

総説

## ウシ炎症性子宮疾患における生殖機能および免疫応答 －エンドトキシンの即時的影響とキャリアオーバー効果－

真方文絵<sup>1)</sup>、清水 隆<sup>2)</sup>

1) 全国農業協同組合連合会 ET 研究所 研究開発室

2) 帯広畜産大学 生命・食料科学研究部門 生命科学分野

連絡担当者：真方文絵

〒080-1407 北海道河東郡上士幌町字上音更西6線331-11

Tel : 01564-2-5811 Fax : 01564-2-5813

Email : magata.fumie@gmail.com

### 【要約】

ウシ炎症性子宮疾患による繁殖障害の発生機序を明らかにするため、グラム陰性細菌が放出するエンドトキシン（リポポリサッカライド：LPS）が生殖機能および免疫応答に及ぼす即時的影響とキャリアオーバー効果について検証した。炎症性子宮疾患に罹患した乳牛では、血中LPS濃度は分娩後長期にわたり健康牛よりも高値で推移した。また、子宮の炎症度合とは関係なく卵胞液中からLPSが検出され、卵胞へのLPS移行・蓄積の可能性が考えられた。LPS濃度が高い卵胞ではエストラジオール産生が低下しており、卵胞液中のLPSが卵胞の機能を抑制する可能性が示された。卵母細胞に及ぼすLPSの影響について検証したところ、LPSは卵母細胞の核成熟を阻害するとともに、ミトコンドリアの機能を低下させることが明らかとなった。LPSの存在下で成熟した卵母細胞では胚盤胞期胚への発生率が低下し、胚盤胞を構成する栄養膜細胞の細胞数が減少していた。続いて免疫応答に及ぼす炎症性子宮疾患の影響について検証したところ、子宮炎罹患牛では治療後も長期にわたりリンパ球数の上昇が認められ、さらに好中球の活性酸素産生能が高値を示した。以上の結果から、分娩後早期に炎症性子宮疾患に罹患したウシではLPSが卵巣へと移行し、卵胞発育および卵子の胚発生能を低下させるとともに（即時的影響）、LPSに惹起された全身における免疫応答の長期的な変化および卵胞へのLPS蓄積（キャリアオーバー効果）が生じる可能性が考えられた。

**キーワード：**炎症性子宮疾患、エンドトキシン、生殖機能、乳牛、免疫応答

### 【緒論】

炎症性子宮疾患に起因する雌家畜の繁殖機能低下は、我が国の家畜生産を阻害する重要な問題として取り上げられるようになったが、炎症性子宮疾患がどのような機序を介して繁殖機能、特に卵巣機能を低下させるのかについては

明らかではない。卵巣機能には卵胞発育に伴うステロイドホルモン産生や免疫細胞の関与など複雑な機構が関連するが、炎症性子宮疾患による卵巣機能低下をこれらの機構と関連付けて解析した研究は極めて少ない。本研究では、炎症性子宮疾患の起因菌であるグラム陰性細菌が放出するエンドトキシン（リポポリサッカライド：LPS）に着目し、LPSが生殖機能および免疫応答に及ぼす即時的影響とキャリアオーバー効果

受理：2017年10月11日

について検証した。

### 【炎症性子宮疾患と細菌感染】

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 [20]。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%となる。*Escherichia coli* (*E. coli*) および *Trueperella 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* などの嫌気性細菌が高い頻度で検出される [3, 6, 9, 19, 24]。食肉処理場において子宮の炎症の程度と子宮内感染細菌との関連性を調べた我々の研究では、子宮内膜の充血および糜爛などの炎症兆候が認められた子宮では、炎症の認められなかった子宮と比較して細菌の検出率が有意に高かった。また、膿性の貯留液が認められた子宮における細菌検出率は貯留液なしの子宮よりも有意に高く、さらに炎症性子宮疾患の原因菌となる病原性細菌の割合が有意に高いことが明らかになった。最も検出率の高かった細菌は *E. coli* であり、続いて *Pasteurella* 属や *Acinetobacter* 属といった病原性の高い細菌が多く検出された。このように、乳牛の炎症性子宮疾患において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は異なる。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おり [19, 23]、*E. coli* は炎症性子宮疾患による卵巣機能障害の発生機序を解明する上で重要な細菌であるといえる。

