

令和 6 年 9 月 25 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02362

研究課題名(和文)牛の子宮頸管熟化機構の解明と分娩後早期の一過性炎症惹起による子宮疾患制御

研究課題名(英文)Cervical ripening mechanism in cattle and control of uterine diseases by inducing transient inflammation in the early postpartum period

研究代表者

大澤 健司(Osawa, Takeshi)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：90302059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：牛の分娩事故予防には子宮頸管熟化の解明が必要である。本研究では、牛の分娩時における子宮頸管熟化と分娩後の産道内炎症反応の一端を明らかにすることを目的として、牛の妊娠後期から分娩までの子宮頸管組織と粘液を採取、炎症反応を観察した。その結果、頸管組織中のマクロファージは分娩6週前までに観察されるとともにI型コラーゲンの割合は分娩3週前以降に減少すること、および子宮頸管粘液では多くの炎症性サイトカインが分娩3週前以降に増加することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、分娩6週前より牛の子宮頸管組織中に浸潤するM1マクロファージがIL-6を産生することで頸管熟化が開始し、頸管粘液中のインターロイキン(IL)-1、IL-1、IL-8およびTNF濃度が増加すること、妊娠末期に増加したIL-8が多形核好中球を動員することで炎症が増強され、熟化が進むことが示唆された。以上より、子宮頸管粘液中サイトカインの動態が長期在胎や難産、頸管熟化不全の診断の一助となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Cervical ripening of the cervix must be clarified to prevent calving accidents in cows. In this study, we collected cervical tissue and mucus from cows from late pregnancy to parturition and observed inflammatory responses in order to clarify some aspects of cervical ripening during normal parturition in cows and inflammatory responses in the birth canal after parturition. The results showed that macrophages in the cervical tissue were observed by 6 weeks prepartum, the percentage of type I collagen decreased from 3 weeks prepartum, and various different inflammatory cytokines increased from 3 weeks prepartum in the cervical mucus of cows.

研究分野：獣医臨床繁殖学

キーワード：牛 繁殖 分娩 子宮頸管熟化 炎症性サイトカイン マクロファージ コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

難産は肉用牛の生産性を低下させる要因の中で最も重要なものの一つであり、大きな経済的損失をもたらす。難産は死産や新生子の死亡にも関連し、胎子死亡の約 70%は難産によるものである。生産者は日本全国で年間 110 億円以上の収入を失っていると推定されている。また、難産の原因は胎子の過成長や産道異常と密接な関係がある。最近、牛における産道異常が増加している。これは、妊娠期間の延長や胎子過大によるもので、子宮頸管の成熟が不十分なことも一因だと考えられる。

子宮頸管の成熟は、感染を伴わない局所的な炎症反応であり、炎症性サイトカインの産生を刺激するマクロファージの存在によって引き起こされると考えられている。マクロファージは血管に作用し、炎症細胞を遊走させ、細胞外マトリックスである I 型コラーゲンを分解し、その結果、子宮頸管を軟化させ、成熟させる。マクロファージの存在は、ヒトおよびマウスにおいて子宮頸管の成熟に重要であることが示唆されている。ヒトでは、陣痛中にマクロファージの浸潤が少なくとも 2 倍に増加し (Sakamoto *et al.*, 2005)、マウスでは子宮頸管マクロファージを人為的に減少させると子宮頸管熟化が進行しない (Yellon *et al.*, 2019)。ラットでは分娩が近づくにつれ、頸部組織において炎症性 M1 マクロファージが増加し、抗炎症性 M2 マクロファージが減少する (Jinying *et al.*, 2019)。さらに、様々な炎症性サイトカインが子宮頸管の成熟に関与している。ヒトでは、羊水中のインターロイキン (IL)-6、IL-8、腫瘍壊死因子 (TNF)- α などの炎症性サイトカインの濃度が分娩前に上昇し (Garcia-Velasco *et al.*, 1999; Keelan *et al.*, 1999, 2003; Young *et al.*, 2002)、子宮内の IL-1 β 、IL-6、IL-8 の増加が子宮頸管拡張過程に寄与している (Winkler *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2004)。モルモットでは、IL-8 を子宮頸部に直接塗布すると子宮頸部が軟化することが知られている (Chwalisz *et al.*, 1994)。またマウスでは、I 型コラーゲンの減少が子宮頸管の軟化と一致することが観察されている (Yan *et al.*, 2019)。

