

総説

子宮内膜炎の治療 — キトサンの効果について —

小比類巻正幸

(有) 小比類巻家畜診療サービス
〒 039-2683 青森県上北郡東北町字大平 63-3
TEL 0175-64-2710 FAX 0175-64-9748
E-mail kopi@kopi-kopi.com

【要約】

繁殖間隔を適正に維持するためには分娩後における子宮機能の速やかな回復が必要である。子宮内膜炎への罹患は受胎性を著しく低下させることから正確な診断と適切な治療を早期に実施することが肝要となるが子宮機能の評価方法や治療方法には不明な点が多いのが現状である。そこで我々は免疫賦活効果や創傷治癒効果が認められるキトサンの子宮内注入による治療効果の検討を行った。繁殖共用時期に明瞭な発情兆候が観察されなかったホルスタイン種経産牛に対し、子宮内環境の正常化を目的に、液状キトサン製剤 200mg/50ml を子宮内に注入した。注入7日後から CIDR ショートプログラムで定時人工授精を行ったキトサン CIDR 群 (n=106) の受胎率は 59.4% であり、無注入の対照群 (n=101) の 44.6% と比べて有意に高かった (p<0.05)。液状キトサン製剤注入後3日の子宮還流液中の CD18 陽性白血球比率は、生理食塩液を注入したそれと比較して有意に高く、子宮内膜の病理組織所見では注入後3~7日に子宮内膜に好中球の浸潤が観察された。以上のことから液状キトサン製剤の子宮内注入は、子宮内膜における白血球の血管外遊走を促し、子宮内環境の正常化が図られることで、繁殖成績の向上をもたらすことが示唆された。

キーワード: 子宮内膜炎、液状キトサン製剤、乳牛、治療

【はじめに】

酪農経営において適正な分娩間隔を維持することは生産性やコスト削減などの観点から重要であり、そのためには分娩後の速やかな卵巣及び子宮機能の回復が必要となる。繁殖成績に影響を及ぼす要員の一つに子宮内環境が挙げられ、分娩時に難産、双子分娩、胎盤停滞をともなった場合、正常に分娩したものと比較して細菌感染を伴う子宮内膜炎に罹患する可能性が高くなるとともに、繁殖成績が低下することが知られている [2, 5, 11]。このような症例に対し

ては子宮機能の状態を正確に診断し、的確な治療を施すことで子宮内環境を正常に回復させる必要がある。子宮内膜炎は繁殖期の子宮疾患の中では発生頻度が高いものの子宮機能の客観的な評価方法や診断および治療に関しては不明な点が多く [12]、卵巣機能の制御に主眼を置いた定時授精プログラムなどのような治療プロトコルが確立されていないのが現状である。本稿では臨床現場における子宮内膜炎に対する治療の実際と免疫賦活作用が確認されている液状キトサン製剤の治療応用について述べてみたい。

【周産期における栄養と繁殖】

高泌乳に改良された近年の乳牛は、エネルギー

受理: 2016年10月11日

ギー要求量が高く分娩から泌乳最盛期にかけて要求エネルギーに対して摂取エネルギーが不足する負のエネルギーバランスに陥ることが知られている [16]。また、分娩前後における体重変動率の減少が著しい牛群においては周産期疾病の発症率が高く繁殖成績が低下すること [7] や周産期における栄養バランスの失調は免疫機能の低下を誘発し周産期疾病の発生に影響をおよぼすとされ [18]、周産期疾病を発症した牛では受胎率が低下する [13]。これらのことから乳牛では分娩後の繁殖共用時期における栄養と繁殖成績には密接な関連があり、さらには分娩前から周産期にかけての栄養状態と繁殖成績も同様であると考えられる。分娩後の速やかな子宮機能の回復には、泌乳ステージの特性を理解した適切な栄養管理が不可欠である。