### 【炎症性子宮疾患とエンドトキシン】

我々は *E. coli* を含むグラム陰性細菌の産生するエンドトキシンである LPS に着目し、卵巣機能に及ぼす影響について検証を行ってきた。炎症性子宮疾患に罹患したウシにおける末梢血中 LPS 濃度の推移を分娩前2週から分娩後6週まで経時的に測定したところ、子宮炎を発症した乳牛の血中 LPS 濃度は、分娩直後から分娩後3.5週まで健康牛と比較して有意に高い値で推移した (図1, [16])。また、食肉処理場において子宮の炎症が認められるウシの卵巣を採取し、卵胞液中の LPS 濃度を測定したところ、血中よりも高い濃度の LPS が検出された [12]。過去の報告において、重度の子宮内膜炎では我々の研究よりもさらに高濃度の LPS が検出されている [11]。これらの知見は、子宮から体循環に移行した LPS が卵胞へと到達し、卵巣機能に影響を及ぼす可能性を示唆している。

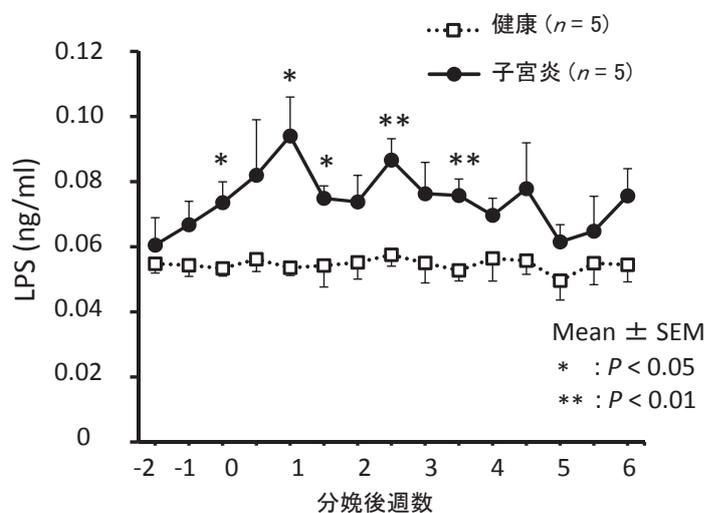


図1 健康牛と子宮炎牛における血中LPS濃度の推移

### 【卵巣機能に及ぼすエンドトキシンの影響】

卵胞液中の LPS 濃度と卵胞におけるステロイドホルモン産生との関連性を調べたところ、高濃度の LPS が存在する卵胞では、卵胞液中のエストラジオール濃度およびエストラジオール産生酵素の遺伝子発現が低下していた [12]。このことは、卵胞液中に存在する LPS が卵胞の機能に影響を及ぼす可能性を示している。さらに LPS を添加した培地を用いて卵胞を構成する卵胞膜細胞と顆粒層細胞の体外培養を行ったところ、LPS はウシ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の産生を抑制した [13, 21]。これらの知見より、LPS はステロイドホルモンの産生を低下させることによって、卵胞発育や排卵を阻害する可能性が示された。