しかしながら、ウシの子宮頸管熟化過程は不明であり、妊娠後期から分娩にかけて子宮頸管組織への好中球浸潤と IL-8 発現の増加が報告されているのみである (Van Engelen *et al.*, 2009)。分娩前に子宮頸管から分泌される子宮頸管粘液のサイトカインと好中球浸潤の動態に関する報告はなく、また子宮頸管粘液は組織生検よりも採取が容易である。

一方、自然分娩後の子宮修復が正常な母牛では、一過性の生理的炎症が分娩後 2 週までに起こるとされているが、難産牛ではより強い炎症が起きていることが推測される。しかし、難産後の母牛における分娩後早期の産道内炎症の動態は解明されていない。

2. 研究の目的

そこで我々は、子宮頸管組織と共に子宮頸管粘液にも注目し、頸管組織における I 型コラーゲン、マクロファージ、IL-1 α 、1 β 、6、8、10、TNF- α の mRNA 発現の変化、妊娠後期から分娩までの頸管粘液における好中球浸潤と各種サイトカインの動態を観察し、牛の正常な頸管成熟メカニズムの一端を明らかにすること、および分娩助産の有無が分娩後早期の産道内炎症反応に及ぼす影響を明らかにする目的で一連の実験を実施した。

3. 研究の方法

(1) 供試動物

宮崎大学農学部附属住吉フィールドにて繋養の黒毛和種経産牛 82 頭を供試した。

(2) 材料採取

供試牛の妊娠 200、230、260 日、およびその後分娩まで 7 日間隔で子宮頸管粘液を、供試牛のうち 41 頭の妊娠 200、260、274、288 日 (すべて ± 3 日) およびその後分娩まで 7 日間隔で子宮頸管組織の生検サンプルを採取した (図 1)。

子宮頸管粘液は手を腔に挿入して少量 (10 g) を直接採取した。その一部から塗抹標本作製した後、炎症の指標として、Dubuc *et al.* (2010) の方法に従い、子宮頸管粘液中の PMN% (子宮内膜上皮細胞などの有核細胞全体に占める多形核好中球の割合) を鏡検下で算出した。残りの粘液サンプルは PBS に懸濁し、NanoDrop 分光光度計を用いてタンパク質濃度を測定した。さらに、各種サイトカイン濃度については、マルチパラメーター同時分析システム MAGPIX を用いて測定し、各サイトカイン濃度をタンパク質濃度で除した値を測定値とした。

頸管組織生検検体の 41 頭中 28 頭より採取したサンプルについて、ホルマリン固定、パラフィン包埋後、5 μ m の切片を作製し、ピクロシリウスレッド染色した。染標本を偏光顕微鏡で観察、I 型コラーゲン (赤から黄色) と III 型コラーゲン (緑色) の頸部組織における割合を ImageJ にて算出した。また、残りの 15 頭から採取したサンプルの切片標本において抗 Iba-1 抗体 (全マクロファージ)、抗 iNOS 抗体 (M1-マクロファージ)、抗 CD163 抗体 (M2-マクロファージ) を用いた多重蛍光免疫染色を行い、マクロファージ浸潤率を算出した。

子宮頸部組織と粘液から全 RNA を抽出し、妊娠 200 日目の IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α の mRNA 発現量他区間に対する比率を解析した。

