

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21372

研究課題名(和文) オゾンゲルを利用したウシ空胎日数短縮技術の開発

研究課題名(英文) Development of technique to decrease voluntary waiting period of cattle using ozone gel

研究代表者

木村 康二(Kimura, Koji)

岡山大学・環境生命科学学域・教授

研究者番号：50355070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ウシの妊空胎日数(分娩してから妊娠するまでの日数)は約1か月も増加しており、これを改善することが出来れば生産性向上に大きく貢献できるが具体的な対策は施されていない。分娩によって子宮は胎盤や胎膜の剥離により大きな物理的損傷と最近感染・炎症を生じる。これらからの早期回復を目的に本研究ではオゾンの分解を抑制したオゾンゲルのin vitroならびにin vivoの炎症抑制効果について検討した。子宮内膜間質細胞を用いた実験ではオゾンゲルの細胞培養液への添加はIL6遺伝子発現に影響をおよぼさなかった。さらにゲルの分娩後ウシ子宮内投与においてもその感染レベルに影響を与えなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

牛の妊孕性の低下は畜産農家の経営に打撃を与える喫緊に解決すべき問題である。妊孕性低下の一因として空胎期間の増加がある。分娩後ウシの子宮は物理的損傷および感染による炎症にさらされる。これらを防止し速やかな子宮回復が早期の妊孕性回復につながる。本研究では殺菌作用を有するオゾンゲルの子宮早期回復に対する効果を検討した。ウシ子宮内膜細胞を用いたin vitroの実験において炎症性サイトカインIL6の遺伝子発現にオゾンゲルは影響を与えず、ウシ子宮内投与実験においても炎症指標の改善が見られなかった。しかし、他の動物種の細胞において効果が認められていることから、濃度や投与方法を見直し再検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：In recent years, the voluntary waiting period (the number of days between parturition) in cows has increased by about one month, and no solutions against this issue has not been established, although it would greatly contribute to increased productivity. The uterus is subject to severe physical damage and infection, resulting in inflammation due to detachment of the placenta delivery. For prompt recovery from these injuries, the aims of this study was to investigate the in vitro and in vivo anti-inflammatory effects of ozone gel, which can maintain activity of ozone. In experiments using endometrial stromal cells, the addition of ozone gel to the cell culture medium did not affect IL6 gene expression. Furthermore, intrauterine administration of the gel into the uterus of postpartum cows did not affect the level of infection.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：オゾン 分娩間隔 子宮回復

1. 研究開始当初の背景

近年、ウシの妊孕性が年々低下し、農家経営の圧迫や畜産物の供給不足などを引き起こしている。統計によると平成に入ってから空胎日数(分娩してから妊娠するまでの日数)は約1か月も増加しており、これを改善することが出来れば生産性向上に大きく貢献できるが具体的な対策は施されていない。

2. 研究の目的

分娩によって子宮は胎盤や胎膜の剥離により大きな物理的損傷を受ける。さらに開口した子宮頸管から細菌が侵入し、感染・炎症を生じる。空胎期間は子宮内膜の修復ならびに感染からの離脱に要する時間であり、この延長はウシの妊孕性低下を引き起こす。重篤な子宮内膜炎を呈した場合、抗生物質投与による治療が一般的だが、抗生物質の多用は耐性菌の出現を招くため慎重使用が求められている。

抗生物質以外の殺菌能を有する物質としてオゾンが挙げられる。オゾンは強い酸化力と殺菌性を有し、分解が早く残留性はない。しかし同時に持続力がなく使用には限界がある。近年、このオゾンをオイルやグリセリン等に溶存させることによって分解を抑制・徐放させる製剤が開発されており(オゾンゲル)、この製剤の使用により患部の殺菌だけでなく、創傷の早期治癒効果が認められている。(Makita *et al.*, *Dentistry* 5, 339, 2015)

そこで本研究ではオゾンゲルを用いて、分娩後の子宮内膜感染防止と物理的損傷からの回復の両者を達成することにより、空胎日数短縮を図りウシの妊孕性を向上させることを目的としてその効果を *in vitro* ならびに *in vivo* で検証する。