続いて、卵胞内で起こる卵母細胞の成熟過程を模倣した体外成熟培養法を用いて、卵母細胞の成熟能および胚発生能に及ぼす LPS の影響について検証した [17]。その結果、LPS は第二減数分裂中期に進行する卵母細胞の数を減少させ、核成熟度を低下させた (表 1)。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 [7]。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、卵母細胞の成熟に伴ってその数や局在を大きく変化させる [22]。ミトコンドリアの数や機能における LPS の影響について検討したところ、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。続いて、ミトコンドリアの局在変化について検証したところ、LPS の存在下で成熟させた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である割合が高かったことから (図 2)、LPS は卵母細胞の成熟に伴うミトコンドリアの細胞質への移動を阻害する可能性が考えられた。卵母細胞の成熟に伴うミトコンドリアの拡散は、受精後に生じるカルシウムオシレーションにおいて重要な役割を果たすと考えられている。さらに、ミトコンドリア活性の指標として膜電位差を測定したところ、LPS 処理を行った卵母細胞ではミトコンドリアの膜電位差が低下していた (図 3)。ミトコンドリアの膜電位差は ATP の合成と輸送に必要不可欠であることから、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た。そこで、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胚発生能の検証を行ったところ、胚盤胞期胚への発生率が低下した (表 2)。さらに、LPS 存在下で成熟した卵母細胞に由来する胚盤胞期胚を構成する栄養膜細胞の細胞数は有意に減少していた。ウシにおいて、胎盤へと分化する栄養膜細胞は妊娠認識に重要な役割を果たすインターフェロン  $\tau$  を産生し、着床に向けての準備を整えると考えられている。そのため栄養膜細胞の数が減少することでインターフェロン  $\tau$  の産生が低下し、着床が起こりにくくなる可能性が推察された。このような LPS による卵母細胞の成熟阻害は、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という現

表 1 卵母細胞の核成熟能に及ぼす LPS の影響

LPS ( $\mu\text{g/ml}$ )	供試卵子数	成熟卵子数 <sup>a)</sup> (%)
0	384	326 (84.9)
0.001	104	82 (78.8)
0.01	106	79 (74.5)*
0.1	103	76 (73.8)*
1	107	73 (68.2)**
10	146	87 (59.6)**

a) 第2減数分裂中期像を呈した卵子数

\*: 対照区と比較して有意差あり ( $P < 0.05$ )

