2% であり，無処理の卵母細胞の発生率 (43.0%) に比べ有意に低下した ($P < 0.01$)。

4-3-4 考察

本節では、LPS 存在下で成熟した卵母細胞において、核成熟および細胞質成熟が阻害されたことから、その後の受精や胚発生に及ぼす影響について検証した。その結果、LPS の曝露を受けながら成熟した卵母細胞では、受精後の卵割率および胚盤胞発生率ともに低下した。

(1) 卵母細胞の発生能に及ぼす LPS の影響

マウスの卵母細胞を用いた研究において、LPS が添加された発生培地で培養した場合、胚盤胞への発生率が低下することが報告されている (Dubin et al., 1995; Athanassakis et al., 2000)。一方、同様の培養条件で研究した他の報告では、受精卵や胚の生存性に影響を与えなかったことを示している (Dumoulin et al., 1991)。また、ウシの卵母細胞を用いた研究において、受精培地に加えたウシ血清アルブミンへの LPS 混入は、胚の発生能には影響を与えなかったが、多精子受精を増加させたことが明らかになっている (Madison et al., 1991)。これらの研究報告は、全て生理的な条件下で成熟させた卵母細胞を用いて受精後の胚発生過程における LPS 曝露の影響を調べたものであることから、本節で用いたモデルとは異なる。したがって、本節で行った LPS 曝露下で成熟した卵母細胞の受精能および胚発生能を検証することは、卵胞内で引き起こされる LPS の卵母細胞への現象をより詳細に検討することができると考えられる。

Soto et al. (2003) は、ウシ卵母細胞の体外成熟培養における LPS 曝露により、体外受精後の卵割率には影響しないが、胚盤胞への発生率が低下したことを報告している。この結果は、LPS 存在下で成熟した卵母細胞において、卵割率および胚盤胞発生率ともに低下が認められた本研究における知見と一致している。興味深いことに、Soto et al. (2003) の報告では、LPS を含まない培地で体外成熟

培養および体外受精を行い、発生培地にのみ LPS を添加した場合には、胚盤胞発生率の低下が認められないことを報告している。この研究結果と本節の結果から、卵母細胞における LPS の影響は受精後の胚発生過程ではなく、成熟過程において顕著であり、成熟過程に LPS が存在することでその後の発生に影響を及ぼすことが推察される。

(2) LPS が卵母細胞の発生能を低下させる機構

本節において認められた卵割率の低下は、受精もしくは卵割自体への影響によるものではなく、LPS による核成熟阻害の結果生じたものと推察される。事実、核成熟率に対する卵割率の割合においては、LPS 曝露による差は認められなかった。卵母細胞は、2 回の減数分裂によってその核相を 2 対の相同染色体からなる二倍体 $2n$ ($4c$) から 1 本の染色分体からなる一倍体 n (c) へと変化させる。核成熟過程において核相を半減することは、一倍体 n (c) の精子と融合して二倍体 $2n$ ($2c$) となるために必須の過程である。本研究では、卵母細胞の体外成熟過程における LPS 曝露により減数分裂の進行が阻害されたことにより、受精が成立しなかった可能性が高い。一方、胚盤胞への発生率の低下は、LPS による細胞質成熟の阻害、つまりはミトコンドリアの機能不全に関連している可能性が推察される。現在の体外成熟培養技術では、卵母細胞を MII 期まで高率に成熟させることはできても、体外受精後の胚発生率は生体内で成熟した卵母細胞と比較して著しく低い (Gilchrist and Thompson, 2007)。体外受精卵の発生率が低い原因として、細胞質成熟が不十分であることが考えられているが、体外成熟卵の発生能に関わる因子はいまだに明らかになっていない。エネルギーの生産器官であるミトコンドリアの分布の再構築は、卵母細胞の受精および胚発生能の獲得に重要な役割を果たすことが報告されている (Brevini et al., 2007)。こ

の理由として、胚発生能獲得のためには、活性化したミトコンドリアが細胞質全体へ拡散し、卵母細胞全体にエネルギー供給をする必要があること (Brevini et al., 2007), ミトコンドリアが小胞体の近傍に配置されることで、受精時の Ca^{2+} オシレーションに伴うミトコンドリアー小胞体間での Ca^{2+} の伝達を最適にしていること, などが考えられている (Wakai, 2012)。本章第 2 節において, LPS はミトコンドリアが細胞質全体に拡散している卵母細胞の割合を減少させた。その結果, 卵母細胞全体へのエネルギー供給の低下, もしくは Ca^{2+} オシレーションにより誘導される卵母細胞の活性化の阻害が生じ, 胚発生能が低下したのかもしれない。

(3) 結論

LPS は、卵母細胞の成熟過程において獲得される胚発生能を低下させることが明らかになった。炎症性子宮疾患においては、子宮や卵巣が正常な状態に回復し、排卵するにも関わらず受胎しないウシが問題となっている。この原因として、卵胞液中に存在する LPS が卵母細胞の成熟機構を阻害することで、排卵する卵子の胚発生能が低下し、着床に至らないということが考えられる。今後は、胚盤胞の細胞数評価や遺伝子発現の解析など、胚盤胞の質の評価を行う必要がある。また、本研究では卵母細胞の細胞質成熟を評価するためにミトコンドリアに着目したが、小胞体や表層顆粒といった他の細胞内小器官についても評価を行うことにより卵母細胞の発生能に及ぼす LPS の影響がより明確化されることが考えられる。

4-3-5 図および表

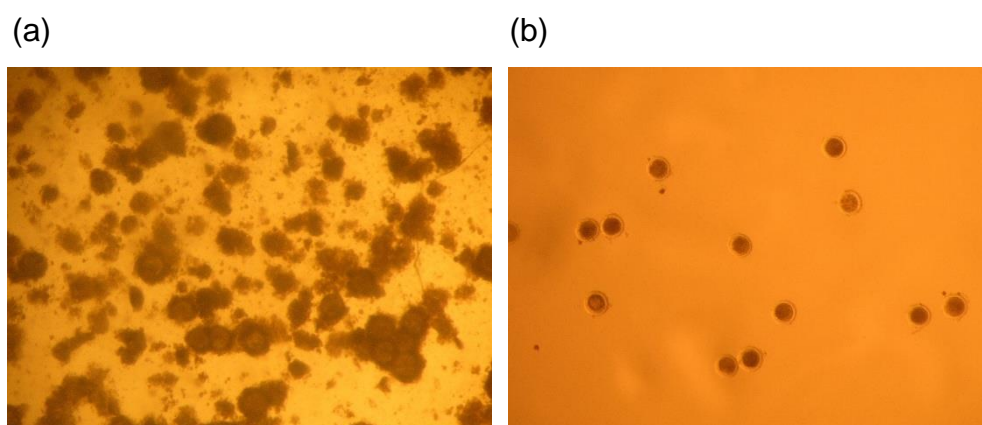


Fig. 4.3.1 (a) Bovine zygotes surrounded by cumulus cells after 8-h of *in vitro* fertilization. (b) Denuded zygotes after the removal of cumulus cells and washing.

