

雌牛の生殖道における感染と炎症

大澤健司

宮崎大学 農学部 獣医学科 産業動物臨床繁殖学研究室
〒 889-2192 宮崎市学園木花台西 1-1
電話 & FAX : 0985-58-7787
E-mail: osawa@cc.miyazaki-u.ac.jp

【要約】

健康な雌牛の生殖道は胎子娩出直後の細菌汚染と生理的炎症といった状態から、主として先天性免疫により分娩後5週間後までに自然治癒し、次の受胎に向けての修復を完了する。しかしながら、細菌感染が免疫反応を凌駕して持続し続けると正常な産褥とは言えない状態になる。なかでも、子宮内膜炎は潜在性、臨床性ともに全身症状を伴わないことから早期発見が難しい。また、陰門部や膣内で観察される膿性粘液の由来は子宮とは限らず、子宮頸管や膣に局限していることもある。その鑑別にはサイトブラシが有用である。サイトブラシは頸管炎等との鑑別や炎症度の客観的評価に用いるだけでなく、生殖道における遺伝子発現検査の採材ツールとしても有用である。健康牛では子宮内膜 PMN% は分娩後の修復過程において漸減するのに対し、IL1 β 、IL6、IL8、TNF α といった炎症性サイトカインの発現が分娩後 17 日前後でピークを示す。子宮内膜炎罹患個体ではこれらのサイトカインの発現レベルが非罹患個体よりも高いことが観察されている。さらに、分娩後の早過ぎる黄体形成により IL1 β 発現量の亢進、すなわち子宮環境の悪化を招くことが示唆されている。今後、雌牛の生殖道における感染と炎症がその後の受胎性や繁殖成績に及ぼす影響を最小限にするためのストラテジーを開発するために宿主、病原体、免疫という三者の相互関係に対する理解をさらに深めていくことが肝要である。

キーワード: 経産牛、感染、炎症、生殖道、子宮

【はじめに】

雌の生殖道 (reproductive tract) とは、陰門、膣前庭、膣、子宮頸、子宮、卵管を含む管を指す (図 1)。分娩後の経産牛において次の受胎を阻む要因の一つとして子宮内感染による炎症があげられる。すなわち、産褥性子宮炎や子宮内膜炎として診断治療されている現状があるが、膣炎や子宮頸管炎、卵管炎の存在も考慮する必要がある。本稿では、雌牛の生殖道における感染と炎症に関する最近の知見を紹介する。

【分娩後における生殖道修復の生理と病理】

ホルスタイン種経産牛の正常な子宮修復では分娩後3週目では左右子宮角 (前妊娠期における妊角と非妊角) の外径の差が直腸検査でも明確に分かるが、5週目までにその違いが消失する。逆に言うと、分娩後5週目において左右子宮角の大きさに差を認める場合には子宮修復が遅れていることになる。また、子宮頸管は分娩時に新生子の全身が通過するだけの太さを呈することから、分娩直後は細菌が陰門から容易に上行して子宮内を汚染することになる。分娩後33日までに95%以上の個体は直径7.5cm以下になり、60%以上の個体は直径5cm未満にな

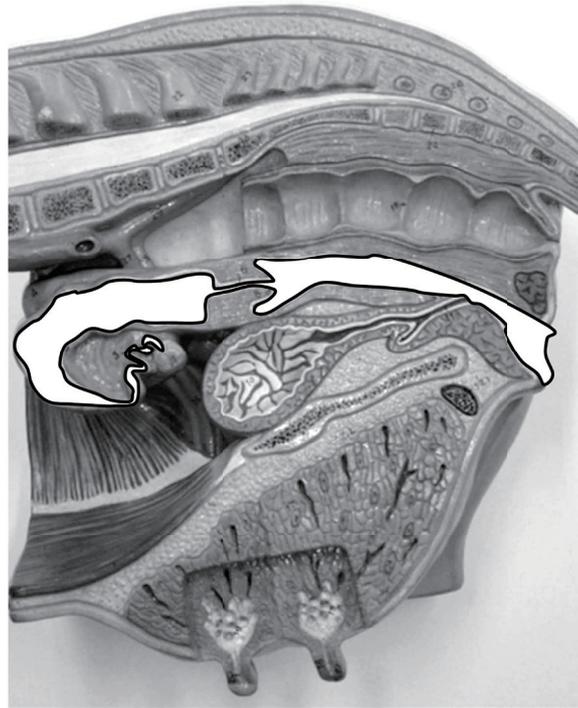


図1 雌牛の生殖道（白抜き部分）*正常な子宮内腔は閉じているが、本模型では腔を有する状態を示す。

る [9]。分娩後3週までの経産牛の子宮内には細菌が存在しているのが普通であり、子宮内からの細菌の排除や子宮内膜における炎症反応は分娩後早期における子宮修復にとって生理的な現象である。