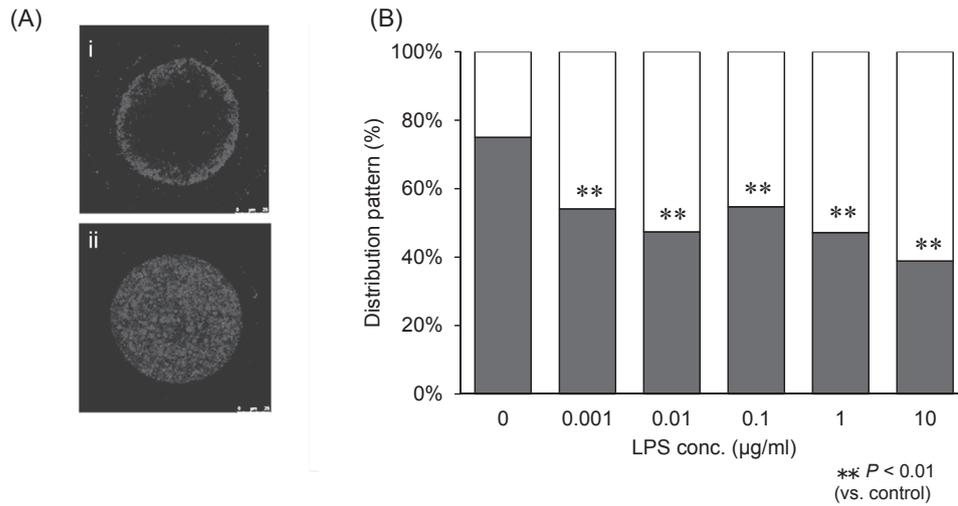


図2 卵母細胞のミトコンドリア局在に及ぼすLPSの影響  
(A-i) 辺縁に局在、(A-ii) 全体に拡散、(B) LPS添加による影響

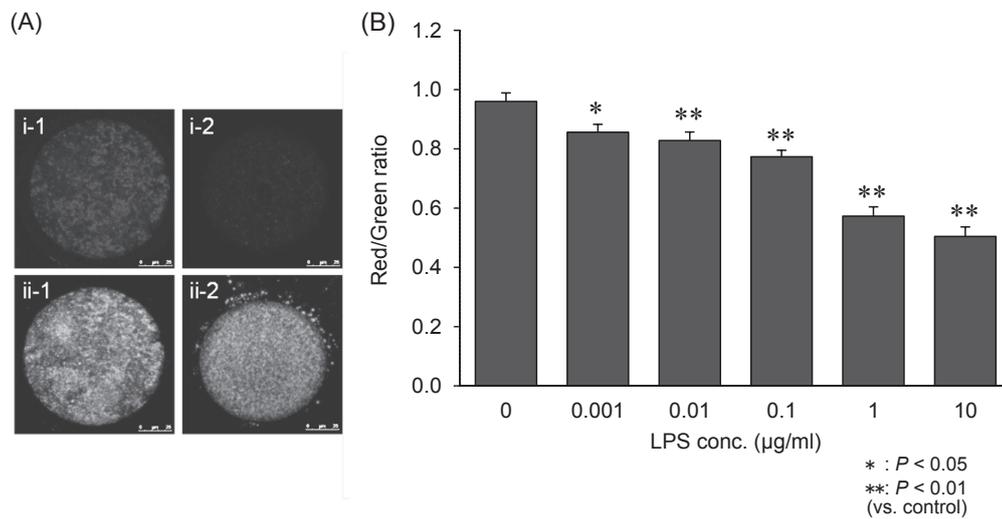


図3 卵母細胞のミトコンドリア膜電位差に及ぼすLPSの影響  
(A) 膜電位差が高い (i-1, ii-1) および低い (i-2, ii-2) ミトコンドリアを持つ卵子  
(B) LPS添加による影響

表2 卵母細胞の胚発生能に及ぼすLPSの影響

LPS (μg/ml)	供試卵子数	分割胚数 <sup>a)</sup> (%)	胚盤胞数 <sup>b)</sup> (%)
0	617	465 (75.4)	162 (34.8)
0.001	149	107 (71.8)	23 (21.5)*
0.01	138	100 (72.5)	22 (22.0)*
0.1	112	85 (75.9)	14 (16.5)*
1	222	158 (71.2)	35 (23.6)*
10	232	163 (70.3)	40 (24.5)*

a) 媒精後48時間に観察した2細胞期以上の胚数

b) Day 8 (媒精日 = Day 0) に発生した胚盤胞数

\*: 対照区 (0μg/ml) と比較して有意差あり (P<0.05)

象を説明できるかもしれない。つまり、卵胞内に存在する LPS は卵胞構成細胞の機能を阻害するだけでなく卵母細胞の質を低下させることで、乳牛の受胎率低下の要因の一つとなっている可能性が考えられた。

### 【炎症性子宮疾患の即時的影響と キャリアオーバー効果】

炎症性子宮疾患による繁殖障害の発生要因として感染時の即時的影響の他に、治癒後も長期にわたり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考えられる。炎症性子宮疾患に罹患したウシで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受胎性が低下することが報告されている [4]。さらに、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が報告されている [8]。これらの報告は、炎症性子宮疾患の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。そこで、炎症性子宮疾患におけるキャリアオーバー効果の発生機序を明らかにするために、LPS の蓄積という観点から研究を行ってきた。

最初に着目したのが、子宮から体循環に移行した LPS による免疫応答への影響である。前述したように、分娩後早期に子宮炎を発症した乳牛の血中 LPS 濃度は、子宮の炎症が消失し