【子宮内における炎症と免疫】

分娩後早期の子宮内ではさまざまな細菌が存在し、発情期では自然交配による細菌汚染の危険が高まる。このような状況下において子宮内では細菌をはじめとする異物の侵入および増殖を阻止するために細胞性免疫 (Th1) 優位の免疫バランスとなっている。一方、受精卵が子宮内に下降する黄体期においてはP4の刺激下において液性免疫 (Th2) やTregが優位な免疫バランスとなり非自己である受精卵を免疫的に寛容しNK細胞の活性を阻害する [10]。子宮内膜炎に罹患し慢性的な炎症状態が持続している場合、授精後に子宮内に下降してきた受精卵は異物として認識される可能性が高くなる。また、黄体の存在下で子宮内に細菌や炎症産物が存在する場合は逆にそれらが排出されないまま持続する場合は考えられる。このようにして子宮内膜炎の治療が遅延し受胎がおぼつかない状況を想像するに子宮内膜炎は早期に診断し適切な治療を速やかに実施することが必要であることが理解できる。

【子宮内膜炎治療の実際】

(1) PGF2 α 製剤

正常な乳牛では、分娩後おおむね5週間で子宮機能は回復するとされているが、回復が遅れる個体においては悪露や炎症産物が排出されずに子宮内にとどまることにより子宮内膜炎へと

移行していくと推察される。PGF2 α 製剤は黄体を退行させ子宮を収縮させることでそれらを排出させる目的で投与される。しかし、すでに初回排卵があり、黄体が存在する状態でなければ効果は限定的となる可能性も高い。また、ワンショットで済む治療であるため第一選択として投与されることも多いが治療効果においては不明な点も多い [15]。

(2) 子宮洗浄

現在では、繁殖障害の治療領域では多くのホルモン製剤が市販され使用することが可能となっているが、そのようなホルモン製剤が無かった時代から子宮洗浄は繁殖障害に対して有効な治療方法として実施されてきた。当時は洗浄嘴管を用いて洗浄が行われていたが穿孔の危険もあることから現在ではバルーンカテーテルを留置し行われることが多い。生理食塩水を子宮内に満たし軽くマッサージすることにより細菌感染による菌体や免疫反応による産出物質が物理的に排除されることや粘膜上皮細胞が再生されることによる子宮内環境の正常化を期待する治療法と考えられる。子宮内膜炎をはじめとする子宮疾患に対する治療としては有効性が高い [17] ものの詳細な効果に関しては不明な点も多い。生田ら [4] は異常産であった乳牛に対して強酸性水を用いて子宮洗浄を実施したところ、正常分娩牛と同等の繁殖成績が得られ、難産や胎盤停滞を経験した牛に対しては分娩後早期に子宮洗浄をすべきと報告している。また、子宮洗浄はその作業の煩雑さや処置に多くの時間を要することなどから敬遠される傾向があり、今後は簡便で時間短縮が可能な子宮洗浄方法の開発が望まれる。

(3) 子宮内薬液注入

細菌感染を起した子宮内の清浄化や、薬剤の刺激による子宮粘膜上皮の再生および修復作用を目的に、子宮内への抗生剤やヨード剤の投与が行われている。しかし金子ら [6] は、人工授精後に2%ポビドンヨード溶液や抗生物質を子宮内に注入しても、その後の受胎率に差異はみられなかったと報告している。また、ポビドンヨード溶剤の濃度は2%では刺激性が強いため、低濃度の方が有効であるとの報告もある [1]。

【子宮内膜炎に対する液状キトサン製剤の 治療応用】

子宮内膜炎の診断および治療に関しては不明な点が多く、数回の授精を試みるも受胎に至らないため診断的子宮洗浄や薬液注入を試みる例も少なくない [12]。

しかし子宮機能の正常化には子宮内への刺激や抗生剤投与による細菌の排除だけにとどまらず免疫機能の回復を伴ったアプローチが必要との観点から我々は子宮内膜炎に罹患した個体や子宮内膜炎が疑われる個体に対する液状キトサン製剤の子宮内投与を行ってきた [8]。その研究の一部を以下に記述する。

(1) キトサンについて

甲殻類や菌類の骨格成分であるキチンのアセトアミノ基がアミノ基になったものである。キトサンは組織活性を高め、生体の防御機能を局所的に誘発する特性があり [9]、創傷部位における肉芽形成を促し、治癒促進作用が明らかになっている [3]。