しかしながら時として細菌感染が免疫反応を凌駕して持続し続けると正常な産褥とは言えない状態になる。一般的にウシ子宮内膜炎は分娩後3～4週以降に診断され、乳牛の5～25%が分娩後4～5週において腔内から膿汁あるいは膿性粘液を排出し（臨床性子宮内膜炎）、30%以上が分娩後4～8週において臨床症状を伴わない潜在性子宮内膜炎（子宮頸管炎を併発あるいは子宮内膜炎のみ）に罹患しているとされている [10]。

【生殖道における炎症－腔炎、子宮頸管炎、子宮内膜炎－の鑑別】

子宮内膜炎は潜在性、臨床性ともに全身症状を伴わないことから早期発見が難しい。臨床性子宮内膜炎は外子宮口から腔内への異常滲出物の排出を伴う場合であり、滲出性子宮内膜炎ともいう。但し、腔内に膿性排出物が存在しているという所見だけで子宮内膜炎であるとは限

らず、子宮頸管に局限した炎症の場合でも腔内に膿性排出物を認める個体が少なからず存在する [3, 12]。従来、腔内や外陰部・尾に付着した膿汁や膿を含む粘液は子宮内膜炎の一所見と考えられていた。しかしながら、膿が観察されたからと言って、子宮内の検査を実施しない限り、子宮内膜炎であるとは断定できない。陰門部で観察される膿性粘液の由来は子宮以外にも子宮頸管、腔、腔前庭などが考えられる。子宮頸管炎が子宮内膜炎と独立して繁殖成績の低下に関与していることが知られている [1, 2, 15]。私たちの研究では、子宮頸管炎に局限した症例の場合でも腔内に膿性排出物を認める個体が少なからず存在し、分娩後5週における細胞診による頸管炎および子宮内膜炎の発症率はそれぞれ14%および18%であり、頸管炎発症個体のうち、同一個体で子宮内膜に炎症を認めなかった個体は43%であった [12]。今後は外陰部からの膿汁の排出という所見だけで子宮内膜炎であるという認識を見直す必要がある。

【子宮内膜における炎症性サイトカインの役割】

牛の子宮内膜炎の診断方法の一つとしてサイトブラシがあげられる [11]。サイトブラシは腔、

子宮頸管、子宮体、子宮角といった生殖道の異なる部位から採材できること、各部位の炎症度を客観的に評価できることがメリットである。また、炎症度の評価には粘膜層における多形核好中球 (PMN) の浸潤度 (PMN%) を用いるが、サイトブラシは PMN% を算出するためだけではなく、採取した材料における遺伝子発現を調べるためにも使うことが可能である。

正常分娩後の生理的な機構として、炎症性反応が起こることが知られている。Gabler ら (2010) は正常分娩したホルスタイン種初産牛 5 頭を用い、分娩後 10 日から 45 日まで週 1 回サイトブラシにて子宮内膜サンプルを採取し、PMN% を記録すると共に CXCL5、IL1 β 、IL6、IL8、TNF α 、PTGS2 およびハプトグロビンの mRNA 発現量を解析したところ、PMN% は分娩後 10 日から 38 日にかけて漸減したのに対し、これらのケモカイン、サイトカインの mRNA 発現量は分娩後 17 日に一過性のピークを示した [5]。

では、潜在性子宮内膜炎罹患牛におけるサイトカイン発現はどうなっているだろうか。臨床症状を示さない個体をサイトブラシにより潜在性子宮内膜炎罹患個体と非罹患個体に分け、サイトブラシにより採取された材料 (一サンプルあたりの平均 RNA 量 = 0.96 μ g) から IL6、IL8、TNF α の mRNA 発現を解析したところ、潜在性子宮内膜炎罹患個体では非罹患個体と比較して IL8 の発現レベルは 50 倍以上、IL6 の発現レベルは 30 倍以上、TNF α の発現レベルは 20 倍以上であった [7]。また、PMN% と mRNA 発現レベルとの間にも相関が認められた (図 2)。以上の結果から、IL8 は子宮内膜における炎症を予測するために有用であることが示唆されている。また、別の研究グループでは、子宮内膜炎罹患牛において IL1 α 、IL1 β 、IL6、TNF α の発現が高かったと報告している [8]。