た後も継続的に高値を示した。この血液中への LPS 蓄積により、全身の免疫応答が継続的に影響を受ける可能性が考えられる。そこで、炎症性子宮疾患罹患牛における免疫応答の変化を経時的に解析したところ、子宮炎に罹患したウシでは白血球のうちリンパ球数が分娩後長期にわたり高い値で推移し、この現象は分娩後 8 週まで継続した (図 4, [15])。さらにリンパ球のうち、ウイルス感染細胞などの除去を行う CD8 陽性のキラー T 細胞の割合が子宮炎罹患牛で高値を示し、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) の値は分娩後 8 週まで継続的に低値を示した [15]。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おり、CD8 陽性細胞の割合が高いウシでは空胎日数が延長することが報告されている [2]。また好中球の活性酸素産生能を測定したところ、子宮炎罹患牛では分娩後 7 週まで継続的に高値を示した (図 5, [16])。興味深いことに、この好中球活性酸素産生能は健康な牛から採取した血液においても、子宮炎罹患牛の血中 LPS 濃度と同レベルである 1EU/ml の LPS 処理により有意に増加することが明らかとなった。つまり、子宮炎罹患牛の血液中に存在する LPS が継続的に全身の免疫応答を刺激し、好中球の活性酸素産生を促進していた可能性が考えられる。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