3. 研究の方法

(1) オゾンゲルによる培養液中への過酸化水素放出量の測定

本研究で使用したオゾンゲルはオゾンをグリセリン中に溶存させたものであるが、グリセリンは浸透圧の関係から細胞に対して有害であり、細胞への添加実験を行う場合、オゾン添加濃度に制限がある。従って、本実験ではオゾンゲルを培養ウェル内にアガロースゲルによって閉じ込めることで細胞とオゾンゲルが直接接触合わないようにした。24穴プレートに2%アガロースを500 μ l分注し凝固後中央部分を約200 mm^3 くり抜いた。この穴に2000 ppmオゾンゲルあるいは100%グリセリンを250 μ l分注し、0.8%アガロースゲルを分注して包埋した。この上にDMEM/Ham's F12 phenol red freeを750 μ l分注し、24、48、72、96及び120時間後に培養液を500 μ lずつ回収した。この培養液のオゾンと水との反応で生じる過酸化水素量を測定した。測定方法としてHRP/OPDを用いた比色法とルミノール反応を用いた。

(2) ウシ子宮内膜間質細胞における増殖能に及ぼすオゾンゲルの影響

食肉センターから回収したウシ子宮からコラゲナーゼ処理によって子宮内膜間質細胞を採取した。この子宮内膜間質細胞を 1.0×10^5 cell/1 mlを24穴プレートの各ウェルに播種し、38.5、5% CO_2 条件下で60%コンフルエントになるまで培養した。60%コンフルエントに達した後20 mg/ml gentamicin及び0.1% Albumin, Bovine Serumを含むDMEM/Ham's F-12 phenol red freeで2回洗浄し、20 mg/ml gentamicin、0.1% Albumin, Bovine Serum、500 μ M ascorbic acid、2 μ g/ml insulin、オゾンゲル及びグリセリンを含むDMEM/Ham's F-12 phenol red freeを1 ml/wellで添加した。オゾン濃度0、2、20及び100 ppmになるようにオゾンゲルを添加、またはそれらと同じグリセリン濃度(0、0.1、1及び5%)を含む培養液を作製した。その後、同様の条件下で培養し、0、48及び96時間後にDNA assayを行い細胞増殖に対する影響を検討した。

(3) ウシ子宮内膜間質細胞におけるIL6 mRNA発現に及ぼすオゾンゲルの影響

子宮内膜間質細胞を 1.0×10^5 cell/mlに調整し、1 mlを24穴プレートの各ウェルに播種し、38.5、5% CO_2 条件下で60%コンフルエントになるまで培養した。60%コンフルエントに達した後20 mg/ml gentamicin及び0.1% Albumin, Bovine Serumを含むDMEM/Ham's F-12 phenol red freeで2回洗浄し、20 mg/ml gentamicin、0.1% Albumin, Bovine Serum、500 μ M ascorbic acid、2 μ g/ml insulin、オゾンゲル及びグリセリンを含むDMEM/Ham's F-12 phenol red freeを1 ml/wellで添加した。オゾン濃度0、2及び20 ppmとなるようにオゾンゲルを添加した(グリセリン濃度1%)培養液を作製した。その後同様の条件下で培養し、24時間毎に培地交換を行った。72時間後に細胞の一部を回収(処理前区)後、1 μ g/ml LPS (L6529, Sigma Aldrich)を添加(LPS感作区)、非添加(LPS未感作区)しさらに6時間培養後細胞を回収した。

回収した細胞はPBSで2度洗浄した後RNA抽出試薬を用いて細胞を回収し-80°Cで保存した。保存したサンプルからRNA抽出、cDNA合成を行った後定量的RT-PCRを行い、IL6の遺伝子発現量を測定した。

(4) ウシ子宮内へのオゾンゲル投与が子宮内感染におよぼす影響

黒毛和種雌牛のベ 11 頭を供試した(対照区 5 頭、投与区 6 頭)。分娩後 10 日の子宮内に人工授精器を用いてオゾンゲルまたはグリセリンを左右の子宮角へ各 15 mL ずつ投与した。投与時、投与後 10 日ごとに分娩後 50 日まで経時的に子宮粘液を採取し、そのスコアを記録した(メトリチェック)。同時にサイトブラシを用いて子宮内膜上皮細胞を採取し、細胞診によりその中に含まれる多形核白血球(PMN)の割合を測定した。

