

総説

牛における周産期の細菌感染に起因する子宮内膜炎と卵巣機能障害の関係

山本直樹¹⁾ 永野昌志²⁾ 山下泰尚^{3) †}

¹⁾ 岡山理科大学獣医学部獣医学科

〒794-8555 愛媛県今治市いこいの丘1-3

²⁾ 北里大学獣医学部動物資源科学科

〒034-8628 青森県十和田市東二十三番町35-1

³⁾ 県立広島大学生物資源科学部生命環境学科

〒727-0023 広島県庄原市七塚町5562番地

† 責任著者：山下 泰尚

電話：0824-74-1751

E-mail：yamayas@pu-hiroshima.ac.jp

[要約]

牛において、子宮内膜炎および卵巣機能障害は、いずれも空胎期間を延長させる主要な繁殖障害であり、これら2つの疾病が併発することは古くから知られている。子宮の急性炎症は多形核白血球 (Polymorphonuclear cell: PMN) の割合 (PMN%) を診断指標としたサイトブラシ法により診断可能であり、黒毛和種牛の子宮内膜炎と卵巣嚢腫の発生状況について調査したところ、分娩後40～60日にみられる卵巣嚢腫は子宮内膜炎と関連することが示唆された。炎症反応の要因の一つとして、グラム陰性細菌の外膜を主成分とした内毒素である Lipopolysaccharide (LPS) が、細胞膜上の受容体である Toll 様受容体4 (Toll-like receptor: TLR4) に作用し、炎症性サイトカイン (Tumor Necrosis Factor- α および複数のインターロイキン) の発現を誘導することが知られている。TLR4 は発育期の卵胞の顆粒層細胞で強く発現しており、分娩後の感染で生じる子宮内膜炎に由来する LPS は顆粒層細胞の機能を障害し、卵巣静止、卵巣嚢腫や排卵障害などの卵巣機能障害を引き起こしていることが示唆された。したがって、繁殖性向上のためには、牛の適正な飼養管理による子宮感染予防、サイトブラシ法を活用した子宮内膜炎の早期発見が重要であり、今後は子宮内膜炎の治療に加え、卵巣機能を低下させる LPS に対する治療法の開発が必要と考えられる。

キーワード：子宮内膜炎の診断、卵巣嚢腫、卵巣静止、潜在性子宮内膜炎

【はじめに】

産業動物である牛では、分娩後、次の受胎に至るまでの空胎期間の短縮は畜産経営に極めて重要である。試算では空胎期間が1日伸びれば

乳用牛1頭あたり550～1,400円程度の損害となるとされている [46]。近年の飼料価格高騰により、さらに損害は大きくなっており、空胎期間を短縮するための技術開発が求められている。我が国では、産褥期を経た後の分娩後80日に受胎させる「1年1産」の達成を目指して、これまで繁殖管理に関する研究が行われてきた。しかし、空胎期間は1980年代以降世界的

受付：2024年4月25日

受理：2024年4月25日

に延長し続け、その状況は国内でも同様で、乳用牛群能力検定成績によると乳用牛の分娩間隔は全国平均で420日前後と目標値とは程遠いのが現状である。空胎期間の延長を引き起こす要因として、発情回帰の遅延のみならず、卵巣機能自体がそもそも停止する卵巣萎縮、卵巣機能が不十分なため発情兆候が微弱化する鈍性発情や無発情、子宮内膜炎、あるいは1回の人工授精（Artificial insemination: AI）あたりの受胎率の低下が挙げられる。家畜共済統計によると2018年度の生殖器病は乳用牛で307,906件、肉用牛で223,419件発生しており、農家の経営を圧迫する重要な疾病である。本稿では、我々の研究によって明らかになった子宮内膜炎診断におけるサイトブラシ法と組織学的検査法の長所と短所、子宮内膜炎と卵巣機能の関係およびそのメカニズムについて報告するとともに、これらの最新の知見について紹介する。