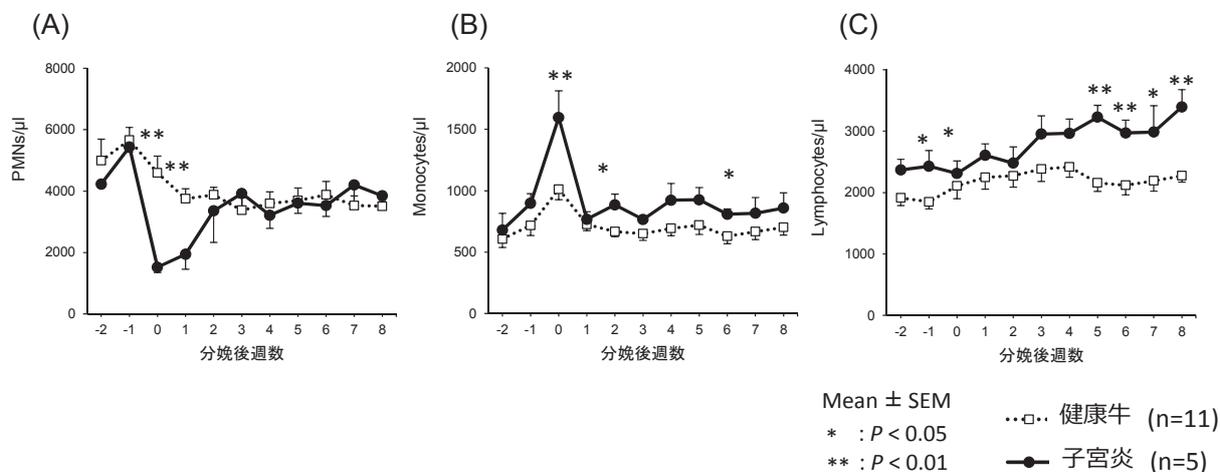


図4 健康牛と子宮炎牛における白血球数の経時的変化  
(A) 好中球、(B) 単球、(C) リンパ球

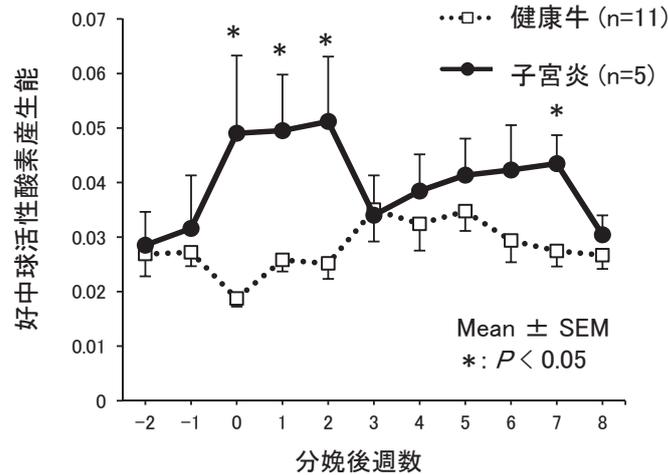


図5 健康牛と子宮炎牛における好中球活性酸素産生能の経時的変化

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 [18]。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を減少させるとともに、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。これらの解析に用いた子宮炎罹患牛は、メトリチェックを用いた膈内粘液の評価により分娩後5週までに子宮の炎症が消失したことを確認している。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された。

卵胞液におけるLPS蓄積もキャリアオーバー効果の一因となっている可能性が高い。子宮の炎症と卵胞へのLPS移行との関連性を調べるために、食肉処理場にて採取した子宮および卵巣を用いて子宮の炎症度合と卵胞液中LPS濃度との関連性を調べたところ、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濃度との間に関連性は認められなかった。炎症性子宮疾患以外に血中にLPSが認められる疾患として、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が [10]、我々が解析に使用したウシでは乳房炎やルーメン異常の症状が認められなかった。つまり、子宮の炎症度合の進行に関係なく卵胞液中にLPSが存在するということである。卵胞へのLPS蓄積の可能性について検証するため、

一症例ではあるが、自然発生の子宮炎における血中、子宮内貯留液中および卵胞液中のLPS濃度を測定・比較したところ、7個の卵胞のうち1個において、血液および子宮内貯留液よりも高濃度のLPSが検出された (表3、[14])。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たところ、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個の卵胞の卵胞液中にだけ他の卵胞の10倍以上という高濃度の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。

LPSによるキャリアオーバー効果を明らかにするためには、卵巣内で長期間にわたりLPSの影響を受けながら発育する原始卵胞への影響についての検証が必須である。胎子期に形成される原始卵胞は、活性化開始から約180日で成熟卵胞となり排卵へと至る。そのため、分娩後早期に炎症性子宮疾患に罹患したウシでは、原始卵胞が数ヶ月かけて排卵卵胞へと発育する間に卵巣へと移行したLPSに曝露される可能性が考えられる。Bromfieldらは、ウシ原始卵胞を含む卵巣組織片をLPS含有培地にて6日間培養すると、原始卵胞から一次卵胞への活性化が異常亢進したと報告している [5]。同様の現

表3 子宮炎罹患牛におけるLPS濃度の分布

	卵胞位置 <sup>a)</sup>	卵胞直径 (mm)	E/P比 <sup>b)</sup>	LPS (EU/ml)
血漿	-	-	-	0.94
子宮内貯留液	-	-	-	6.34
卵胞1	LO	10.5	0.26	0.97
卵胞2	LO	7.9	0.05	12.40
卵胞3	LO	7.9	0.03	0.62
卵胞4	RO	12.1	0.32	0.87
卵胞5	RO	8.9	0.06	0.70
卵胞6	RO	6.3	0.02	0.71
卵胞7	RO	7.2	0.01	0.64

a) LO;右卵巣, RO;左卵巣

b) 卵胞液中エストラジオールおよびプロゲステロン濃度の比

象はマウスでも認められ、LPSを投与したマウスの卵巣では原始卵胞数が減少し、閉鎖卵胞数が増加した [5]。これらの知見は動物種にかかわらず原始卵胞がLPSの影響を受ける可能性を示しているが、LPSの曝露により発育誘導された一次卵胞に含有される卵母細胞への影響についてはさらなる検証が必要である。