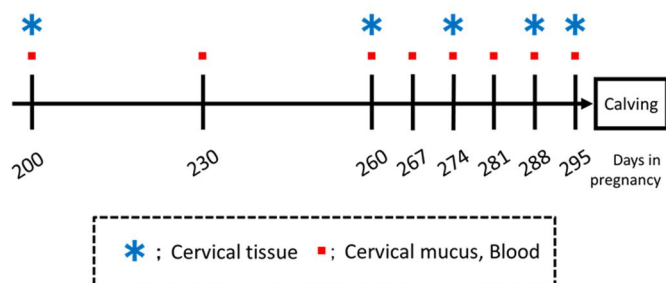


図 1 . 材料採取概要

4 . 研究成果

子宮頸部組織では、I 型コラーゲンは妊娠 274 日までに減少した (図 2)、マクロファージの浸潤は、分娩の 12~14 週前には観察されなかったが、分娩 5~6 週前には観察された (図 3)、Iba-1 と iNOS の発現部位には強い正の相関があった。さらに、子宮頸管組織における IL-6 mRNA の発現は分娩 3 週前に増加した (図 4)、子宮頸管粘液では、分娩週が近づくにつれて PMN%が増加した (図 5)、IL-1 α の mRNA 発現は分娩 3 週間前から分娩週にかけて増加し、IL-8 の mRNA 発現は分娩週 2~3 週間前から分娩週中にかけて増加した (図 6)、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-8 および TNF α 濃度は、分娩 12~14 週前と比較して、分娩 0~3 週前に増加した (図 7)。

本研究の結果、頸部組織に浸潤した M1 マクロファージが多量の IL-6 を産生することで、頸管熟化が分娩 5~6 週前から始まることが示唆された。さらに、炎症細胞は頸管粘液に浸潤し、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-8、TNF α 濃度は分娩に向けて上昇した。牛の子宮頸管組織における M1 マクロファージの浸潤と IL-6 mRNA の発現増加の時期から、頸管熟化の進行に伴い M1 マクロファージが IL-6 を中心とする炎症性サイトカインを産生することが示唆された。IL-6 はいわゆるサイトカインストームの重要な因子であり、局所的な炎症反応を引き起こすと考えられていることから、M1 マクロファージの存在が子宮頸管成熟の引き金になっている可能性がある。対照的に、頸管粘液中の IL-6 mRNA 発現には変化がなかったが、IL-1 α と IL-8 mRNA 発現には増加がみられた。これは頸管粘液中の炎症性サイトカイン濃度の変化と一致していた。特に IL-8 は mRNA 発現、タンパク質としてのサイトカイン濃度ともに顕著な増加を示した。子宮頸管粘液中の PMN%の増加も、子宮頸管粘液中の炎症反応が IL-8 の増加と、IL-8 によって動員された好中球によって引き起こされていることを示唆している。これらの炎症性サイトカインはまた、血管に作用して炎症細胞を組織に浸潤させ、さらなる炎症性サイトカインの産生を促進するのかもしれない。IL-6 は粘液中で変化しなかったため、M1 マクロファージは組織でのみ働くのであろう。炎症細胞とサイトカインは粘液とともに子宮頸管内腔に移動し、粘液中の炎症性サイトカイン、主に IL-8 を増加させ、好中球の移動を促進する。これらのサイトカインは子宮頸管組織に外的作用を及ぼし、I 型コラーゲンの減少に関与していることが示唆される。

結論として、分娩期における子宮頸管組織および粘液中の一連の炎症反応は牛の正常分娩において必要な生理的な機構であり、その中でも特に子宮頸管粘液中の IL-8 は、牛の分娩最終段階における局所炎症反応のバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

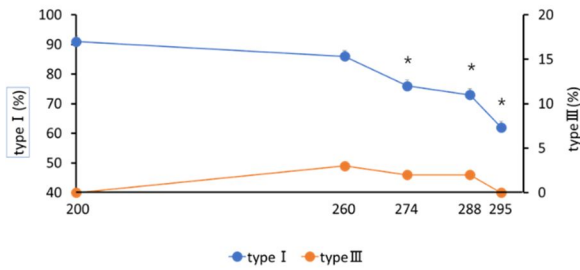


図 2 . 妊娠経過に伴う子宮頸管組織の I 型および III 型コラーゲンの割合の変化 .
* I 型において 200 日と比較して $p < 0.05$.