(2) 発情・排卵同期化プログラムの前処置として液状キトサン製剤を子宮内注入することが受胎率に及ぼす影響

青森県内に飼養されている分娩時に難産及び

胎盤停滞の経歴のない個体で分娩後 60 日以内に発情が認められず未受精であった、あるいは受精後 40 ~ 60 日間発情が認められなかったものの不受胎であったホルスタイン経産牛に対し試験を行った。直腸検査により子宮壁の著しい肥厚や子宮内貯留物が認められた個体は除外した。同一農場で同時期に投与群と対照群がほぼ均等になるように区分した。投与群には酢酸を溶質とした液状キトサン製剤（明治キトサイド C、Meiji Seika ファルマ（株）、東京）を 200mg/50ml、人工授精用シース管を用い子宮内に注入した（キトサン CIDR 群、n=106）。対照群には液状キトサン製剤の投与を行わなかった（CIDR 群、n=101）。両群の年齢及び分娩後日数の平均±標準偏差（SD）はそれぞれ、 4.3 ± 0.2 及び 116.7 ± 16.5 と 4.0 ± 0.2 及び 133 ± 6.0 であった。子宮内注入から 7 日後を Day0 として CIDR-synch 変法を実施し、Day10 に人工授精を行った。CIDR 群の受胎率は 44.5%（101 頭中 45 頭）であったのに対し、キトサン CIDR 群は、59.4%（106 頭中 63 頭）と有意に高い受胎率を示した（ $p < 0.05$ ）（図 1）。

(3) PG 投与による発情誘起前の液状キトサン製剤の子宮内注入が受胎率に及ぼす影響

青森県内 14 農場に飼養されている分娩時に

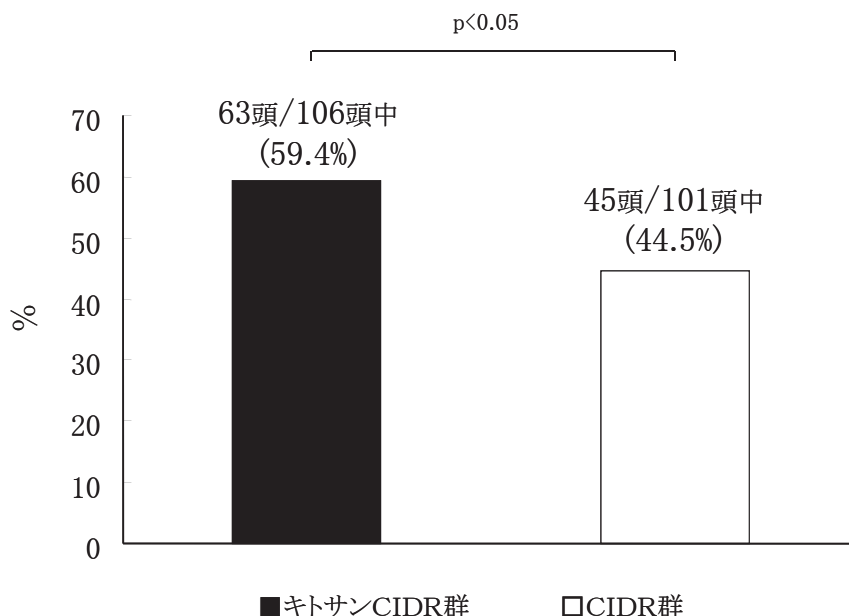


図 1 キトサンCIDR群とCIDR群の受胎率の比較

難産及び胎盤停滞の経歴がない個体のうち、分娩後60日以内に発情が認められなかったホルスタイン種経産牛を試験に用いた。直腸検査により子宮壁の著しい肥厚や子宮内貯留物が認められた個体は除外した。同一農場で同時期に投与群と対照群がほぼ均等になるように区分した。投与群には液状キトサン製剤 200mg/50ml を人工授精用シース管を用いて子宮内に注入した(キトサンPG群 n=27)。対照群には子宮内注入を行わなかった(PG群、n=29)。両群の年齢及び分娩後日数の平均±SDはそれぞれ4.7 ± 0.4 及び 160.4 ± 16.9 と 5.0 ± 0.4 及び 143.5 ± 12.1 であった。子宮内注入から7～14日後の直腸検査で黄体の認められた個体に対してPGを筋肉内投与し、3～4日後の外部兆候と直腸検査で発情を確認して、人工授精を実施した。キトサンPG群5頭とPG群6頭はPG投与後に明瞭な発情が確認されず、人工授精が実施できなかったため試験から除外した。PG投与後で不受胎であった個体は、自然発情の回帰時に人工授精をその都度実施したが、キトサンPG群で1頭、PG群で2頭が不受胎のため淘汰され、それ以外は全頭が受胎した。PG投与後の受胎率は、PG群で37.9% (29頭中11頭)であったが、キトサンPG群では74.1% (27頭中20頭)と有意に高かった(p<0.01) (図2)。