4. 研究成果

(1) オゾンゲルによる培養液中への過酸化水素放出量の測定

オゾンゲル及びグリセリンが培養液中に放出した過酸化水素の測定濃度を図 1 に示した。HRP-OPD を用いた比色測定法では実験開始から 120 時間後に H_2O_2 を検出できなかったが、ルミノール反応を利用した測定法では検出可能であったため、後者はより高感度な検出法であることが示された。HRP-OPD とルミノール反応を用いた両測定法でグリセリン区に比べオゾンゲル区で有意に H_2O_2 濃度が高かった ($p < 0.05$)。 H_2O_2 濃度は両測定法で時間依存的且つ一次関数的に減少した。また、全実験区で最も高かった H_2O_2 濃度は 1.37 mM で、オゾン濃度に換算すると 47.6 ppm であった。オゾンゲルを直接培養液に添加して、このオゾン濃度を達成する場合、それに含まれるグリセリン濃度は 2.5% となり、細胞に対する毒性は非常に制限されるため、アガロースゲルによる包埋を利用しなくともゲルを直接添加することでも問題ないと考えられた。従って以降の実験ではオゾンゲルを直接添加して用いることとした。

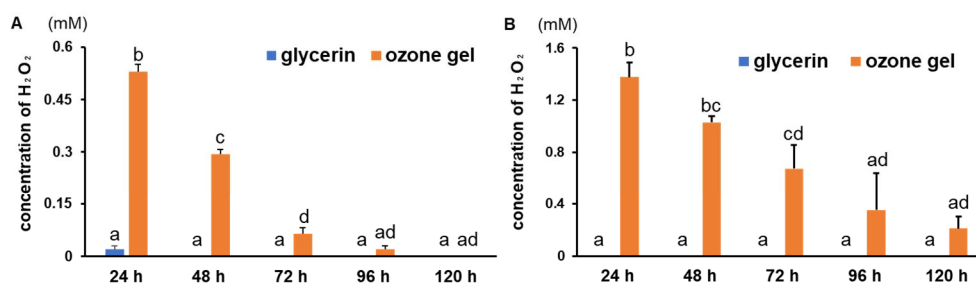


図 1. HRP/OPD (A) または luminol emission (B) 法により測定した培養液中の過酸化水素濃度

(2) ウシ子宮内膜間質細胞における増殖能に及ぼすオゾンゲルの影響

(1) の結果から、培養開始から 0、48 及び 96 時間で細胞を回収し、測定した DNA 量を図 2 に示した。全ての濃度におけるオゾンゲル区とグリセリン区の間で DNA 量に有意な差は見られなかった。また、培養開始から 48 時間においては全処理区間で DNA 量に有意な差は見られなかったが、96 時間においては 100 ppm オゾンゲル区及び 5% グリセリン区の DNA 量は他の全処理区に比べ有意に減少していた ($p < 0.05$)。

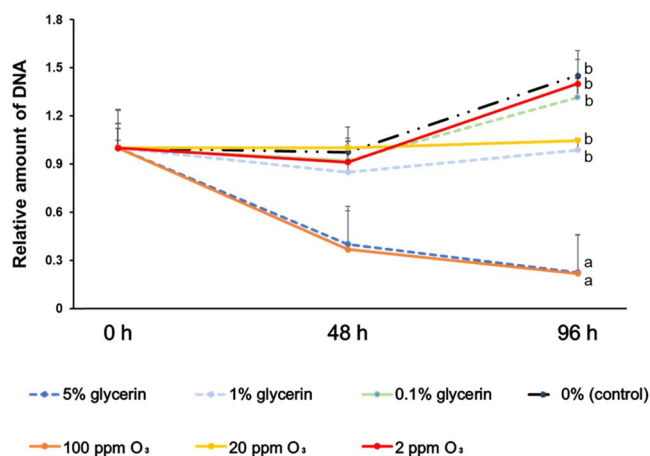


図 2. オゾンゲル存在下でのウシ子宮内膜間質細胞の増殖

(3) ウシ子宮内膜間質細胞における IL6 mRNA 発現に及ぼすオゾンゲルの影響

培養開始から 72 時間で細胞の一部を回収したものを処理前区、その後細胞に LPS を添加、非添加して 6 時間培養した後に回収したものをそれぞれ LPS 感作区、LPS 未感作区とし、各実験区における IL6 遺伝子発現量を図 3 に示した。処理前区における IL6 遺伝子発現量は全オゾンゲル濃度区で有意差は認められなかった(図 3 A)。LPS 感作区の IL6 遺伝子発現量は LPS 未感作区に比べ全オゾンゲル濃度区で有意な差が見られたが ($p < 0.05$)、LPS 感作区、未感作区共にオゾンゲル区と対照区間における IL6 の遺伝子発現量に有意な差は見られなかった(図 3 B)。