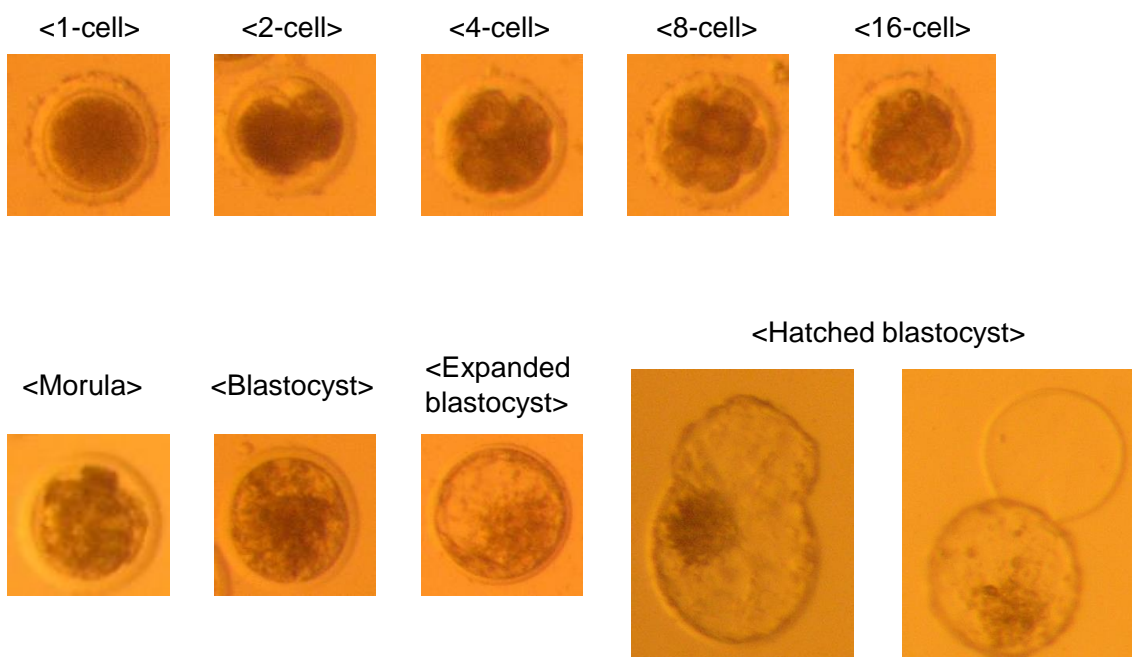


Fig. 4.3.2 The development of bovine embryos. Embryos were cultured *in vitro* until 8 days after *in vitro* fertilization.

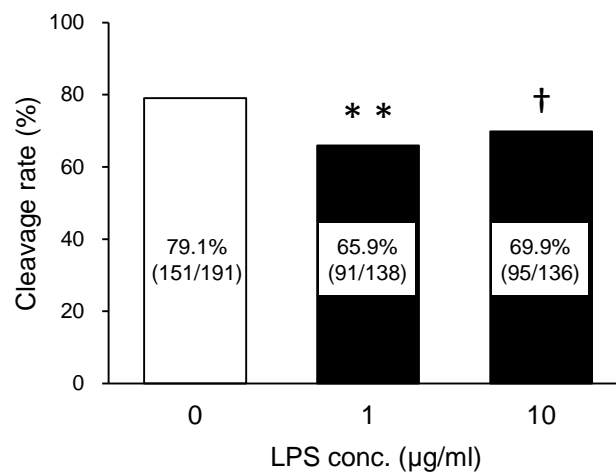


Fig. 4.3.3 Effect of LPS during oocyte maturation on percentage of oocyte that cleaved on day 2 after fertilization. Evaluation was performed on 5 independent experiments with >100 COCs per a group. All values are shown as means \pm SEM. Values with asterisks are different compared with control (\dagger : $P < 0.1$, **: $P < 0.01$).

Table 4.3.1 Relative ratio of cleavage rate to meiotic progression

LPS ($\mu\text{g/ml}$)	MII oocytes (%)	Cleavage (%)	Cleavage/MII
0	85.3	82.2	0.96
1	68.1	67.0	0.98
10	61.9	67.8	1.10

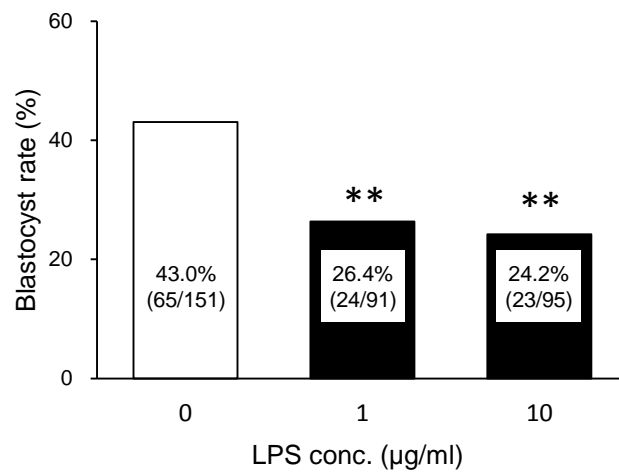


Fig. 4.3.4 Effect of LPS during oocyte maturation on percentage of embryo that developed to the blastocyst stage on day 8 after fertilization.. Evaluation was performed on 5 independent experiments with >100 COCs per a group. All values are shown as means \pm SEM. Values with asterisks are different compared with control (**: $P < 0.01$).

第 5 章

総合考察

乳牛の淘汰理由の約半数は不受胎などの繁殖障害が占めており、酪農経営において大きな経済的損失を生じさせている。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。炎症性子宮疾患を患ったウシでは卵巣機能の不全がみられることから (Williams et al., 2007)、子宮の治療に加えて、ホルモン剤の投与による卵巣機能の回復が試みられてきた。しかしながら、子宮や卵巣が治癒したように見えても低受胎の乳牛が多くみられることから、有効な治療法がないのが現状であり、その被害は看過できないほどである。

本研究では、炎症性子宮疾患による乳牛の卵巣機能低下の発症機序が未だ十分に解明されていないことから、卵巣機能低下に対する免疫学的アプローチおよび内分泌学的機序として卵胞・卵子の細胞学的アプローチを試み、炎症性子宮疾患の卵巣機能に対する即時的効果とキャリーオーバー効果について検証した。

炎症性子宮疾患における即時的効果の概要を Fig. 5.1 に示した。まず、卵巣機能低下に対する免疫細胞の関与については、乳牛における子宮の炎症時の末梢血白血球の活性酸素産生能を経時的に追跡した研究がなかったことから、子宮炎牛における分娩前後の白血球の活性酸素産生能を検証した。本研究の結果から、末梢血白血球の活性酸素産生能は分娩後の子宮炎牛で高く推移していること、また分娩後の乳牛の白血球における活性酸素産生能は、分娩後 0-3 週において LPS に対してその産生能が顕著に増加することが明らかとなった。このよ

うな白血球の活性酸素産生による感染防御機構は、生体への侵入細菌に対する基本的な機構であると考えられるが、この産生された活性酸素は殺菌だけでなく、その周囲に存在する正常な細胞をも破壊し、組織障害や臓器不全を引き起こすことが報告されている (Shawcross et al., 2010)。このようなことから、子宮炎牛で認められた活性酸素産生能の増強は、好中球をはじめとする血中の免疫担当細胞を損傷することにより病原体への抵抗性を減少させている可能性が考えられる。すなわち、分娩後に子宮炎に罹ったウシのうちおよそ半数は分娩後 3 週以降に子宮内膜炎に移行するが (Sheldon et al., 2009a)、子宮で産生された LPS が血中へと移行することによって感染防御能力が低下し、子宮の炎症を長期化させている可能性が考えられる。

卵巣内では卵胞発育、排卵、黄体形成および黄体退行が内分泌的調節のもと周期的に繰り返されている。この性周期の過程のうち、活性酸素は排卵および黄体退行に関与していることが報告された (Sugino, 2005)。下垂体からの LH サージ状分泌を受けた卵胞は、基底膜の融解および卵胞膜細胞から顆粒層細胞への血管の侵入という排卵現象を引き起こす。この排卵過程では、サイトカインの誘導により卵胞内に遊走した好中球やマクロファージが活性酸素を産生するようになる (Sugino et al., 1996; Nakamura et al., 1999)。この時、炎症性子宮疾患に罹患したウシでは血中もしくは卵胞液中に存在する LPS の刺激により好中球の活性酸素産生能が上昇し、その結果、卵胞内に内包される卵母細胞は過剰に産生された活性酸素の曝露を受ける可能性が推察される。活性酸素は卵母細胞の質を低下させ、受精障害を引き起こすことから (Tamura et al., 2008)、炎症性子宮疾患による受胎率低下の一因として、LPS により白血球から過剰産生された活性酸素による卵母細胞の障害が考えられる。

主席卵胞で産生されるエストラジオールは、顆粒層細胞における FSH 受容体

の発現を誘導することにより卵胞発育を促進し、さらに脳下垂体へのポジティブフィードバックにより LH のサージ状分泌を引き起こすことによって排卵を誘導する。このように、エストラジオールは視床下部・下垂体におけるゴナドトロピン分泌制御や卵胞成熟など卵胞発育および排卵に中心的な役割を果たしている。本研究の結果から、卵胞液中の LPS 濃度が高い卵胞では、卵胞液中のエストラジオール濃度が低く、顆粒層細胞におけるエストラジオール産生関連の遺伝子発現の低下が認められた。さらに、卵胞構成細胞の体外培養システムを用いた過去の研究において、LPS はウシ大卵胞および小卵胞より採取した顆粒層細胞におけるエストラジオール産生を抑制することが明らかになった (Herath et al., 2007; Shimizu et al., 2012)。これらのことから、炎症性子宮疾患罹患牛では、子宮で産生された LPS が卵胞液中に移行し、エストラジオールの産生を抑制することにより、卵胞発育および排卵が阻害されると考えられる。加えて、正常に排卵が起こったとしても、エストラジオール産生の低下による発情兆候の微弱化や発情持続時間の短縮が酪農家による発情の見逃しの増加に関係している可能性が高く、人工授精のタイミングを逃してしまう要因になると考えられる。