PG投与から受胎までの日数は、PG群と比較してキトサンPG群で有意な短縮が見られた(p<0.01) (図2)。同じくPG投与から受胎までに要した平均受精回数は、PG群と比較してキトサンPG群で有意な減少が見られた(p<0.01) (図2)。

(4) 液状キトサン製剤の子宮内注入後における子宮内白血球サブポピュレーションの推移

キトサン投与後の子宮内の免疫細胞の推移を観察する目的で実験を行った。発情を同期化したホルスタイン種経産牛8頭を用いた。発情後7日に液状キトサン製剤を注入したキトサン群(n=4)と生理食塩液50mlを子宮内注入した対照群(n=4)において、それぞれ投与前、投与後3日、7日に生理食塩液を用いて子宮を還流した。定法に従い[14]フローサイトメトリー(FCM)法によって表面抗原と好中球貪食能を解析した。子宮還流液中の総白血球数を示すCD18陽性白血球比率は、注入後3日において対照群と比較してキトサン群で有意に高い値を示した(p<0.01) (図3)。単球を示すCD14陽性細胞比率は、キトサン群、対照群ともに注入後3日、7日と増加する傾向が見られたが、両群の間に差は認められなかった。

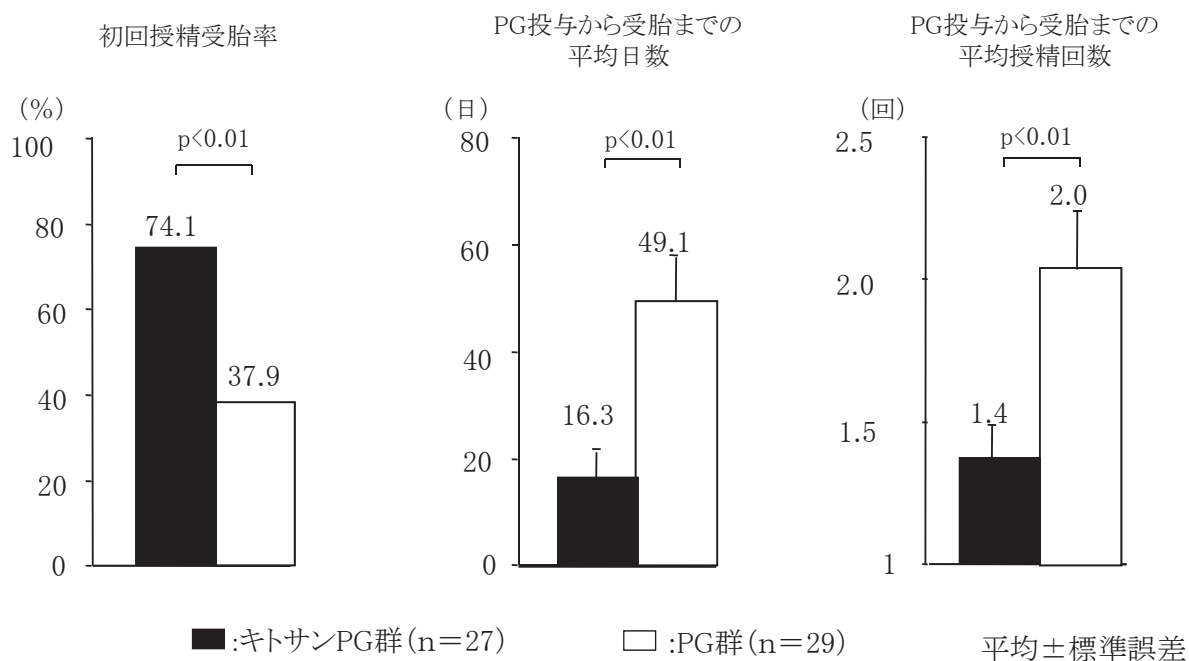


図2 キトサンPG群とPG群の繁殖成績

(5) 子宮内膜炎に対する液状キトサン製剤 の子宮内注入後のPMN%の推移

青森県の酪農家3戸で繋養されていた、分娩後60-100日のホルスタイン種経産牛のうちサイトブラシを用いた細胞診断によりPMNが4%以上を示し子宮内膜炎と診断した12頭を供した。キトサン投与群(n=6)にはおおよび無処置群(n=6)に分けて、サイトブラシ検査日

をday-1とし、キトサン投与群にはday0液状キトサン製剤を子宮内注入し、無処置群は何も投与しなかった。両群ともday10に再びサイトブラシ検査を実施しday-1の結果と比較した。day-1のPMN%の平均±標準誤差(SE)はキトサン投与群6.0±0.9%、無処置群5.1±0.3%と両群間に有意差はなかったが、day10のPMN%はキトサン投与群2.6±1.1%、無処