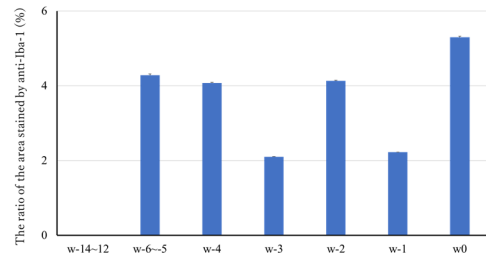


図 3 . 子宮頸管組織におけるマクロファージの浸潤 (分娩週 = w0)

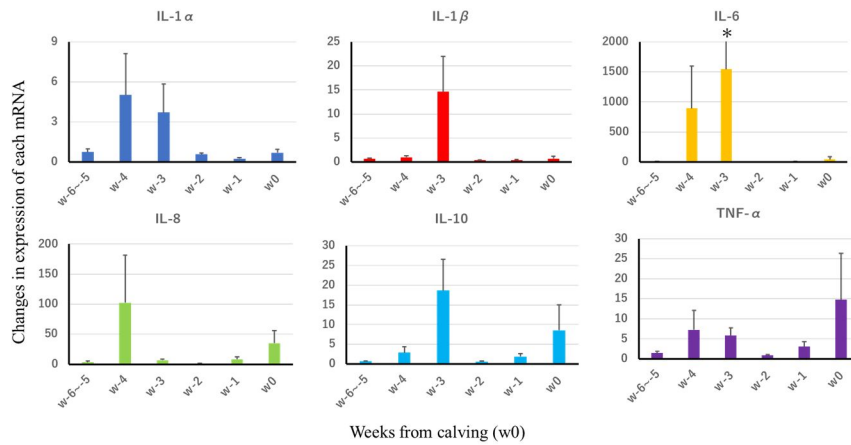


図 4 . 妊娠後期における子宮頸管組織中のサイトカイン mRNA の発現比の推移
w-14~-12 の値に対する倍率の変化として示した . *: w-14~-12 と比較して $p < 0.05$.

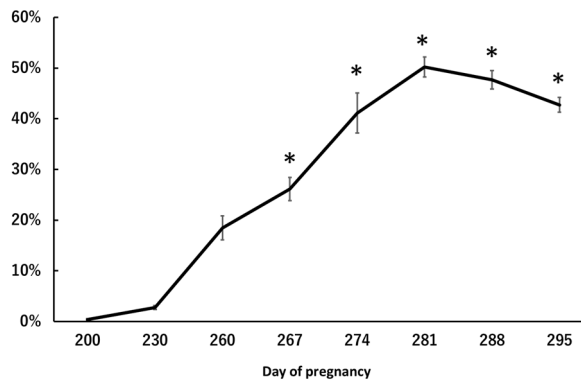


図 5 . 妊娠後期におけるウシ子宮頸管粘液中多形核好中球%の推移
* 妊娠 200 日と比較して $p < 0.05$.