卵胞内に存在する一次卵母細胞は、LH サージを受けると第一減数分裂を再開し、第一極体を放出して二次卵母細胞となる。二次卵母細胞はそのまま第二減数分裂を進行させ、分裂中期 (MII 期) で再び停止した状態で排卵され、卵管膨大部で精子の侵入を待つ (Eppig, 1996)。第一減数分裂の再開から排卵までの過程を模倣している体外成熟培養において LPS 曝露を行った本研究の結果から、核成熟および細胞質成熟が阻害されること、また体外受精後の卵割率および胚盤胞発生率が低下することが明らかとなった。これらの結果は、炎症性子宮疾患に罹患した牛にみられる、子宮や卵巣が正常な状態に回復し排卵するにも関

わらず受胎しないという現象を説明できるかもしれない。すなわち、本研究において認められた LPS による卵母細胞の成熟不全において、核成熟阻害は受精障害に、細胞質成熟は早期胚死滅に関与している可能性が推察される。事実、人工授精を実施しても受胎が成立しない要因として、受精が成立しない受精障害および受精成立後の早期胚死滅の 2 つが考えられるためである。早期胚死滅は、乳牛における受胎率低下の最も大きな要因の一つであり、胚死滅率は 40% 以上と報告されている (Thatcher et al., 2002)。このように、卵胞内に存在する LPS は卵胞構成細胞の機能に影響するだけでなく、卵母細胞の質にも影響し、乳牛の受胎率の低下の要因になっている可能性が考えられる。

炎症性子宮疾患において、適切な治療が行われ治癒したと思われても、同じ牛群内の正常牛よりも罹患牛で受胎性が低下することが報告されている (Borsberry and Dobson, 1989)。さらに、Green et al. (2011) は分娩後に子宮内膜炎と診断され、その後治癒して子宮内膜からの多型核好中球の消失が確認されたウシにおいて、大卵胞の卵胞液中エストラジオール濃度が低下していたことを報告している。これらの報告は、感染時の即時的影響の他に、治癒後も長期間にわたり卵巣卵胞への影響が持続するキャリアオーバー効果が存在することを示唆しているが、その機序は未だ不明である。本研究では、子宮炎牛における末梢血中 LPS 濃度および免疫応答の変化を経時的に解析することにより、炎症性子宮疾患における LPS とキャリアオーバー効果との関連性を検証した (Fig. 5.2)。その結果、子宮炎牛の血中 LPS 濃度は健康牛と比較して分娩後 3.5 週まで有意に高く、分娩後 6 週においても有意に高い傾向が認められ、さらに末梢血中の好中球活性酸素産生能が分娩後 7 週まで高値であることが明らかとなった。血中 LPS 濃度の解析に用いた子宮炎牛 5 頭のうち 4 頭は、メトリチェックにより評価した膣内粘液のスコアが分娩後 5 週までに 2 以下となり子宮

の炎症は消失したと診断された。このことから、血中 LPS 濃度の上昇や活性酸素産生能の亢進が炎症消失後も存在すること（キャリアオーバー効果）による持続的な酸化ストレス状態が卵胞機能や卵母細胞の質に影響していることが推察される。

免疫細胞におけるキャリアオーバー効果については、リンパ球のなかでも CD 8 陽性細胞の増加が早期胚死滅や着床障害に関連することが示唆されている (Banos et al., 2013)。本研究の結果から、子宮炎牛では末梢血白血球のポピュレーションの変化が分娩後 8 週まで持続的に続いていることが明らかとなった。このことは、子宮の炎症が消失した後も長期にわたって免疫応答を変化させている可能性を示唆しており、炎症性子宮疾患における繁殖機能低下の原因となっている可能性が推察される。

子宮炎の自然発症症例において、卵巣に存在する 7 個の卵胞のうち 1 個の卵胞で子宮内貯留液もしくは血中よりもはるかに高濃度の LPS が確認された。このことから、子宮の炎症によって生じた LPS が、特異的もしくは選択的に卵胞に蓄積する可能性が示唆されたとともに、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 が存在することが明らかになり、子宮の炎症が消失した後も LPS が卵胞液中に蓄積する可能性が推察された。先に述べたとおり、卵胞液中の LPS は卵胞構成細胞に直接作用し、そのステロイドホルモン産生を抑制する。したがって、子宮が治癒したように見えても、卵胞液中に蓄積した LPS により、卵胞の機能が影響を受け続けることが推察される。本研究では、炎症性子宮疾患罹患牛における卵胞液中 LPS 濃度の経時的変化については検討していない。卵胞への LPS 蓄積の可能性を明らかにするためには、分娩後の乳牛を用いた経時的な卵胞吸引により、子宮の炎症と卵胞液中 LPS 濃度の関連性について詳細に調べていく必要がある。

体外成熟培養および受精卵の体外発生培養を用いた第 4 章の研究により、LPS は卵母細胞の成熟過程において獲得される胚発生能を低下させることが明らかになった。体外成熟培養における卵核胞期 (GV 期) の卵母細胞の成熟過程は、ゴナドトロピンによる成熟促進作用などにより 24 時間以内に完了する。一方、ウシ生体内において、GV 期の卵母細胞が排卵時の状態である MII 期に到達するまでに約 60 日を要する (Lussier et al., 1987; Bromfield and Sheldon, 2011)。この 60 日という期間は、分娩後の voluntary waiting period を終えて、人工授精が再開されるまでの日数に相当する。分娩後早期に発生する子宮の炎症によって LPS が卵胞液中に蓄積した場合、LPS の影響を受け続けながら 60 日間かけて成熟した卵母細胞の胚発生能は低下していると考えられるため、排卵しても受胎は成立しないことが推察される。しかし、分娩後 60 日では多くのウシで子宮の修復は完了し、卵巣周期も再開している。この、「子宮や卵巣が正常な状態に回復し、排卵が起こるのになぜか受胎しない」という現象において、LPS による卵母細胞の発生能の低下が関与していることが考えられる。つまり、子宮の炎症が消失した後も卵胞液中に存在する LPS が卵母細胞の成熟機構を阻害することにより卵子の胚発生能が低下し、着床に至らないという現象が、炎症性子宮疾患におけるキャリアオーバー効果の原因となっている可能性は高い。

今後の展望

本研究では、乳牛の炎症性子宮疾患における卵巣機能障害を解明するために、主要な感染細菌である *E. coli* が産生するエンドトキシンである LPS を取り上げ、卵巣機能に及ぼす炎症性子宮疾患の即時的影響とキャリアオーバー効果について検証した。本研究で得られた成果の概要として Fig. 5.1 に示したとおり、

炎症性子宮疾患における繁殖障害の発生機序として、1) 全身における免疫応答の長期的な変化、2) 卵胞液中に存在する LPS による排卵阻害および卵子の胚発生能低下、の主に 2 つが考えられる。これらの知見を、新たな治療法の提案へと役立てていくことが重要であると考えている。まず 1 つ目の免疫応答の変化に関しては、血中の LPS によって刺激された好中球活性酸素産生能の上昇により、酸化ストレスが生じることが推察されたことから、この酸化ストレスを軽減するような対処法が必要である。現時点では、抗酸化物質を体外培養培地に添加する試みが行われており、卵母細胞の成熟能、受精能および胚発生能に対する有効性が示唆されている (Ishizuka et al., 2000; Lee et al., 2010; Asgari et al., 2012)。このような結果を考慮し、飼料添加剤として用いられている β -カロテン、ビタミン E およびアスタキサンチンなどの抗酸化物質を炎症性子宮疾患に罹患した牛に給与することにより卵母細胞の質が向上し、繁殖機能の改善へとつながるのではないかと考えている。次いで 2 つ目の LPS による排卵阻害および卵子の胚発生能低下に対する治療法としては、既存の方法を応用したホルモン処置法が有用なのではないかと推察している。排卵阻害に対しては、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ や GnRH を組み合わせたオブシンク法を利用したホルモン処置により、排卵を人為的に誘導することができると考えられる。また、卵子の発生能低下の問題に関しては、受精卵移植において利用されている、FSH 投与による過排卵処置を繰り返すことによって、卵子の更新を促進できると考えられる。つまり、分娩後早期に発生する子宮の炎症の影響を受けた、発生能の低い卵子を連続的に排卵させた後に人工授精を行うことで、LPS の影響を受けていない、発生能の高い卵子を受精に用いることができる。しかしこの方法で排卵させた場合、LPS を含む卵胞液が腹腔内や卵管に混入することで、LPS により腹膜炎や卵管炎を誘発する可能性が考えられる。そこで、体外受精で利用されている経膈生体卵子