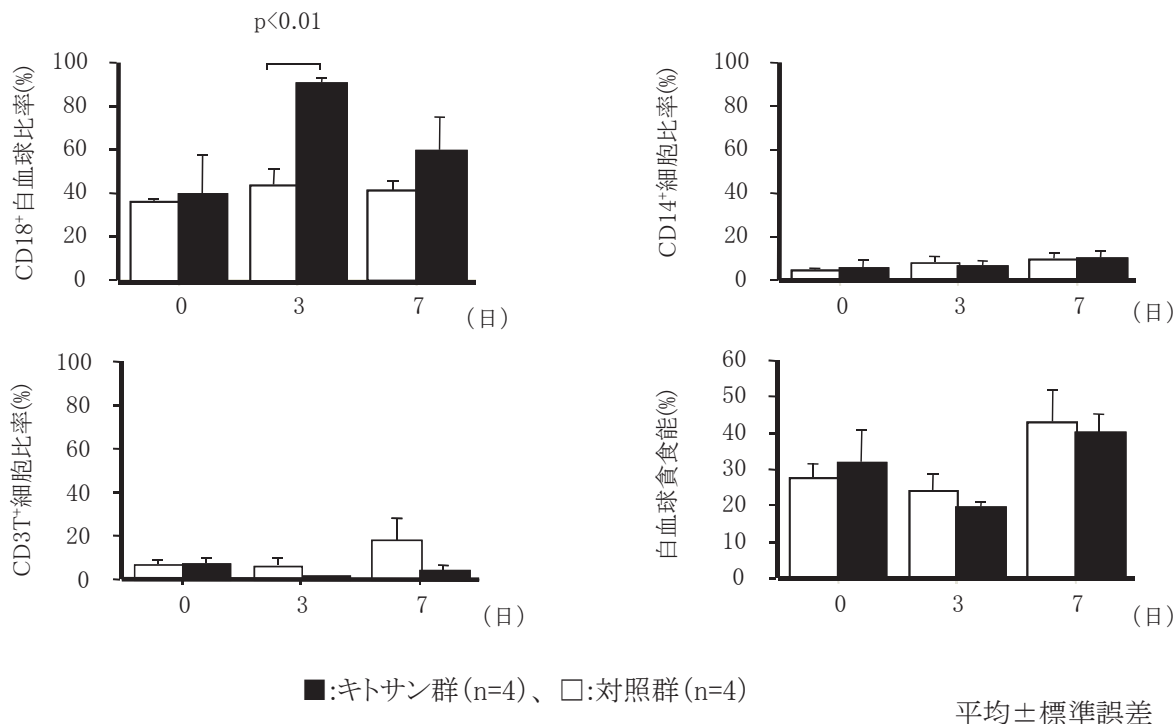


図3 液状キトサン注入前、注入後の子宮内還流液中の白血球比率

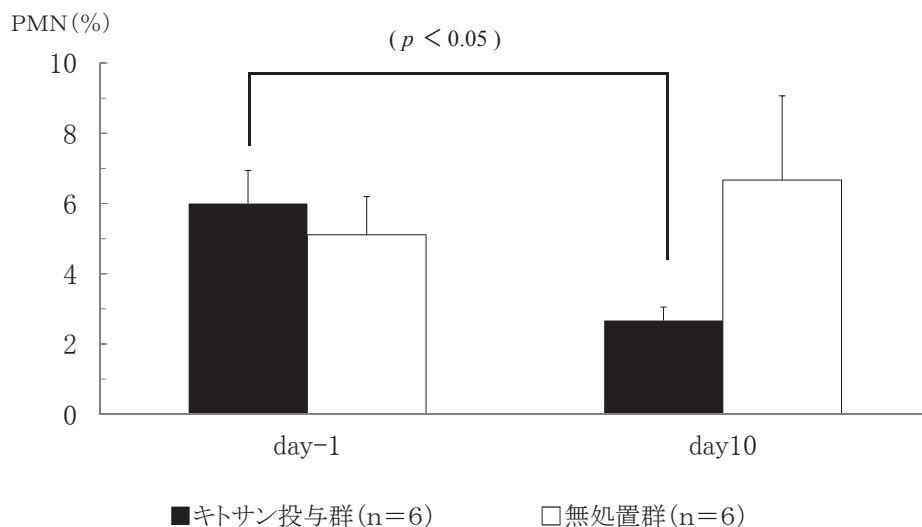


図4 液状キトサン注入後のPMN%の推移

置群 $6.7 \pm 2.4\%$ となり、キトサン投与群では有意に減少した ($p < 0.05$) (図4)。

【おわりに】

子宮内膜炎は子宮疾患の中では最もポピュラーな疾患でありその罹患により繁殖間隔が延長するなどの経済的損失は甚大である。子宮内膜炎は軽度のものから重度のものまで多様であり、病態を正確に診断し適切な治療を選択することが肝要である。これまでは子宮機能の客観的評価が難しい背景があり、その診断や治療に関しては不明な点が多く数回の授精を試み受胎しないものに関して子宮疾患を疑うことが少なくなかった [12]。しかし、フレッシュチェック時や生理的空胎期間を経過した時点で正確に子宮機能を評価することが出来れば無駄に授精する回数を減少させたり分娩間隔を短縮することが可能である。子宮内膜炎に対する液状キトサン製剤の子宮内注入は局所における白血球の遊走を促しPMN%を減少させることが明らかとなった。しかし、重度の子宮内膜炎に対しては、PMN%が減少後に再度上昇する例も散見されることから子宮洗浄との組み合わせでの治療やさらに効果の高い治療法の検討が必要と考える。

近年では子宮内膜の細胞診用のサイトブラシが市販されたことや携帯用超音波診断装置のフィールドにおける普及が進んでいることから子宮内膜炎の診断精度の向上が見込まれるとともに子宮内局所における免疫機能の研究が進んでおり、臨床現場における受胎性の向上につながる知見に期待したい。