【子宮内膜炎とその診断】

子宮内膜炎は、分娩後の感染により生じる炎症性子宮疾患であり、分娩直後はほぼ全ての牛の子宮から細菌が分離される [32]。分娩時に子宮が細菌に汚染され、子宮内膜炎を引き起こす要因には、胎盤停滞 [17, 27]、不衛生な分娩介助 [27, 29]、および不衛生な牛舎環境があり [26]、特に乳用牛では、泌乳による低栄養状態（負のエネルギーバランス）や低カルシウム血症による子宮内膜炎発症への影響が大きい [7, 8, 17]。子宮内膜炎は全身症状を伴う子宮炎とは異なり、子宮内膜に炎症が局限し、全身症状を伴わない。獣医師が繁殖障害の診断にあたって最も頻繁に行うのは直腸検査であるが、直腸検査により形態的な異常や治療に対する効果を容易に診断可能な卵巣疾患と異なり、直腸検査のみで子宮内膜炎を診断することは困難である。子宮内膜炎は、その臨床症状により腔粘液の混濁を伴う臨床型子宮内膜炎（Clinical endometritis: CE）と腔粘液の混濁を伴わない潜在性子宮内膜炎（Subclinical endometritis: SE）に区分される。CEの発見には畜主による飼養管理の中での頸管粘液の観察や、獣医師による分娩後早期の繁殖検診が必要である。SEは、臨床症状がないため発見が難しく、細胞診や組織学的診断が必要となる。そのため、従来

のバイオプシー（組織学的検査法）と比較して侵襲性が低くかつ簡便なサイトブラシ法による子宮内膜細胞診が開発され [1, 13, 14]、国内でもメトリブラシ（富士平工業（株）、東京）が2015年に発売された。しかし、家畜共済統計によると、2018年時点で子宮内膜炎全体の事故件数は乳用牛で22,431件、肉用牛で18,382件であるが、そのうちSEは乳用牛で159件（0.7%）、肉用牛で619件（3.4%）しか診療対象となっていない。分娩後32から70日の牛で牛群全体のSEの割合が26%だったとする海外での報告を考慮すると [5]、依然として多くのSE牛が見逃されている可能性があり、臨床現場でサイトブラシ法をさらに活用することが必要と考えられる。

そこで我々は、組織学的検査法とサイトブラシ法サンプル中の炎症性細胞の割合を比較し、サイトブラシ法の有用性について検討した。その結果、多型核白血球（Polymorphonuclear cell: PMN）は主に子宮内膜の表層に分布しており、PMNの割合（PMN%）は組織学的検査法とサイトブラシ法の間で正の相関を示したが、リンパ球の割合に相関は認められなかった [44]。このことから、慢性炎症の主体であるリンパ球による子宮内膜炎の診断には組織学的検査法が必要であるものの、サイトブラシ法のPMN%は、子宮内膜におけるPMNの遊走状況を反映し、急性炎症の診断に有効活用できることが示された [44]。

【雌の生殖内分泌系と卵胞発育の関係】

雌の生殖内分泌系は、卵巣を刺激する黄体形成ホルモン（Luteinizing Hormone: LH）および卵胞発育ホルモン（Follicle Stimulating Hormone: FSH）を分泌する視床下部一下垂体とこれらにより制御を受ける卵巣から形成される。[4, 9, 34]。卵巣内には数千～数万個の原始卵胞が存在し、これらが発育すると、一次卵胞から二次卵胞を経て卵胞液を伴う初期胞状卵胞まで卵胞発育が進行する。通常、牛では、20個程度の初期胞状卵胞（直径3～4mm）が一斉に発育を開始し、最終的に1個の直径10～24mmの後期胞状卵胞（優勢卵胞）が選ばれる。卵胞発育初期に選ばれる初期胞状卵胞は、基底膜の外側に位置する卵胞膜細胞、基底膜の