また、Foley ら (2015) は次世代シーケンサーを用いて、健康牛 9 頭 (HC 群) とその後子宮内膜炎に罹患した牛 6 頭 (CE 群) の分娩後 7 日と 21 日に採取した子宮内膜バイオプシーサンプルより炎症関連遺伝子の発現を調べたところ、分娩後 7 日目の時点で既に両群間に 73 個の遺伝子と 31 個の miRNA が有意に異なって発現していた [4]。これらの結果は、分

娩後 17 日前後において子宮における粘膜免疫反応が亢進していることを示唆すると同時に、子宮内膜における炎症度を評価するツールとして、PMN% と共にこれらのケモカイン、サイトカイン発現量のモニターが有用であることを示している。さらに、分娩後 7 日から 21 日にかけて HC 群では 4197 個の遺伝子が有意に異なって発現し、炎症性反応から組織増殖と修復への移行を示したのに対し、CE 群で有意に異なって発現した遺伝子数は 31 個だけと、この移行がスムーズに行われていないことが示された。特に、健康牛では分娩後早期に活性化した IL1 や IL17 の炎症性カスケードが分娩後 21 日までに消散されて恒常性を維持するのに対し、その後に子宮内膜炎を罹患する個体においてはそれが正常に行われていないことが示唆されている。

【生殖道における炎症と分娩後の 初回排卵時期との関係】

分娩後の卵巣機能の回復との関連を調べたところ、正常分娩して临床上異常所見を認めず、分娩後 4 週までに初回排卵が認められなかった個体は、分娩後 4 週までに初回排卵が認められた個体と比較して分娩後 5 週および 6 週における PMN% が有意に高く、分娩後 7 週までに初回排卵を認めなかった群の PMN% は分娩後 7 週までに初回排卵した群と比較して有意 ($P < 0.05$) に高かった [14]。

逆に、分娩後の排卵を抑制することで子宮内膜にどのような変化が起きるのだろうか? Heppelmann ら [8] は分娩後の子宮疾患 (胎盤停滞あるいは子宮炎) の有無 (UD+ あるいは UD-) で群分けし、さらに分娩後 42 日まで排卵しないように卵胞吸引した群 (FP+) と無処置の群 (FP-)、すなわち計 4 群 (UD-FP-, UD-FP+, UD+FP-, UD+FP+) に分けて分娩後の発情期 (分娩後約 40 ~ 49 日) に子宮内膜由来の細菌検索、子宮内膜細胞診とバイオプシーを実施したところ、卵胞吸引の有無と細菌分離成績に関連は認められなかったものの、UD-FP- 群と UD+FP- 群における IL1 β の発現量が UD-FP+ 群と UD+FP+ 群と比較してより高いという成績を得た。この結果が、卵胞吸引で分娩後早期における排卵を抑制することで子宮内