#### 【予防の重要性】

本研究で対象とした炎症性子宮疾患罹患牛では血中NEFAおよび3HBの値が分娩前3週から継続的に健康牛よりも有意に高値を示しており、肝機能が低下していたことが推察される。肝臓はLPS代謝のための主要な器官であり、LPSを静脈内投与した場合に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、脂肪肝の乳牛ではLPSの消失が全く起らず、死亡する個体があったことが報告されている [1]。つまり、移行期の栄養状態低下により肝機能障害が生じると、子宮で発生したLPSを代謝することができずに血中および卵胞液中に蓄積し、長期間にわたって生殖機能を低下させる可能性がある。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である。

#### 【まとめ】

本研究では、乳牛の炎症性子宮疾患における繁殖機能低下の発生機序を解明するために、*E. coli*が産生するエンドトキシンであるLPSを取り上げ、生殖機能および免疫応答に及ぼす

LPS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。その結果、分娩後早期に炎症性子宮疾患に罹患したウシではLPSが卵巣へと移行し、卵胞発育および卵子の胚発生能を低下させるとともに（即時的影響）、全身における免疫応答の長期的な変化および卵胞へのLPS蓄積（キャリアオーバー効果）が生じる可能性が考えられた。これらの知見が、疾病予防に対する啓蒙活動の一助となることを期待している。

#### 【参考文献】

- [1] Andersen, PH., Jarløv, N., Hesselholt, M. and Baek, L. 1996. Studies on in vivo endotoxin plasma disappearance times in cattle. J. Vet. Med. Ser. A. 43: 1-10.
- [2] Banos, G., Wall, E., Coffey, MP., Bagnall, A., Gillespie, S., Russell, GC. and McNeilly, TN. 2013. Identification of immune traits correlated with dairy cow health, reproduction and productivity. PLoS One. 8: e65766.
- [3] Bonnett, BN., Martin, SW., Gannon, VP., Miller, RB. and Etherington, WG. 1991. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. Can. J. Vet. Res. 55: 168-173.
- [4] Borsberry, S. and Dobson, H. 1989. Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds. Vet. Rec. 124: 217-219.
- [5] Bromfield, JJ. and Sheldon, IM. 2013. Lipopolysaccharide reduces the primordial follicle pool in the bovine ovarian cortex ex vivo and in the murine ovary in vivo. Biol. Reprod. 88: 1-9.

- [6] Elliott, L., McMahon, KJ., Gier, HT. and Marion, GB. 1968. Uterus of the cow after parturition: bacterial content. *Am. J. Vet. Res.* 29: 77–81.
- [7] Eppig, JJ. 1996. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 8: 485–489.
- [8] Green, MP., Ledgard, AM., Beaumont, SE., Berg, MC., McNatty, KP., Peterson, AJ. and Back, PJ. 2011. Long-term alteration of follicular steroid concentrations in relation to subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *J. Anim. Sci.* 89: 3551–3560.
- [9] Griffin, JF., Hartigan, PJ. and Nunn, WR. 1974. Non-specific uterine infection and bovine fertility. I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks post-partum. *Theriogenology.* 1: 91–106.
- [10] 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.
- [11] Herath, S., Williams, EJ., Lilly, ST., Gilbert, RO., Dobson, H., Bryant, CE. and Sheldon, IM. 2007. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction.* 134: 683–693.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Magata, F., Ishida, Y., Miyamoto, A., Furuoka, H., Inokuma, H. and Shimizu, T. 2014. Comparison of Bacterial Endotoxin Lipopolysaccharide Concentrations in the Blood, Ovarian Follicular Fluid and Uterine Fluid: A Clinical Case of Bovine Metritis. *J. Vet. Med. Sci.* 77: 81–84.
- [15] Magata, F., Kitaoka, R., Morino, I., Teramura, M., Kawashima, C., Haneda, S. and Shimizu, T. 2016. Long-term impact of puerperal metritis on the profiles of peripheral blood leukocytes in peripartum dairy cows. *Anim. Sci. J.* 87: 151–155.
- [16] Magata, F., Morino, I., Teramura, M., Tsunoda, E., Kawashima, C., Haneda, S., Miyamoto, A., Kida, K. and Shimizu, T. 2017. Impact of metritis on the generation of reactive oxygen species by circulating phagocytes and plasma lipopolysaccharide concentration in peripartum dairy cows. *Anim. Sci. J.* 88: 248–253.
- [17] Magata, F. and Shimizu, T. 2017. Effect of lipopolysaccharide on developmental competence of oocytes. *Reprod Toxicol.* 71: 1–7.
- [18] Shawcross, DL., Shabbir, SS., Taylor, NJ. and Hughes, RD. 2010. Ammonia and the neutrophil in the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology.* 51: 1062–1069.
- [19] Sheldon, IM., Noakes, DE., Rycroft, AN., Pfeiffer, DU. 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.
- [20] Sheldon, IM., Rycroft, AN. and Zhou, C. 2004. Association between postpartum pyrexia and uterine bacterial infection in dairy cattle. *Vet. Rec.* 154: 289–293.
- [21] 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. In Vitro.* 26: 1134–1142.
- [22] Thouas, GA., Trounson, AO., Wolvetang, EJ. and Jones, GM. 2004. Mitochondrial dysfunction in mouse oocytes results in preimplantation embryo arrest in vitro. *Biol. Reprod.* 71: 1936–1942.
- [23] Williams, EJ., Fischer, DP., Naokes, DE., England, GCW., Rycroft, A., Dobson, H. and Sheldon, IM. 2007. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology.* 68: 549–559.
- [24] Williams, EJ., Fischer, DP., Pfeiffer, DU., England, GCW., Naokes, DE., Dobson, H. and Sheldon, IM. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology.* 63: 102–117.