内側に位置する顆粒層細胞、および卵母細胞から構成されており、それぞれ卵胞膜細胞には LH 受容体 (LHCGR)、顆粒層細胞と卵丘細胞には FSH 受容体 (FSHR) が存在する [2, 35, 36]。これらの初期胞状卵胞は、LH および FSH の作用を受けると、LHCGR が発現する卵胞膜細胞ではコレステロールからプロゲステロン (Progesterone: P₄) が、P₄ からアンドロステンジオンが合成される [18]。アンドロステンジオンはさらに、FSH の作用で顆粒層細胞のアロマターゼ (CYP19A1) によりエストラジオール (E₂) に変換される [19]。血中に分泌された E₂ は、顆粒層細胞における LHCGR の形成促進を誘導するとともに、視床下部にフィードバックされ排卵を誘導する LH の一過的放出 (LH サージ) を引き起こす。また、血中に分泌された E₂ は子宮に作用すると子宮粘液の分泌といった発情兆候を引き起こす。LH サージにより顆粒層細胞の LHCGR が刺激されると、顆粒層細胞は Epidermal Growth Factor (EGF) -like factor を分泌し、顆粒層細胞および卵丘細胞の EGF 受容体に作用する。これらの刺激は顆粒層細胞および卵丘細胞で P₄ および Prostaglandin E₂ の分泌を介して、優勢卵胞からの成熟卵子の排卵を誘導するとともに、残留した顆粒層細胞の黄体化を促進する [16, 24, 25]。この一連の生殖内分泌系の破綻は卵胞発育障害や排卵障害などの卵巣疾患と密接に関連することから、この正常性を保つことが、受精にとって重要である。

【子宮内膜炎と卵巣機能障害の関係】

卵巣機能障害とは、分娩後に正常な発情周期が回復しない状態のことであり、卵巣の状態により卵巣静止、排卵障害、および卵巣嚢腫などの疾患に分類される。スタンディング、マウンティング、および陰部の充血腫脹などの発情兆候の発現には卵胞の顆粒層細胞から分泌される E₂ が関与しているため [20]、卵巣周期が正常に回復していても、血中 E₂ 濃度が十分に上昇しない卵巣機能障害により無発情や鈍性発情となる。さらに、発情を発見して AI を行ったとしても、排卵遅延による授精適期のズレや黄体形成不全による P₄ 不足により受胎率は低下する [22]。通常、卵巣機能障害に対する治療に

は Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) をはじめとするホルモン剤が用いられるが、子宮内膜炎に罹患した牛では GnRH 投与に対する反応性が低下することが報告されている [38]。

我々は子宮内膜炎が卵巣機能障害を引き起こす機序について、高泌乳による影響を除外して検討するため、肉用牛である黒毛和種牛における子宮内膜炎と卵巣嚢腫の関係について、サイトブラシ法を用いて検討を行った。その結果、卵巣嚢腫罹患牛における子宮内膜炎の割合は対照群と比較して有意に高く、分娩後 40～60 日における平均 PMN% は対照群に比べ卵巣嚢腫群が有意に高い値であった [43]。このことから、分娩による感染をきっかけとした子宮内膜炎が卵巣嚢腫の要因となっていると考えられた。そのため、ホルモン剤により一時的に卵巣機能障害が改善されても子宮内膜炎により再び卵巣機能障害が引き起こされる可能性がある。したがって、分娩後早期に卵巣嚢腫を発見した場合は子宮内膜炎の診断を併せて行い、子宮内膜炎を併発していれば、卵巣機能障害の治療に加え、子宮内膜炎の治療も並行して行うことが望ましいと考えられる。