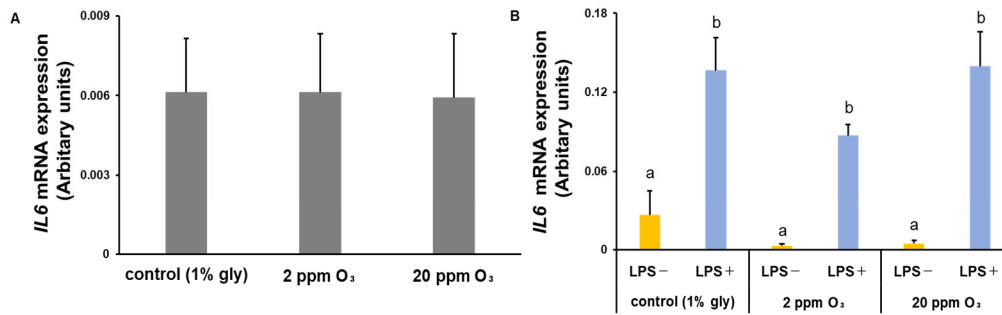


図3.LPS感作前 (A) および感作後 (B) のウシ子宮内膜間質細胞におけるIL6遺伝子発現

(4) ウシ子宮内へのオゾンゲル投与が子宮内感染におよぼす影響

ウシ子宮内へのオゾンゲル投与後のメトリスコアおよび多形核白血球数の変化を図4に示した。処理開始後、経時的にメトリスコア、PMN比率ともに減少した。しかしながらこれら指標におけるオゾンゲル投与の効果は見られなかった。

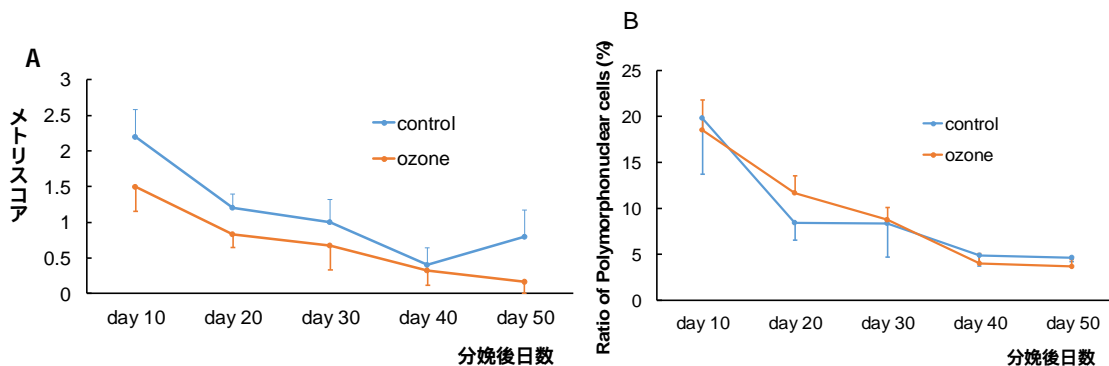


図4.ウシ子宮内へのオゾンゲル投与後のメトリスコア(A)および多形核白血球数(B)の経時的変動

(5) まとめ

オゾンゲルは他の動物種、細胞種では炎症抑制作用が認められ、早期の創傷治癒効果があると考えられている。しかしながら、本研究ではオゾンゲルにおける子宮内膜間質細胞ならびに分娩後子宮における顕著な炎症抑制作用は認められなかった。オゾン濃度および投与回数などを再検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松山 秀一 (Matsuyama Shuichi) (50455317)	名古屋大学・生命農学研究科・准教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関