【引用文献】

1. 秋田真司. 2014. 乳牛の繁殖障害に対する 0.5% ポビドンヨードの 子宮内注入の効果. 広島県獣医師会雑誌 .29:21 ~ 24.
2. Ghanem, M., Shalaby, A. H., Sharawy, S. and Saleh, N.2002. Factors leading to endometritis in dairy cows in Egypt with special reference to reproductive performance. J. Reprod. Dev. 48:371-375
3. Hayashi, T., Matsuyama, T., Hanada, K., Nakanishi, K., Uenoyama, M., Fujita, M., Ishihara, M., Kikuchi, M., Ikeda, T., and Tajiri, H. 2004. Usefulness of photocrosslinkable chitosan for endoscopic cancer treatment in alimentary tract. J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 71 : 367-372.
4. 生田健太郎、中家一郎. 1996. 分娩後早期における乳牛子宮内細菌と強酸性イオン水による子宮洗浄効果. 日獣会誌. 49: 363 ~ 367.
5. Kim, I H. and Kang ,H G. 2003. Risk factors for postpartum endometritis and the effect of endometritis on reproductive performance in dairy cows in Korea. J. Reprod. Dev. 49 : 485-491.
6. 金子一幸、吉原進平、山中 栄. 1989. 低受胎牛に対する 2% ポビドンヨード溶液の子宮内注入効果について. 家畜診療 . 307 : 43-45.
7. Kohiruimaki, M., Ohtsuka, H., Hayashi, T., Kimura, K., Masui, M., Ando, T., Watanabe, D. and Kawamura, S. 2006. Evaluation by weight change rate of dairy herd condition. J. Vet. Med. Sci. 68 : 935-940.
8. 小比類巻正幸、向井真知子、大塚浩通、三浦 弘、川村清市. 2013. 液状キトサン製剤の子宮内注入が無発情牛の発情・排卵同期化後の受胎率に及ぼす影響. 日獣会誌 . 66 : 385-389.
9. Kosaka, T., Kaneko, Y., Nakada, Y., Matsuura, M. and Tanaka, S. 1996. Effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress. J. Vet. Med. Sci. 58 : 963-967.
10. 前田洋祐. 2012. プロジェステロンが牛のリンパ球に及ぼす影響. 家畜感染症学会誌 1(3) : 91-95.
11. 松崎 勉、田中樹竹. 1993. 乳牛の子宮内膜炎の治療法および予後に関する考察. 家畜診療 . 362 : 27-33.
12. 中尾敏彦. 2001. 牛子宮内膜炎の診断と治療. 家畜診療 . 48 : 717-726.
13. 大塚浩通、小岩政照、佐藤洋平、山下政秀、高田知哉、伊藤 登、星 史雄、吉野知男、川村清市. 2001. 乳牛の乾乳期における血清総コレステロール値と分娩後の末梢白血球との関連性. 日獣会誌 . 54 : 761-765.
14. Ohtsuka, H., Koiwa, M., Fukuda, S., Satoh, Y., Hayashi, T., Hoshi, F., Yoshino, T. and Kawamura, S. 2004. Changes in peripheral leukocyte subsets in dairy cows with inflammatory diseases after calving. J Vet.Med.Sci. 66 : 905-909.
15. Scott, M., Melvin, B., Chris, C. and Stephen, J, L. 2013 Clinical trial of treatment programs for purulent vaginal discharge in lactating dairy cattle in New Zealand . Theriogenology 79 : 1139-1145.
16. Walsh, S. W., Williams, E. J. and Evans, A. C. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. Anim. Reprod. Sci. 123 : 127-138.
17. 矢光 潤. 乳牛の子宮洗浄について. 獣医畜産新報 . 817 : 8-10.

18. 山田恭嗣、中尾敏彦、園中 篤、南 繁、宮野正章、
中尾 茂、森好政晴、河田啓一郎 . 1994. 乳牛の
栄養状態と周産期疾病および受胎成績 . 日獣会
誌 . 47 : 322-326.

Treatment of endometritis – Effect of chitosan solution –

Masayuki Kohiruimaki

Kohiruimaki Animal Medical Service

[Abstract]

We performed a study about the effect of intrauterine infusion of chitosan solution on conception rate. Postpartum Holstein cows which showed no clear estrus after parturition were investigated. The cows were intrauterine infused the chitosan solution at a dose of 200mg/50ml. Seven days after infusion of the chitosan solution, the cows were used CIDR short program and timed artificial insemination (TAI)(chitosan CIDR group : n=106). The conception rate of the cows without the infusion of chitosan solution (CIDR short program and TAI only) were 44.5% (control group : n=101). In contrast, the conception rate of the chitosan CIDR group was 59.4% and it was significantly higher than that of control group ($p<0.05$). Three days after infusion of chitosan solution, the percentage of CD18-positive white blood cells from the uterine fluid in the chitosan CIDR group was significantly higher than those in the control group. Furthermore, histological study of endometrium between 3days and 7days after infusion of chitosan solution showed neutrophil infiltration. These results suggested that intrauterine infusion of chitosan solution stimulated leucocyte migration in the endometrium, and it followed that the conception rates were improved.

Key words: Chitosan solution, Dairy cows, Improve reproductive performance, Intrauterine infusion