【子宮内膜炎が卵巣機能障害を引き起こすメカニズム】

子宮内膜炎による繁殖性低下の機序として、牛の子宮における細菌感染による急性炎症が卵胞発育障害および血中 E₂ 濃度低下を引き起こすこと [30, 40]、この結果、卵巣嚢腫が引き起こされることが報告されている [37]。Lipopolysaccharide (LPS) は、*Escherichia coli* を始めとするグラム陰性細菌の外膜を主成分とした糖脂質であり、エンドトキシン (内毒素) とも呼ばれる [39]。分娩後の子宮内膜炎における *E. coli* の感染が卵胞液中の LPS を増加させることが報告されており [6, 10, 21, 23]、乳用牛を用いた我々の研究では CE や SE に罹患した牛の子宮内膜で LPS が増加することが明らかとなった。また、牛子宮内への LPS 注入が排卵を抑制することも報告されている [41]。Toll-like receptor (TLR) は細胞膜上に存在し、初期免疫を誘導するタンパク質であり [15]、この中でも TLR4 は LPS をリガンドとする [31]。LPS は

TLR4 と結合すると下流シグナルを賦活化し、Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) および複数のインターロイキンなどの炎症性サイトカインの発現を誘導して炎症反応を引き起こす [31, 33]。TLR4 の mRNA およびタンパク質は発育期の卵胞内の顆粒層細胞表面に存在することが報告されている [3, 10, 28, 42, 45]。

我々は、子宮内膜炎罹患が顆粒層細胞へ与える影響を調べるため、と体卵巣から顆粒層細胞を採取し、子宮内膜炎に罹患していない牛（正常牛）および子宮内膜炎罹患牛の間で下記の解析 (*ex vivo*) を行った [45]。子宮内膜炎罹患牛では正常牛に比べて顆粒層細胞の炎症性サイトカイン (TNF, IL-1A, および IL-1B) の mRNA 発現が高く、卵胞発育マーカー (FSHR, CYP19A1, および Cyclin D2) と LH レセプター (LHCGR) の mRNA 発現は抑制されていた。卵胞液中の E₂ 濃度および顆粒層細胞の増殖能 (PCNA 陽性細胞の割合) も正常牛に比べ、子宮内膜炎罹患牛で低値であった。一方で、正常牛では多数の顆粒層細胞がアポトーシスを起こしていたが、子宮内膜炎罹患牛ではほとんど検出されなかった。子宮内膜炎によるこれらの影響のメカニズムを調べるため、正常牛から採取した顆粒層細胞を用いて LPS 添加培養 (*in vitro*) を行った [45]。LPS 添加によって顆粒層細胞の炎症性サイトカイン発現が上昇し、卵胞発育マーカー (FSHR, CYP19A1, および Cyclin D2) の mRNA 発現、LH レセプター (LHCGR) の mRNA 発現、E₂ 産生、および顆粒層細胞の増殖が抑制された一方、アポトーシスも抑制された [45]。顆粒層細胞の増殖能の低下、排卵機能障害、およびアポトーシス抑制は卵巣嚢腫発症の要因であるため [11, 12]、子宮内膜炎により増加した LPS が子宮内膜から卵胞に移行し、TLR4 経路を活性化させることが子宮内膜炎罹患牛で発症する卵胞発育障害や卵巣嚢腫の原因の一つとなっていると考えられる。さらに、炎症のない一部の子宮でも子宮内膜に含有されている LPS 量が高い症例があったため、子宮内膜炎治療後も LPS が子宮内膜に残存して持続的に卵胞へ作用している可能性があると考えられた。

【まとめ】

子宮内膜炎は子宮内の pH 低下による精子の運動性低下および胚の着床を妨げることによって直接的に受胎率の低下を招く。一方で、子宮内膜炎は上述の機序によって間接的に卵巣機能障害を引き起こし、繁殖性を低下させる。分娩は子宮に細菌感染が起こる最も重大な機会となるため、牛床を衛生的に保つこと、分娩前後の低栄養状態や低カルシウム血症を起こさせないよう栄養管理を行うこと、および分娩時の介助を衛生的に行うことなど、分娩時の感染を最小限にするとともに牛の免疫力を低下させないための適切な飼養管理を行うことがグラム陰性菌の感染予防、ひいては卵巣機能障害の予防にとって重要な要素である。また、子宮内膜炎のうち、特に SE は見逃されやすく、長期的な不受胎を招くため、卵巣機能障害を治療するにはサイトブラシ法による子宮の検査も併せて行い、早期に子宮内膜炎を摘発すべきである。子宮内膜炎に罹患してしまった牛に対して抗生物質やポピドンヨードの子宮内注入が行われてきたが、これらの薬剤は LPS に対する直接的な作用を持たないため、今後 LPS に対する新たな治療法の開発が求められる。