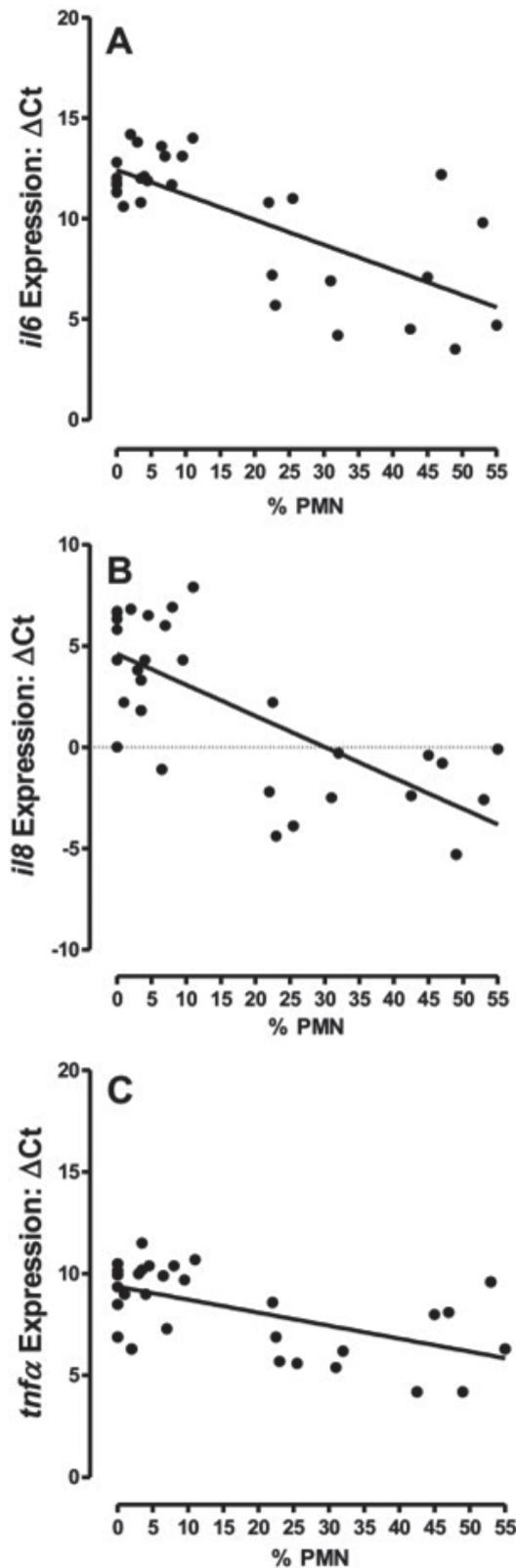


図2. ウシ子宮内膜における多形核白血球% (PMN%) とIL6 (A)、IL8 (B)、およびTNF α (C) 遺伝子発現との関連についての線形回帰分析。遺伝子発現量はハウスキーピング遺伝子である β アクチンとの比較で測定し、Ct値の差 (β アクチンのCt値 - サイトカインのCt値 = Δ Ct) として示した。 Δ Ctが低いほどサイトカイン転写産物量、すなわち遺伝子発現量が増加していることを表す。PMN%とIL6 ($r^2 = 0.524$, $P < 0.0001$)、IL8 ($r^2 = 0.518$, $P < 0.0001$)、TNF α ($r^2 = 0.335$, $P < 0.0008$) との間に有意な関連が認められた。(Ghasemi et al., 2012)

における炎症の清浄化を促進することを示したものである。逆に言えば、分娩後の早過ぎる黄体形成は子宮環境を悪化させ得ることを示唆するものである。

【子宮内感染】

子宮内膜において病原性を示す代表的な細菌種として *Trueperella pyogenes*、*E. coli*、*Fusobacterium necrophorum*、*Prevotella melaninogenicus* などが知られている [16] が、私達が *T. pyogenes* 感染との関連を調べたところ、乳牛において分娩後5週および7週の両時点ともに子宮内に *T. pyogenes* 感染が認められた個体においては、両時点とも *T. pyogenes* 感染が認められなかった個体と比較して潜在性子宮内膜炎の罹患率が有意に高かった (表1) [6]。

【生殖道における感染と炎症を予防するには】

分娩後早期に発生する子宮内膜炎を予防するには分娩前、すなわち妊娠期からの対策が必要である。その一つとして最近、油糧種子をサプリメントとして投与した試験成績がある。Salehi ら (2016) は、分娩前の5週間にヒマワリ油 (高リノール酸) 給与群、菜種油 (高オレイン酸) 給与群、無給与群の3群に分けて分娩後25日前後での子宮内膜環境と35日までの卵巣動態への影響を調べたところ、ヒマワリ油給与群では子宮内膜環境に悪影響を与えることな

く初回排卵日がより早く、分娩後35日までに排卵する個体の割合も多かった [13]。また、サイトカインの発現状況は3群間で差がなかったものの、潜在性子宮内膜炎罹患牛では $IL1\beta$ 、 $CXCL8$ 、 $IL10$ 、 $TNF\alpha$ の発現が正常牛よりも高かった。今後、子宮内膜炎発症のリスクファクターの除去や分娩期の衛生や乾乳牛管理の徹底と合わせ、炎症反応をコントロールするサプリメントのより効果的な給与方法などについても追求する必要があるだろう。

【まとめ】

今後、雌牛の生殖道における感染と炎症がその後の受胎性や繁殖成績に及ぼす影響を最小限にするための戦略を開発するために宿主、病原体、免疫という三者の相互作用に対する理解をさらに深めていくことが肝要である。

【参考文献】

1. Ahmadi, M. R., Nazifi, S. and Ghaisari, H. R. 2006. Comparative cervical cytology and conception rate in postpartum dairy cows. *Vet. Arch.*, 76: 323-332.
2. Deguillaume, L. 2010. L'inflammation génitale postpartum de la vache. PhD Thesis, Agro Paris Tech École Nationale Vétérinaire d'Alfort.
3. Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S. and LeBlanc, S. J. 2010. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93: 5225-5233.