吸引によって LPS を含む卵胞液ごと卵子を吸引することで、卵胞内に蓄積した LPS と、LPS により発生能が低下した卵子の両方を生体から除去することができると考えられる。また、キャリアオーバー効果の発生機序として、血中および卵胞液中への LPS の蓄積が示唆されたことから、生体内に蓄積した LPS を除去するための手段の開発が望まれる。血中からの LPS の消失速度は、LPS の化学的構造や他の物質との結合状態、さらには個体の健康状態に大きく左右される。LPS は負の電荷を帯びているため、様々なカチオンタンパクと複合体を作ることが知られているが、分子量の大きい物質と結合することで、血中からの消失速度が速くなると報告されている。そのため、分子量の大きなカチオンタンパクの生体内投与などにより、血中からの LPS 除去が可能になるかもしれない。また、肝機能障害は LPS の代謝を遅らせることから、肝機能を正常な状態に維持するための、分娩前後の飼養管理が必要とされる。しかしながら、これまで述べてきた治療法はいずれも推測の域を出ない。本研究により得られた知見を新たな治療法の開発へと応用するために、さらなる研究が必要だと考えられる。

本研究により、LPS による即時的影響だけでなく、キャリアオーバー効果の存在が示唆された。この情報が、酪農家への疾病予防に対する啓蒙活動の一助となることが期待される。さらに、繁殖効率低下を防ぐ効果的な炎症性子宮疾患の治療・対処法など、獣医療の発展に貢献することが望まれる。

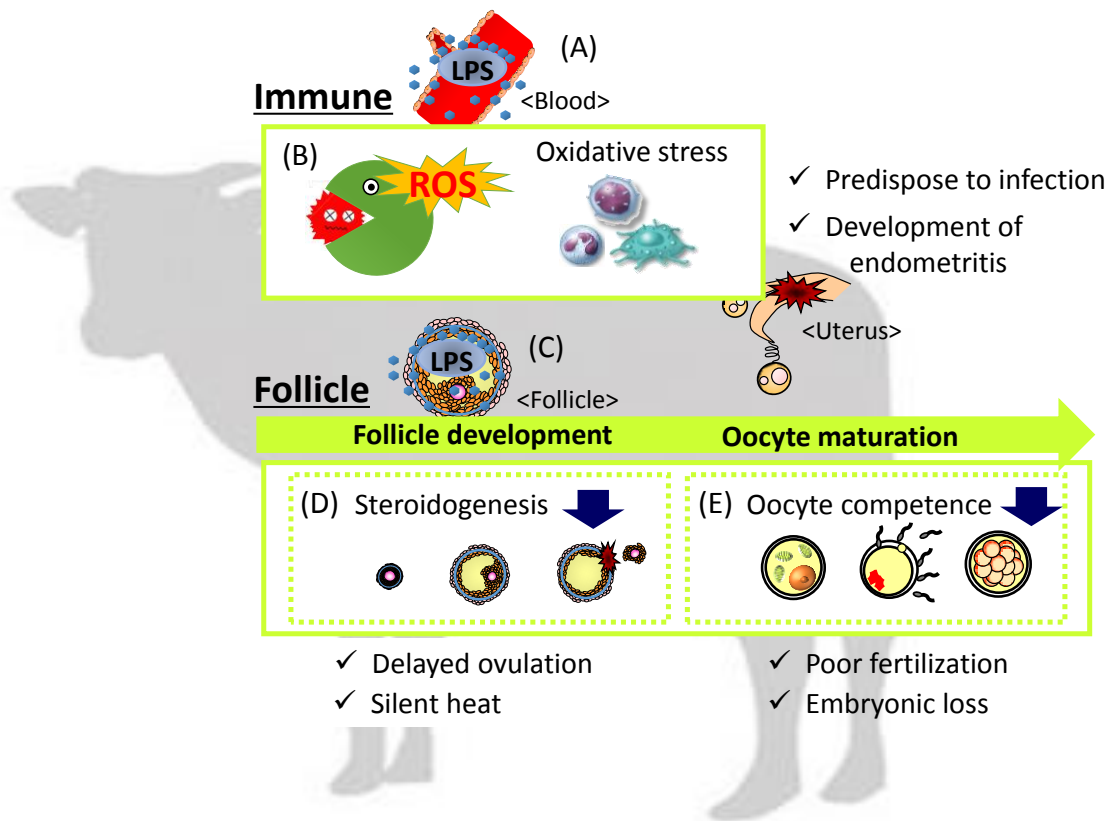


Fig. 5.1 The possible mechanisms of ovarian dysfunction associated with puerperal metritis. A) The cows with metritis had higher plasma LPS concentrations compared to those in healthy cows until 6 week postpartum. B) The excessive production of reactive oxygen species (ROS) by neutrophils in response to plasma LPS may predispose the individuals to infection and decide the development of endometritis. C) LPS was detected in the follicular fluid regardless of the severity of uterine inflammation. D) LPS present in follicular fluid inhibits follicular steroid production, resulting in the delayed ovulation and silent heat. E) LPS impairs the developmental competence of oocyte, which obstructs fertilization or embryo development.

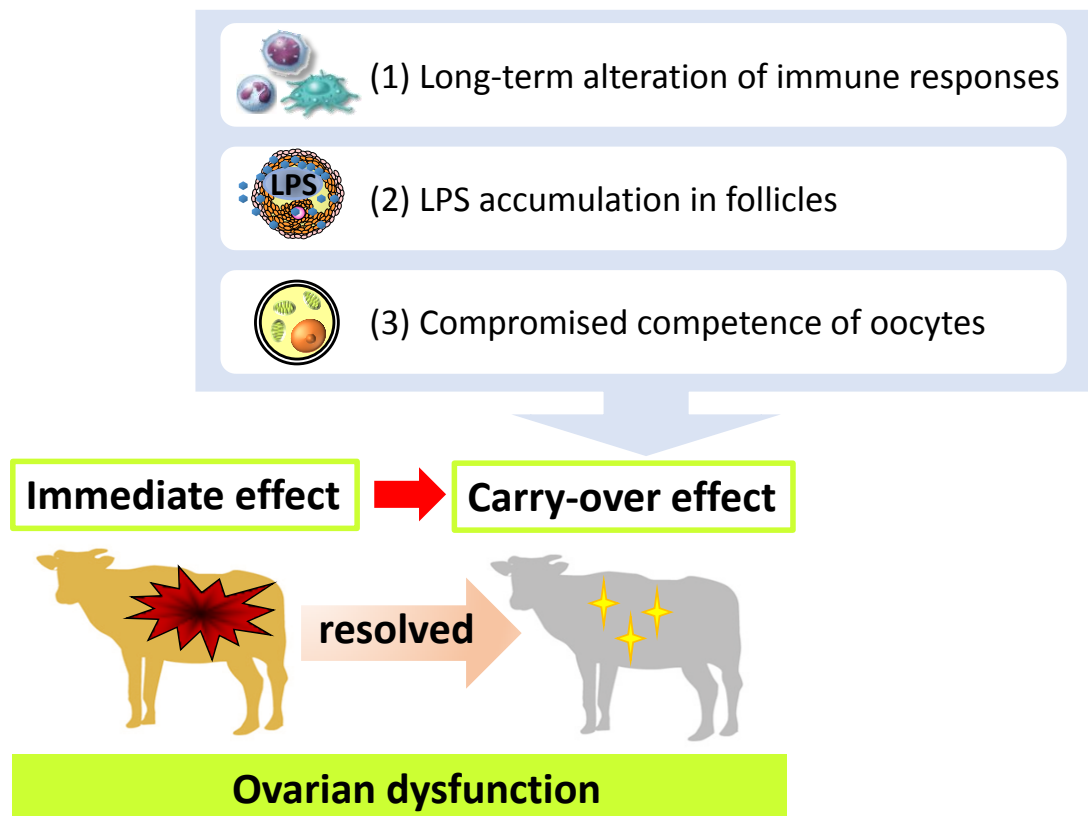


Fig. 5.2 The concept of the immediate and carry-over effect of uterine inflammation. Uterine infections not only cause infertility at the time of the infection, but also the reduced reproductive performance persists long after the infections have self-resolved; this is probably because of the carry-over effect of uterine inflammation. The present study highlights 3 possible mechanisms: 1) the effects of puerperal metritis on the immune responses such as the lymphocyte counts and the generation of reactive oxygen species by neutrophils persisted weeks after the uterine inflammation had self-resolved. 2) LPS was detected in the follicular fluid regardless of the severity of uterine inflammation. 3) The exposure of follicle-enclosed oocytes to LPS during uterine infection might have long-term consequences on the developmental competence of oocytes, leading to infertility following the resolution of infection.