【謝辞】

本稿に記載した研究にご協力いただきました鳥取大学農学部共同獣医学科の森田剛仁教授および西村亮准教授、ならびに県立広島大学の竹内媛乃氏、山岡愛実氏、中西寛弥氏、および藤内慎悟氏に対し、感謝申し上げます。また、臨床現場での研究や、と畜された牛からの採材にご協力いただいた、島根県農業共済組合の皆様、島根県食肉衛生検査所の皆様、および島根県食肉公社の皆様に対し、深謝いたします。

【引用文献】

- [1] Barlund, C. S., Carruthers, T. D., Waldner, C. L. and Palmer, C. W. 2008. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology*. 69: 714-723.
- [2] Braw-Tal, R. and Roth, Z. 2005. Gene expression for LH receptor, 17 α -hydroxylase and StAR in the theca interna of preantral and early antral follicles in the bovine ovary. *Reproduction*. 129: 453-461.

- [3] 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.
- [4] Caraty, A., Smith, J. T., Lomet, D., Ben Saïd, S., Morrissey, A., Cognie, J., Doughton, B., Baril, G., Briant, C. and Clarke, I. J. 2007. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology*. 148: 5258-5267.
- [5] Carneiro, L. C., Ferreira, A. F., Padua, M., Saut, J. P., Ferraudo, A. S. and dos Santos, R. M. 2014. Incidence of subclinical endometritis and its effects on reproductive performance of crossbred dairy cows. *Trop. Anim. Health. Prod.* 46: 1435-1439.
- [6] Cheong, S. H., Sá Filho, O. G., Absalon-Medina, V. A., Schneider, A., Butler, W. R. and Gilbert, R. O. 2017. Uterine and systemic inflammation influences ovarian follicular function in postpartum dairy cows. *PLoS One*. 12: e0177356.
- [7] Drillich, M. and Wagener, K. 2018. Pathogenesis of uterine diseases in dairy cattle and implications for fertility. *Anim. Reprod.* 15: 879-885.
- [8] Giuliadori, M. J., Magnasco, R. P., Becu-Villalobos, D., Lacau-Mengido, I. M., Risco, C. A. and de la Sota, R. L. 2013. Clinical endometritis in an Argentinean herd of dairy cows: Risk factors and reproductive efficiency. *J. Dairy. Sci.* 96: 210-218.
- [9] Harter, C. J. L., Kavanagh, G. S. and Smith, J. T. 2018. The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism. *J. Endocrinol.* 238: R173-R183.
- [10] 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.
- [11] Isobe, N. 2007. Follicular cysts in dairy cows. *Anim. Sci. J.* 78: 1-6.
- [12] Isobe, N. and Yoshimura, Y. 2007. Deficient proliferation and apoptosis in the granulosa and theca Interna cells of the bovine cystic follicle. *J. Reprod. Dev.* 53: 1119-1124.
- [13] 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.
- [14] Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S. and Johnson, Walter. H. 2005. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can. Vet. J.* 46: 255-259.
- [15] Kawasaki, T. and Kawai, T. 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* 5: 1-8.
- [16] Kawashima, I., Umehara, T., Noma, N., Kawai, T., Shitanaka, M., Richards, J. S. and Shimada, M. 2014. Targeted disruption of Nrg1 in granulosa cells alters the temporal progression of oocyte maturation. *Mol. Endocrinol.* 28: 706-721.
- [17] 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.
- [18] LaVoie, H. A. and King, S. R. 2009. Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Exp. Biol. Med.* 234: 880-907.
- [19] Luo, W. and Wiltbank, M. C. 2006. Distinct regulation by steroids of messenger RNAs for FSHR and CYP19A1 in bovine granulosa cells. *Biol. Reprod.* 75: 217-225.
- [20] Lyimo, Z. C., Nielen, M., Ouweltjes, W., Kruip, T. A. M. and van Eerdenburg, F. J. C. M. 2000. Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle. *Theriogenology*. 53: 1783-1795.
- [21] Magata, F., Horiuchi, M., Echizenya, R., Miura, R., Chiba, S., Matsui, M., Miyamoto, A., Kobayashi, Y. and Shimizu, T. 2014. Lipopolysaccharide in ovarian follicular fluid influences the steroid production in large follicles of dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 144: 6-13.
- [22] Mann, G. and Lamming, G. 1999. The Influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 34: 269-274.
- [23] 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.
- [24] Noma, N., Kawashima, I., Fan, H.-Y., Fujita, Y., Kawai, T., Tomoda, Y., Mihara, T., Richards, J. S. and Shimada, M. 2011. LH-Induced neuregulin 1 (NRG1) type III transcripts control granulosa cell differentiation and oocyte maturation. *Mol. Endocrinol.* 25: 104-116.
- [25] Park, J.-Y., Su, Y.-Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S.-L. C. and Conti, M. 2004. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle.