表1 乳牛における分娩後5週および7週の子宮内細菌感染の有無と子宮内膜PMN%との関係 (Ghanem *et al.*, 2015)

群	分娩後5週でのPMN		計	細胞診による 内膜炎 (%)
	< 6%	≥ 6%		
分娩後5週、7週ともに細菌感染無し	29	3	32	9.4*
分娩後5週、7週ともに細菌感染有り ^a	1	9	10	90*
合計	30	12	42	

a: *Trueperella pyogenes* 感染

*: $P < 0.001$

4. Foley, C., Chapwanya, A., Callanan, J. J., Whiston, R., Miranda-CasoLuengo, R., Lu, J., Meijer, W. G., Lynn, D. J., O'Farrelly, C. and Meade, K. G. 2015. Integrated analysis of the local and systemic changes preceding the development of post-partum cytological endometritis. *BMC Genomics*. 16: 811. doi: 10.1186/s12864-015-1967-5.
5. Gabler, C., Fischer, C., Drillich, M., Einspanier, R. and Heuwieser, W. 2010. Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8: 152. doi: 10.1186/1477-7827-8-152.
6. Ghanem, E. M., Tezuka, E., Devkota, B., Izaïke, Y. and Osawa, T. 2015. Persistence of uterine bacterial infection, and its associations with endometritis and ovarian function in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Dev.* 61: 54-60.
7. Ghasemi, F., Gonzalez-Cano, P., Griebel, P. J. and Palmer, C. 2012. Proinflammatory cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with and without subclinical endometritis. *Theriogenology* 78: 1538-1547.
8. Heppelmann, M., Brömmeling, A., Ulbrich, S. E., Weinert, M., Piechotta, M., Wrenzycki, C., Merbach, S., Schoon, H. A., Hoedemaker, M. and Bollwein, H. 2015. Effect of suppression of postpartum ovulation on endometrial inflammation in dairy cows. *Theriogenology* 84: 155-162.
9. 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.
10. LeBlanc, S. J. 2014. Reproductive tract inflammatory disease in postpartum dairy cows. *Animal*. 8: 54-63.
11. 大澤健司. 2011. 牛の子宮内膜炎 — その実態とコントロール —. *日本家畜臨床感染症研究会誌*. 6: 115-122.
12. Osawa, T., Neves, R. C. and LeBlanc, S. J. 2011. Inflammation and infection of the reproductive tract in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 94, E-Suppl 1: 746.
13. Salehi, R., Colazo, M. G., Gobikrushanth, M., Basu, U. and Ambrose, D. J. Effects of prepartum oilseed supplements on subclinical endometritis, pro- and anti-inflammatory cytokine transcripts in endometrial cells and postpartum ovarian function in dairy cows. 2016 *Reprod. Fertil. Dev.* doi: 10.1071/RD15334.
14. Senosy, W. S., Uchiza, M., Tameoka, N., Izaïke, Y. and Osawa, T. 2009. Association between evaluation of the reproductive tract by various diagnostic tests and restoration of ovarian cyclicity in high-producing dairy cows. *Theriogenology* 72: 1153-1162.
15. 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.
16. Williams, E. J., Fischer, D. P., Pfeiffer, D. U., England, G. C., 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.

Infection and inflammation in the bovine female reproductive tract

Takeshi Osawa

Laboratory of Theriogenology, Department of Veterinary Sciences,
Faculty of Agriculture, University of Miyazaki
Gakuen-kibanadai Nishi 1-1, Miyazaki, 889-2192
Tel & Fax: +81 985 58 7787
E-mail: osawa@cc.miyazaki-u.ac.jp

[Abstract]

The reproductive tract of healthy cows has a process of involution from a status of bacterial contamination and physiological inflammation just after delivery to a pre-pregnancy status by around 5 weeks postpartum through innate immunity and spontaneous cure. However, once bacterial infection overwhelms immune defenses that the host possesses, the puerperium becomes pathological. It is difficult to detect endometritis in its early stages due to lack of general symptoms. Purulent vaginal discharge does not necessarily originate from the uterus but may come from the cervix or vagina. Cytobrush is a useful tool not only for making differential diagnosis among endometritis, cervicitis and vaginitis and objective evaluation of the degree of inflammation, but also for taking samples for analysis of gene expression in the reproductive tract. While endometrial PMN% decreases gradually along with days postpartum in health cows, expression levels of cytokines such as IL1 β , IL6, IL8, TNF α show their peak around day 17 postpartum. It has been also observed that their expression levels were higher in cows with endometritis than healthy cows. Moreover, the expression of IL1 β was higher in cows that had first corpus luteum too early in postpartum period, suggesting that early formation of CL might result in deterioration of uterine environment. These findings warrant future studies to understand interactions among host (immune), pathogen and environment better in order to develop strategies to minimize negative impact of infection and inflammation in bovine female reproductive tract on subsequent fertility and reproductive performance.

Keywords: Cow, Infection, Inflammation, Reproductive tract, Uterus