謝辞

稿を終えるにあたり、指導教官として終始ご懇意なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました帯広畜産大学 畜産衛生学研究部門 動物医科学分野 清水隆准教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり、多くのご助言を賜りました同畜産衛生学研究部門 動物医科学分野 宮本明夫教授に深謝いたします。本論文のとりまとめに際し、ご懇篤なるご助言を賜りました同畜産衛生学研究部門 動物医科学分野 口田圭吾教授、同畜産衛生学研究部門 食品衛生学分野 耕野拓一准教授ならびに同臨床獣医学研究部門 予防獣医療学分野 松井基純准教授に感謝の意を表します。卵母細胞を用いた実験では、実験手法をご教授いただくとともに、多くのご助言を賜りました同畜産生命科学研究部門 家畜生産科学分野 手塚雅文教授ならびに原虫病センター 阿部靖之研究員に深謝いたします。また、本学畜産フィールド科学センターの牛群を用いた実験の遂行にあたり、同畜産フィールド科学センター 家畜防疫研究室 木田克弥教授、同畜産フィールド科学センター 川島千帆講師ならびに角田英さんには多大なるご協力を賜りました。ここに感謝の意を表します。子宮の病理組織学的検索においては、実験手法をご教授いただくとともに、多くのご助言を賜りました同基礎獣医学研究部門 病態予防学分野 古林与志安教授ならびに千葉史織さんに心から感謝いたします。また、子宮炎牛の症例検索に際して、症例を提供していただくとともに、臨床学的・病理学的診断において甚大なるご協力を賜りました同臨床獣医学研究部門 予防獣医学分野 猪熊壽教授ならびに同基礎獣医学研究部門 病態予防学分野 古岡秀文教授に深謝いたします。分娩前後の乳牛における免疫機能の検索に際してご援助・ご助言を賜りました同畜産生命科学

研究部門 家畜生産科学分野 花田正明准教授，同臨床獣医学研究部門 予防獣医療学分野 羽田真悟助教ならびに日本甜菜製糖株式会社 総合研究所 寺村誠研究員に感謝の意を表します。また，ウシの病態における臨床学的知見をご教授いただくとともに，本研究の遂行にあたり，有益なご助言を賜りました株式会社石井獣医サポートサービス 石井三都夫博士に深甚なる謝意を表します。研究活動を通してともに過ごした清水研究室の先輩・後輩諸氏には，本研究への深い理解のもと多大なるご協力およびご助言を頂きました。厚くお礼申し上げます。最後に，どんな時にも全力で私を応援してくれた家族と，終始心の支えであった友人に心からの謝意を表します。

本研究は日本学術振興会特別研究員奨励費（課題番号 25-5048）およびグローバル COE プログラム「アニマル・グローバル・ヘルス」により支援されました。

引用文献

- Akira, S. and Hoshino, K.** (2003). Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in toll-like receptor signaling. *J. Infect. Dis.* **187 Suppl**, S356–363.
- Allegrucci, C., Hunter, M. G., Webb, R. and Luck, M. R.** (2003). Interaction of bovine granulosa and theca cells in a novel serum-free co-culture system. *Reproduction* **126**, 527–538.
- Allen, R. C., Stjernholm, R. L. and Steele, R. H.** (1972). Evidence for the generation of an electronic excitation states in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 679–684.
- Andersen, P. H., Jarløv, N., Hesselholt, M. and Baek, L.** (1996). Studies on in vivo endotoxin plasma disappearance times in cattle. *J. Vet. Med. Ser. A* **43**, 93–101.
- Asgari, Z., Ghasemian, F., Ramezani, M. and Bahadori, M. H.** (2012). The effect of melatonin on the developmental potential and implantation rate of mouse embryos. *Cell J.* **14**, 203–208.
- Athanassakis, I., Aifantis, I., Baritakis, S., Farmakiotis, V., Koumantakis, E. and Vassiliadis, S.** (2000). Nitric oxide production by pre-implantation embryos in response to embryotoxic factors. *Cell. Physiol. Biochem.* **10**, 169–176.
- Bajcsy, A. C., Szenci, O., Weijden, G. C., Doornenbal, A., Maassen, F., Bartyik, J. and Taverne, M. A. M.** (2006). The effect of a single oxytocin or carbetocin treatment on uterine contractility in early postpartum dairy cows. *Theriogenology* **65**, 400–414.
- Banos, G., Wall, E., Coffey, M. P., Bagnall, A., Gillespie, S., Russell, G. C. and McNeilly, T. N.** (2013). Identification of immune traits correlated with dairy cow health, reproduction and productivity. *PLoS One* **8**, e65766.

- Battaglia, D. F., Beaver, a B., Harris, T. G., Tanhehco, E., Vigiúé, C. and Karsch, F. J.** (1999). Endotoxin disrupts the estradiol-induced luteinizing hormone surge: interference with estradiol signal reading, not surge release. *Endocrinology* **140**, 2471–2479.
- Battaglia, D. F., Krasa, H. B., Padmanabhan, V., Vigiúé, C. and Karsch, F. J.** (2000). Endocrine alterations that underlie endotoxin-induced disruption of the follicular phase in ewes. *Biol. Reprod.* **62**, 45–53.
- Bellavite, P.** (1988). The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **4**, 225–261.
- Beutler, B., Hoebe, K., Du, X. and Ulevitch, R. J.** (2003). How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers the first minutes following contact between host. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 479–485.
- Bilodeau-Goeseels, S.** (2012). Bovine oocyte meiotic inhibition before in vitro maturation and its value to in vitro embryo production: does it improve developmental competence? *Reprod. Domest. Anim.* **47**, 687–693.
- Bonnett, B. N., Martin, S. W., Gannon, V. P., Miller, R. B. and Etherington, W. G.** (1991). Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. *Can. J. Vet. Res.* **55**, 168–173.
- Borges, A. M., Healey, G. D. and Sheldon, I. M.** (2012). Explants of intact endometrium to model bovine innate immunity and inflammation ex vivo. *Am. J. Reprod. Immunol.* **67**, 526–539.
- Borsberry, S. and Dobson, H.** (1989). Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds. *Vet. Rec.* **124**, 217–219.
- Bosu, W. T., Perez, G. I. and Kujjo, L. L.** (1996). Natural and endotoxin-induced atresia of preantral and early antral follicles is characterized by DNA internucleosomal cleavage. *Mol. Reprod. Dev.* **44**, 352–359.
- Brevini, T. A. L., Cillo, F., Antonini, S. and Gandolfi, F.** (2007). Cytoplasmic remodelling

and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* **98**, 23–38.

Bromfield, J. J. and Sheldon, I. M. (2011). Lipopolysaccharide initiates inflammation in bovine granulosa cells via the TLR4 pathway and perturbs oocyte meiotic progression in vitro. *Endocrinology* **152**, 5029–5040.

Cai, T. Q., Weston, P. G., Lund, L. a, Brodie, B., McKenna, D. J. and Wagner, W. C. (1994). Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am. J. Vet. Res.* **55**, 934–943.

Dohmen, M. J. W., Lohuis, J. A. C. M., Huszenicza, G., Nagy, P. and Gacs, M. (1995). The relationship between bacteriological and clinical findings in cows with subacute/chronic endometritis. **43**, 1379–1388.