- Science. 303: 682-684.
- [26] Pascal, N., Olivier Basole, K., Claire d'Andre, H. and Bockline Omedo, B. 2021. Risk factors associated with endometritis in zero-grazed dairy cows on smallholder farms in Rwanda. *Prev. Vet. Med.* 188: 105252.
- [27] 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.
- [28] Price, J. C. and Sheldon, I. M. 2013. Granulosa cells from emerged antral follicles of the bovine ovary initiate inflammation in response to bacterial pathogen-associated molecular patterns via toll-like receptor pathways. *Biol. Reprod.* 89: 119, 1-12.
- [29] Prunner, I., Pothmann, H., Wagener, K., Giuliadori, M., Huber, J., Ehling-Schulz, M. and Drillich, M. 2014. Dynamics of bacteriologic and cytologic changes in the uterus of postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 82: 1316-1322.
- [30] 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.
- [31] Sheldon, I. M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G. and Schuberth, H.-J. 2009. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol. Reprod.* 81: 1025-1032.
- [32] Sheldon, I. M., Williams, E. J., Miller, A. N. A., Nash, D. M. and Herath, S. 2008. Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet. J.* 176: 115-121.
- [33] Sheldon, I. M. and Dobson, H. 2004. Postpartum uterine health in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 295-306.
- [34] Smith, J. T., Li, Q., Pereira, A. and Clarke, I. J. 2009. Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*. 150: 5530-5538.
- [35] Tisdall, D. J., Watanabe, K., Hudson, N. L., Smith, P. and McNatty, K. P. 1995. FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. *J. Mol. Endocrinol.* 15: 273-281.
- [36] van Tol, H. T. A., van Eijk, M. J. T., Mummery, C. L., van Den Hurk, R. and Bevers, M. M. 1996. Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. *Mol. Reprod. Dev.* 45: 218-224.
- [37] Tsousis, G., Sharifi, R. and Hoedemaker, M. 2009. Associations between the clinical signs of chronic endometritis with ovarian cysts and body condition loss in German Holstein Friesian cows. *J. Vet. Sci.* 10: 337-341.
- [38] Voelz, B. E., Rocha, L., Scortegagna, F., Stevenson, J. S. and Mendonça, L. G. D. 2018. Response of lactating dairy cows with or without purulent vaginal discharge to gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F2 α . *J. Anim. Sci.* 96: 56-65.
- [39] Wang, X. and Quinn, P. J. 2010. Endotoxins: lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. *Subcell. Biochem.* 53: 3-25.
- [40] 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.
- [41] Williams, E. J., Sibley, K., Miller, A. N., Lane, E. A., Fishwick, J., Nash, D. M., Herath, S., England, G. C., Dobson, H. and Sheldon, I. M. 2008. The effect of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha on ovarian function. *Am. J. Reprod. Immunol.* 60: 462-473.
- [42] Xie, Y., Zhang, K., Zhang, K., Zhang, J., Wang, L., Wang, X., Hu, X., Liang, Z. and Li, J. 2020. Toll-like receptors and high mobility group box 1 in granulosa cells during bovine follicle maturation. *J. Cell. Physiol.* 235: 3447-3462.
- [43] Yamamoto, N., Nishimura, R., Gunji, Y. and Hishinuma, M. 2020. Research of postpartum endometritis in Japanese Black cattle with cystic ovarian disease by vaginal mucus test and endometrial cytology. *Arch. Anim. Breed.* 63: 1-8.
- [44] Yamamoto, N., Nishimura, R., Yamashita, Y., Morita, T., Kawase, J. and Nagano, M. 2022. Comparative study on the relationship between cytobrush cytology and histopathological examinations on endometrium of slaughtered cows without clinical symptom. *Jpn. J. Vet. Res.* 70: 91-102.
- [45] Yamamoto, N., Takeuchi, H., Yamaoka, M., Nakanishi, T., Tonai, S., Nishimura, R., Morita, T., Nagano, M., Kameda, S., Genda, K., Kawase, J. and Yamashita, Y. 2023. Lipopolysaccharide (LPS) suppresses follicle development marker expression and enhances cytokine expressions, which results in fail to granulosa cell proliferation in developing follicle in cows. *Reprod. Biol.* 23: 100710.
- [46] 山岸修一 2012. 乳牛の分娩間隔延長に伴う損失