## The negative impact of uterine inflammation on the ovarian function and immune response in dairy cows : Immediate and carry-over effect of endotoxin

Fumie Magata<sup>1)</sup>, Takashi Shimizu<sup>2)</sup>

1) Research and Development Room, Zennoh Embryo Transfer Center

2) Department of Life and Food Sciences, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

Correspondence: Fumie Magata

Research and Development Group, Zen-noh Embryo Transfer Center

331-11 Kamishihoro, Hokkaido 0801407, Japan

Tel: +81 1564 2 5811, Fax: +81 1564 2 5813

E-mail: magata.fumie@gmail.com

### **[Abstract]**

The objective of the present study was to investigate the immediate and carry-over effect of bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS) on the ovarian function and immune response of cows with uterine inflammation. The cows with metritis had high plasma LPS concentrations compared to those in healthy cows until 6 weeks postpartum. LPS was also detected in follicular fluid of bovine ovaries, although the severity of uterine inflammation did not affect the concentration of LPS in follicular fluid. In follicles with a high level of LPS, the concentration of estradiol was low compared to follicles with a low level of LPS, suggesting that LPS present in follicular fluid inhibit follicular activity. LPS perturbed the nuclear maturation of oocytes by inhibiting meiotic progression. LPS inhibited the mitochondrial diffusion in cytoplasm and decreased mitochondrial membrane potential, indicating that LPS perturbed cytoplasmic maturation of oocytes. Oocytes matured under the LPS treatment showed decreased development to the blastocyst stage. In the immune response, the lymphocyte count and the proportion of CD8+ lymphocytes were higher in cows with metritis compared to healthy cows, which persisted weeks after the uterine inflammation had self-resolved. The increased generation of reactive oxygen species by circulating phagocytes was observed in cows with metritis. These findings highlight possible mechanisms whereby uterine inflammation inhibits ovarian functions: (1) the impaired follicular activity and the reduced developmental competence of oocytes caused by LPS present in the follicular fluid (immediate effect), and (2) the long-term alteration of immune response and the accumulation of LPS in follicular fluid (carry-over effect).

**Keywords:** Dairy cows, Endotoxin, Immune response, Ovarian function, Uterine inflammation