Dohmen, M. J., Joop, K., Sturk, A., Bols, P. E. and Lohuis, J. A. (2000). Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. *Theriogenology* **54**, 1019–1032.

Donofrio, G. and Santen, V. L. Van (2001). A bovine macrophage cell line supports bovine herpesvirus-4 persistent infection. *J. Gen. Virol.* **82**, 1181–1185.

Donofrio, G., Herath, S., Sartori, C., Cavirani, S., Flammini, C. F. and Sheldon, I. M. (2007). Bovine herpesvirus 4 is tropic for bovine endometrial cells and modulates endocrine function. *Reproduction* **134**, 183–197.

Drillich, M., Beetz, O., Pfützner, A., Sabin, M., Sabin, H. J., Kutzer, P., Nattermann, H. and Heuwieser, W. (2001). Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **84**, 2010–2017.

Dubin, N., Bornstein, D. and Gong, Y. (1995). Use of endotoxin as a positive (toxic) control in the mouse embryo assay. *J. Assist. Reprod. Genet.* **12**, 147–152.

Dumoulin, J. C., Menheere, P. P., Evers, J. L., Kleukers, A. P., Pieters, M. H., Bras, M. and Geraedts, J. P. (1991). The effects of endotoxins on gametes and

preimplantation embryos cultured in vitro. *Hum. Reprod.* **6**, 730–734.

Elliott, L., McMahon, K. J., Gier, H. T. and Marion, G. B. (1968). Uterus of the cow after parturition: bacterial content. *Am. J. Vet. Res.* **29**, 77–81.

Eppig, J., Schultz, R., O'Brien, M. and Chesnel, F. (1994). Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.* **164**, 1–9.

Eppig, J. J. (1996). Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* **8**, 485–489.

Frazer, G. S. (2005). A rational basis for therapy in the sick postpartum cow. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **21**, 523–568.

Freundenberg, M. and Galanos, C. (2000). Metabolism of LPS in vivo. In *Bacterial endotoxin lipopolysaccharide, volume II, Immunopharmacology and pathophysiology* (ed. Morrison, D. and Ryan, J.), pp. 276–292. Florida: CRC Press, Inc.

Gier, H. T. and Marion, G. B. (1968). Uterus of the cow after parturition: involutinal changes. *Am. J. Vet. Res.* **29**, 83–96.

Gilbert, R. O., Shin, S. T., Guard, C. L., Erb, H. N. and Frajblat, M. (2005). Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* **64**, 1879–1888.

Gilchrist, R. B. and Thompson, J. G. (2007). Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology* **67**, 6–15.

Grazul-Bilska, A. T., Navanukraw, C., Johnson, M. L., Vonnahme, K. A., Ford, S. P., Reynolds, L. P. and Redmer, D. A. (2007). Vascularity and expression of angiogenic factors in bovine dominant follicles of the first follicular wave. *J. Anim. Sci.* **85**, 1914–1922.

Green, M. P., Ledgard, A. M., Beaumont, S. E., Berg, M. C., McNatty, K. P., Peterson, A.

- J. and Back, P. J.** (2011). Long-term alteration of follicular steroid concentrations in relation to subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *J. Anim. Sci.* **89**, 3551–3560.
- Griffin, J. F., Hartigan, P. J. and Nunn, W. R.** (1974). Non-specific uterine infection and bovine fertility. I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks post-partum. *Theriogenology* **1**, 91–106.
- Guidry, A. J., Paape, M. J. and Pearson, R. E.** (1976). Effects of parturition and lactation on blood and milk cell concentrations, corticosteroids, and neutrophil phagocytosis in the cow. *Am. J. Vet. Res.* **37**, 1195–1200.
- Hakogi, E., Tamura, H., Tanaka, S., Kohata, A., Shimada, Y. and Tabuchi, K.** (1989). Endotoxin levels in milk and plasma of mastitis-affected cows measured with a chromogenic limulus test. *Vet. Microbiol.* **20**, 267–274.
- Hammon, D. S., Evjen, I. M., Dhiman, T. R., Goff, J. P. and Walters, J. L.** (2006). Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **113**, 21–29.
- Herath, S., Williams, E. J., Lilly, S. T., Gilbert, R. O., Dobson, H., Bryant, C. E. and Sheldon, I. M.** (2007). Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction* **134**, 683–693.
- Herath, S., Lilly, S. T., Fischer, D. P., Williams, E. J., Dobson, H., Bryant, C. E. and Sheldon, I. M.** (2009). Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F₂α to prostaglandin E₂ in bovine endometrium. *Endocrinology* **150**, 1912–20.
- Hussain, A. M.** (1989). Bovine uterine defense mechanism: A review. *J. Vet. Med. Ser. B* **36**, 641–651.
- Ireland, J. J. and Roche, J. F.** (1983). Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology* **112**, 150–156.

- Ishizuka, B., Kuribayashi, Y., Murai, K., Amemiya, A. and Itoh, M. T.** (2000). The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice. *J. Pineal Res.* **28**, 48–51.
- Johnson, A. L. and Bridgham, J. T.** (2002). Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reproduction* **124**, 19–27.
- Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S. and Johnson, W. H.** (2004). Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* **62**, 9–23.
- Kehrli, M. E. and Goff, J. P.** (1989). Periparturient hypocalcemia in cows: effects on peripheral blood neutrophil and lymphocyte function. *J. Dairy Sci.* **72**, 1188–1196.
- Kim, I.-H., Na, K.-J. and Yang, M.-P.** (2005). Immune responses during the peripartum period in dairy cows with postpartum endometritis. *J. Reprod. Dev.* **51**, 757–764.
- Kimura, K., Goff, J. P., Kehrli, M. E. and Harp, J. A.** (1999). Phenotype analysis of peripheral blood mononuclear cells in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* **82**, 315–319.
- Krumrych, W., Skórzewski, R. and Malinowski, E.** (2013). The effect of storage on whole blood chemiluminescence measurement of equine neutrophils. *Luminescence* **28**, 327–331.
- LeBlanc, S. J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Bateman, K. G., Keefe, G. P., Walton, J. S. and Johnson, W. H.** (2002). Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **85**, 2223–2236.
- Lee, K., Wang, C., Chaille, J. M. and Machaty, Z.** (2010). Effect of resveratrol on the development of porcine embryos produced in vitro. *J. Reprod. Dev.* **56**, 330–335.
- Leino, L. and Paape, M. J.** (1993). Comparison of the chemiluminescence responses of bovine neutrophils to differently opsonized zymosan particles. *Am. J. Vet. Res.* **54**,

1055–1059.

Leung, S. T., Derecka, K., Mann, G. E., Flint, a P. and Wathes, D. C. (2000). Uterine lymphocyte distribution and interleukin expression during early pregnancy in cows. *J. Reprod. Fertil.* **119**, 25–33.

Lojek, A., Ciz, M., Marnila, P., Duskova, M. and Lilius, E. M. (1997). Measurement of whole blood phagocyte chemiluminescence in the Wistar rat. *J. Biolumin. Chemilumin.* **12**, 225–231.

López-Helguera, I., López-Gatius, F. and Garcia-Ispuerto, I. (2012). The influence of genital tract status in postpartum period on the subsequent reproductive performance in high producing dairy cows. *Theriogenology* **77**, 1334–1342.

Lussier, J. G., Matton, P. and Dufour, J. J. (1987). Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod. Fertil.* **81**, 301–307.

Madison, V., Greve, T., Avery, B. and Wamberg, T. (1991). The effect of endotoxin-contaminated medium on in vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* **31**, 159–165.

Magata, F., Horiuchi, M., Miyamoto, A. and Shimizu, T. (2014). Lipopolysaccharide (LPS) inhibits steroid production in theca cells of bovine follicles in vitro: Distinct effect of LPS on theca cell function in pre- and post-selection follicles. *J. Reprod. Dev.* **60**, 280–287.

Magoffin, D. A. (2005). Ovarian theca cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 1344–1349.

Mateus, L., Lopes da Costa, L., Carvalho, H., Serra, P. and Robalo Silva, J. (2002). Blood and intrauterine leukocyte profile and function in dairy cows that spontaneously recovered from postpartum endometritis. *Reprod. Domest. Anim.* **37**, 176–180.

Mateus, L., Lopes da Costa, L., Diniz, P. and Ziecik, A. J. (2003). Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE₂ and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis. *Anim. Reprod. Sci.* **76**, 143–154.