額. 畜産の研究 . 66: 421-425.

Relationship between endometritis and ovarian dysfunction induced by bacterial infection in the peripartum period in cows

Naoki Yamamoto¹⁾, Masashi Nagano²⁾, Yasuhisa Yamashita^{3)†}

¹⁾ Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Okayama University of Science 1-3 Ikoinooka, Imabari, Ehime, 794-8555

²⁾ Laboratory of Animal Reproduction, Department of Animal Science, School of Veterinary Medicine, Kitasato University 35-1 Higashi-23, Towada, Aomori 034-8628

³⁾ Laboratory of Animal Reproductive Physiology, Department of Bioresource Sciences, Prefectural University of Hiroshima 5562 Nanatsuka-cho, Shobara, Hiroshima 727-0023

† Correspondence to: Yasuhisa Yamashita
Tel: +81 824 74 1751
E-mail: yamayas@pu-hiroshima.ac.jp

[Abstract]

Endometritis and ovarian dysfunction are major reproductive diseases in cows that often occur concurrently, resulting in extension of the open period. In a previous study, we confirmed that cytobrush cytology, based on the percentage of polymorphonuclear neutrophils (PMN), can diagnose endometritis in the acute phase, as PMNs primarily infiltrate into the surface of the endometrium. In another study using cytobrush cytology to diagnose endometritis, Japanese Black cattle with cystic ovarian disease showed a potential association with endometritis at 40–60 days postpartum compared to the normal ovarian cycle. Lipopolysaccharides (LPS) produced by Gram-negative bacteria are recognized via toll-like receptor 4 (TLR4), leading to an inflammatory response through the generation of cytokines such as tumor necrosis factor- α and interleukins. We found that TLR4 is expressed in granulosa cells collected from developing follicles. LPS derived from uteri with endometritis due to postpartum infection suppressed the functions of granulosa cells, leading to ovarian dysfunction such as cystic ovarian disease, ovarian quiescence, and ovulation failure. Prevention of uterine infection through proper management and early detection of endometritis using cytobrush cytology is crucial for enhancing fertility in cows. Elucidating the role of LPS may prove effective in future treatments.

Keywords: Diagnosis of endometritis, Ovarian cyst, ovarian quiescence, Subclinical endometritis