- Mathison, J. C. and Ulevitch, R. J.** (1979). The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. *J. Immunol.* **123**, 2133–2143.
- Maxie, M. G., Valli, V. E., Robinson, G. A., Truscott, R. B. and Mcsherry, B. J.** (1974). Studies with radioactive endotoxin 1. Clearance of ⁵¹Cr-labelled endotoxin from the blood of calves. *Can J Comp Med* **38**, 347–366.
- McDougall, S., Macaulay, R. and Compton, C.** (2007). Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **99**, 9–23.
- Mehrzaad, J., Dosogne, H., Meyer, E. and Burvenich, C.** (2001). Local and systemic effects of endotoxin mastitis on the chemiluminescence of milk and blood neutrophils in dairy cows. *Vet. Res.* **32**, 131–144.
- Miyamoto, A., Okuda, K., Schweigert, F. J. and Schams, D.** (1992). Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. *J. Endocrinol.* **135**, 103–114.
- Miyamoto, T., Okano, S. and Kasai, N.** (2009). Inactivation of Escherichia coli endotoxin by soft hydrothermal processing. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 5058–5063.
- Miyoshi, M., Sawamukai, Y. and Iwanaga, T.** (2002). Reduced phagocytotic activity of macrophages in the bovine retained placenta. *Reprod. Domest. Anim.* **37**, 53–56.
- Moraitis, S., Taitzoglou, I., Tsantarliotou, M., Boscov, C., Kaldrimidou, E. and Saratsis, P.** (2004). Involvement of the plasminogen activation system in cow endometritis. *Theriogenology* **61**, 337–349.
- Mori, K., Matsumoto, K. and Cans, H.** (1973). On the in vivo clearance and detoxification of endotoxin by lung and liver. *Ann. Surg.* **177**, 159–163.
- Motoi, Y., Oohashi, T., Hirose, H., Hiramatsu, M., Miyazaki, S., Nagasawa, S. and Takahashi, J.** (1993). 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.

Murasawa, M., Takahashi, T., Nishimoto, H., Yamamoto, S., Hamano, S. and Tetsuka, M. (2005). Relationship between ovarian weight and follicular population in heifers. *J. Reprod. Dev.* **51**, 689–693.

Nakamura, Y., Tamura, H., Takiguchi, S., Kashida, S., Yamagata, Y., Sugino, N. and Kato, H. (1999). Changes in interleukin-1beta mRNA expression in the rat ovary during the estrous cycle in response to lipopolysaccharide. *Endocr. J.* **46**, 293–300.

Oliveira, L. J. and Hansen, P. J. (2008). Deviations in populations of peripheral blood mononuclear cells and endometrial macrophages in the cow during pregnancy. *Reproduction* **136**, 481–490.

Olson, J. D., Ball, L., Mortimer, R. G., Farin, P. W., Adney, W. S. and Huffman, E. M. (1984). Aspects of bacteriology and endocrinology of cows with pyometra and retained fetal membranes. *Am. J. Vet. Res.* **45**, 2251–2255.

Opsomer, G., Groehn, Y. T., Hertl, J., Coryn, M., Deluyker, H. and Kruif, A. (2000). Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: A field study. *Theriogenology* **53**, 841–857.

Papp, Z. and Smits, J. E. G. (2007). Validation and novel applications of the whole-blood chemiluminescence assay of innate immune function in wild vertebrates and domestic chickens. *J. Wildl. Dis.* **43**, 623–634.

Petsch, D., Deckwer, W. D. and Anspach, F. B. (1998). Proteinase K digestion of proteins improves detection of bacterial endotoxins by the Limulus amoebocyte lysate assay: application for endotoxin removal from cationic proteins. *Anal. Biochem.* **259**, 42–47.

Potter, T. J., Guitian, J., Fishwick, J., Gordon, P. J. and Sheldon, I. M. (2010). Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology* **74**, 127–134.

- Preisler, M. T., Weber, P. S., Tempelman, R. J., Erskine, R. J., Hunt, H. and Burton, J. L.** (2000). Glucocorticoid receptor down-regulation in neutrophils of periparturient cows. *Am. J. Vet. Res.* **61**, 14–19.
- Revelo, X. S. and Waldron, M. R.** (2010). Effects of in vitro insulin and 2,4-thiazolidinedione on the function of neutrophils harvested from blood of cows in different physiological states. *J. Dairy Sci.* **93**, 3990–4005.
- Revelo, X. S. and Waldron, M. R.** (2012). In vitro effects of Escherichia coli lipopolysaccharide on the function and gene expression of neutrophils isolated from the blood of dairy cows. *J. Dairy Sci.* **95**, 2422–2441.
- Reynier, P., May-Panloup, P., Chrétien, M. F., Morgan, C. J., Jean, M., Savagner, F., Barrière, P. and Malthièry, Y.** (2001). Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* **7**, 425–429.
- Santos, N. R., Lamb, G. C., Brown, D. R. and Gilbert, R. O.** (2009). Postpartum endometrial cytology in beef cows. *Theriogenology* **71**, 739–745.
- Schumann, R. R., Leong, S. R., Flagg, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., Tobias, P. S. and Ulevitch, R. J.** (1990). Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* **249**, 1429–1431.
- Senosy, W., Uchiza, M., Tameoka, N., Izaike, Y. and Osawa, T.** (2012). Evaluation of Reproductive Tract Infection During Early Post-Partum Period and Its Relationship with Subsequent Reproductive Performance in High Milk Producing Dairy Cows. *Reprod. Domest. Anim.* **47**, 203–207.
- Shawcross, D. L., Shabbir, S. S., Taylor, N. J. and Hughes, R. D.** (2010). Ammonia and the neutrophil in the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* **51**, 1062–1069.
- Sheldon, I. M., Noakes, D. E., Rycroft, A. N., Pfeiffer, D. U. and Dobson, H.** (2002). Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction* **123**, 837–845.

- Sheldon, I. M., Rycroft, A. N. and Zhou, C.** (2004). Association between postpartum pyrexia and uterine bacterial infection in dairy cattle. *Vet. Rec.* **154**, 289–293.
- Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S. and Gilbert, R. O.** (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* **65**, 1516–1530.
- Sheldon, I. M., Price, S. B., Cronin, J., Gilbert, R. O. and Gadsby, J. E.** (2009a). Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reprod. Domest. Anim.* **44**, 1–9.
- Sheldon, I. M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G. and Schuberth, H.-J.** (2009b). Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol. Reprod.* **81**, 1025–1032.
- Shimada, M., Hernandez-Gonzalez, I., Gonzalez-Robanya, I. and Richards, J.** (2006). Induced expression of pattern recognition receptors in cumulus oocyte complexes: novel evidence for innate immune-like functions during ovulation. *Mol. Endocrinol.* **20**, 3228–3239.
- Shimada, M., Yanai, Y. and Okazaki, T.** (2008). Hyaluronan fragments generated by sperm-secreted hyaluronidase stimulate cytokine/chemokine production via the TLR2 and TLR4 pathway in cumulus cells of. *Development* **135**, 2001–2011.
- Shimizu, T., Miyauchi, K., Shirasuna, K., Bollwein, H., Magata, F., Murayama, C. and Miyamoto, A.** (2012). Effects of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) on estradiol production in bovine granulosa cells from small and large follicles. *Toxicol. Vitr.* **26**, 1134–1142.
- Silva, J. M. and Price, C. A.** (2000). Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro. *Biol. Reprod.* **62**, 186–191.
- Silva, E., Gaivão, M., Leitão, S., Jost, B. H., Carneiro, C., Vilela, C. L., Lopes da Costa, L. and Mateus, L.** (2008). Genomic characterization of *Arcanobacterium pyogenes* isolates recovered from the uterus of dairy cows with normal puerperium or clinical

metritis. *Vet. Microbiol.* **132**, 111–118.

Singh, J., Murray, R. D., Mshelia, G. and Woldehiwet, Z. (2008). The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. *Vet. J.* **175**, 301–309.

Soto, P., Natzke, R. and Hansen, P. (2003). Identification of Possible Mediators of Embryonic Mortality Caused by Mastitis: Actions of Lipopolysaccharide, Prostaglandin F_{2a}, and the Nitric Oxide Generator, Sodium Nitroprusside Dihydrate, on Oocyte Maturation and Embryonic Development in Cattle. *Am. J. Reprod. Immunol.* **50**, 263–272.

Stojkovic, M., Machado, S., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Goncalves, P. and Eckhard, W. (2001). triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization. *Biol. Reprod.* **64**, 904–909.

Sugino, N. (2005). Reactive oxygen species in ovarian physiology. *Reprod. Med. Biol.* **4**, 31–44.

Sugino, N., Takiguchi, S., Ono, M., Tamura, H., Shimamura, K., Nakamura, Y., Tsuruta, R., Ueda, T., Maekawa, T. and Kato, H. (1996). Nitric oxide concentrations in the follicular fluid and apoptosis of granulosa cells in human follicles. *Hum. Reprod.* **11**, 2484–2487.

Suzuki, C., Yoshioka, K., Iwamura, S. and Hirose, H. (2001). Endotoxin induces delayed ovulation following endocrine aberration during the proestrous phase in Holstein heifers. *Domest. Anim. Endocrinol.* **20**, 267–278.

Takeuchi, O. and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805–820.

Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Taketani, T., Matsuoka, A., Yamagata, Y., Shimamura, K., et al. (2008). Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J. Pineal Res.* **44**, 280–287.

- Taverne, M. A. M.** (1992). Physiology of parturition. *Anim. Reprod. Sci.* **28**, 433–440.
- Thatcher, W. W., Moreira, F., Pancarci, S. M., Bartolome, J. A. and Santos, J. E. P.** (2002). Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domest. Anim. Endocrinol.* **23**, 243–254.
- Thomas, R. E., Armstrong, D. T. and Gilchrist, R. B.** (2004). Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. *Biol. Reprod.* **70**, 548–556.
- Thouas, G. A., Trounson, A. O., Wolvetang, E. J. and Jones, G. M.** (2004). Mitochondrial dysfunction in mouse oocytes results in preimplantation embryo arrest in vitro. *Biol. Reprod.* **71**, 1936–1942.
- Tilly, J. L., Kowalski, K. I., Johnson, A. L. and Hsueh, A. J.** (1991). Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* **129**, 2799–2801.
- Van Blerkom, J., Davis, P. W. and Lee, J.** (1995). Fertilization and early embryology: ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum. Reprod.* **10**, 415–424.
- Wakai, T.** (2012). Mitochondrial localization in mouse oocytes. *J. Mamm. Ova Res.* **29**, 155–160.
- Williams, E. J., Fischer, D. P., Pfeiffer, D. U., England, G. C. W., Noakes, D. E., Dobson, H. and Sheldon, I. M.** (2005). Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* **63**, 102–117.
- Williams, E. J., Fischer, D. P., Noakes, D. E., England, G. C. W., Rycroft, A., Dobson, H. and Sheldon, I. M.** (2007). The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* **68**, 549–559.

- Yang, Z., Breider, M., Carroll, R., Miller, M. and Bochsler, P.** (1996). Soluble CD14 and lipopolysaccharide-binding protein from bovine serum enable bacterial lipopolysaccharide-mediated cytotoxicity and activation of bovine vascular. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 241–247.
- Yang, R., Mark, M., Gray, A., Huang, A., Xie, M., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W., Gurney, A. and Godowski, P.** (1998). Toll-likereceptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* **395**, 284–288.
- Zerbe, H., Schuberth, H.-J., Engelke, F., Frank, J., Klug, E. and Leibold, W.** (2003). Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. *Theriogenology* **60**, 209–223.
- Zweigner, J., Gramm, H. J., Singer, O. C., Wegscheider, K. and Schumann, R. R.** (2001). 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.
- 秋山香織, 大田安彦, 徳永賢治 (2012). 化学発光法による全血を用いた好中球活性酸素産生能の検討. 生物試料分析 **35**, 140-145.
- 中尾敏彦 (2005). 第2章 高産乳牛の生理的変化に対応した繁殖管理の実際. あなたは高産乳牛についていけるか? デーリィジャパン社. pp. 29-48.

Summary

In postpartum dairy cows, uterine inflammation such as metritis and endometritis damages reproductive performance by disturbing uterine and ovarian function. Although the infertility or subfertility associated with uterine inflammation has a great impact on the dairy industry, the mechanism of uterine inflammation affecting reproductive performance, especially ovarian function, is not clear. In addition to the follicular steroidogenesis, cells of immune system also play important roles in regulating ovarian functions. However, there has been little information on the involvement of immune systems, as well as follicular activity, in ovarian dysfunction associated with postpartum uterine inflammation. *Escherichia coli* (*E. coli*) is among the main types of bacteria causing uterine inflammation, and the tissue pathology is largely associated with the bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS). LPS has been shown to provoke an inflammatory response by ovarian follicular cells, suggesting that uterine inflammation-derived LPS affect follicular functions. Therefore, the objective of the present study was to determine (1) the changes in immune responses associated with peripheral blood LPS or uterine inflammation during peripartum period, and (2) the effect of LPS on follicular function including the follicular steroidogenesis and the developmental competence of oocytes. The major goal of this study was to reveal the mechanism of the negative impact of uterine inflammation on ovarian function in postpartum dairy cows.

(1) The changes in immune responses during peripartum period

To investigate the relationship between LPS and uterine inflammation, the changes in

the plasma LPS concentrations were examined in peripartum dairy cows. The cows with metritis had higher plasma LPS concentrations compared to those in healthy cows until 6 week postpartum. This data indicates that LPS produced by the bacteria in the uterus translocates into the bloodstream and affects various organs by provoking systemic immune responses. Then, to determine the changes in the immune response associated with uterine inflammation, the counts and the functions of peripheral leukocytes were examined from 2 weeks prepartum through 8 weeks postpartum. In cows with metritis, the counts of neutrophils were lower compared to those of healthy cows at 0 and 1 week postpartum. In contrast, lymphocyte counts and the proportion of CD8+ lymphocytes were high in cows with metritis until 8 weeks postpartum. The whole blood chemiluminescence, which reflects the generation of reactive oxygen species (ROS) by neutrophils, was higher in cows with metritis compared to that in healthy cows. Moreover, LPS exposure *in vitro* increased the ROS generation by neutrophils collected from healthy cows, and the early (0 to 3 week) postpartum cows were highly susceptible to LPS exposure compared to other peripartum periods. The changes in the peripheral lymphocyte counts and the ROS generation by neutrophils were observed weeks after the resolution of uterine inflammation.

(2) The effect of LPS on follicular function

The concentrations of the LPS in the blood, ovarian follicular fluid and uterine fluid were investigated in a clinical case of bovine metritis. One of seven large follicles showed an extremely high level of LPS compared to the LPS concentration of the blood and uterine fluid. Then, bovine ovaries and uteri were collected from a slaughterhouse, and the relationship among uterine inflammation, LPS in ovarian follicular fluid, and

steroid production of the follicles was investigated. The appearance or the histopathological severity of uterine inflammation did not affect the concentration of LPS in follicular fluid or follicular steroidogenesis. In follicles with a high level of LPS, the concentration of estradiol was lower compared to follicles with a low level of LPS, and mRNA level of P450 aromatase, which synthesizes estradiol, was down-regulated in granulosa cells. Moreover, mRNA level of caspase-3 associated with follicular atresia was higher in theca and granulosa cells of follicles with a high level of LPS.

To determine the effect of LPS on follicle-enclosed oocyte, bovine oocytes obtained from a slaughterhouse were matured *in vitro*, and oocytes were exposed to LPS during oocyte maturation. LPS perturbed nuclear maturation of bovine oocytes by inhibiting the meiotic progression. LPS inhibited the mitochondrial diffusion in cytoplasm and decreased mitochondrial membrane potential, indicating that LPS perturbed cytoplasmic maturation of oocytes. Moreover, oocytes matured under the presence of LPS showed the decrease in the cleavage and the development to the blastocyst. These findings indicate that LPS exposure during oocyte maturation reduces the developmental competence of oocytes.

Taken together, the findings of the present study highlight possible mechanisms whereby uterine inflammation damages ovarian functions: (1) the long-term alteration of immune response including the increased lymphocyte count and the enhanced ROS generation of neutrophils, and (2) the impaired activity of theca and granulosa cells and the reduced developmental competence of oocytes caused by LPS accumulated in the follicular fluid. The accumulation of LPS in follicular fluid might cause the long-term effect on follicles and oocyte even after the recovery of uterine inflammation.