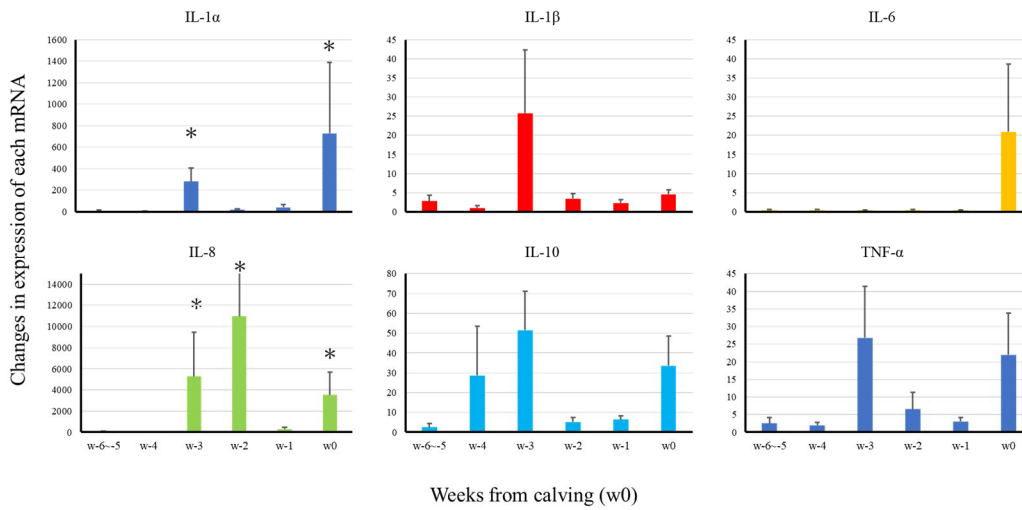


図6．子宮頸管粘液中の各種サイトカイン mRNA 発現比（分娩週 = w0）w-14 ~ w-12 の値に対する倍率の変化．*: w-14k ~ -12 と比較して p < 0.05 ．

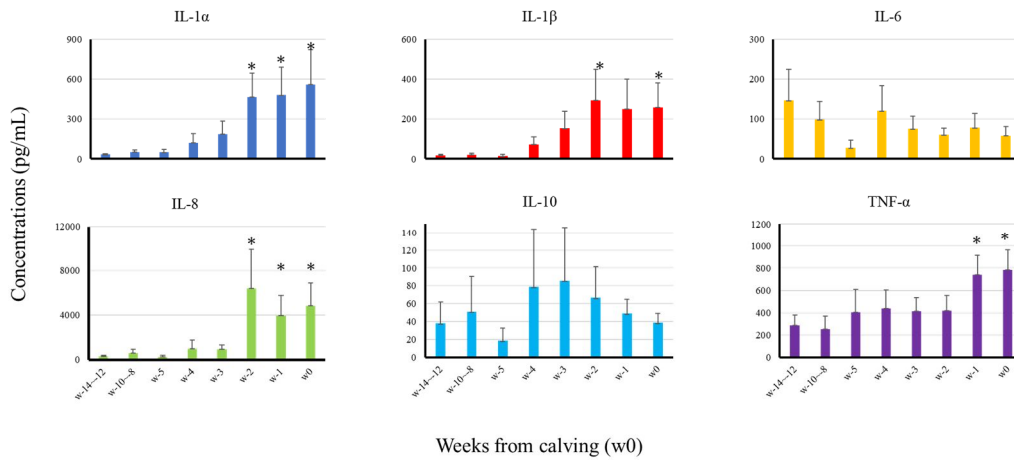


図7．妊娠後期における子宮頸管粘液中サイトカイン濃度（pg/mL）（分娩週 = w0）*: w-14~-12 と比較して p < 0.05 ．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamanokuchi E, Kitahara G, Kanemaru K., Hemmi K., Kobayashi I, Yamaguchi R, Osawa T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Inflammatory changes and composition of collagen during cervical ripening in cows	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ani12192646	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 4件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 金丸和之, 北原 豪, 小林郁雄, 邊見広一郎, 大澤健司
2. 発表標題 黒毛和種経産牛の正常分娩に伴う子宮頸管熟化におけるマクロファージの動態
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大澤健司, 山之口瑛悟, 金丸和之, 小林郁雄, 邊見広一郎, 菱川善隆, Choijookhuu Narantsog, 山口良二, 北原 豪
2. 発表標題 黒毛和種経産牛の子宮頸管熟化過程におけるコラーゲン組成と炎症性変化
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Osawa, T., Suenaga, T., Minamino, T., Mikurino, Y., Horii, Y., Kitahara, G.
2. 発表標題 Association of the characteristics of lochia with uterine inflammation and fertility in dairy cows
3. 学会等名 19th International Congress on Animal Reproduction（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山之口瑛悟, 北原 豪, 小林郁雄, 遠見広一郎, 菱川善隆, Narantsog Chojookhuu, 山口良二, 大澤健司
2. 発表標題 黒毛和種経産牛の正常分娩に伴う子宮頸管熟化におけるコラーゲン組成に関連した変化
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Osawa, T., Suenaga, T., Minamino, T., Mikurino, Y., Horii, Y., Kitahara, G.
2. 発表標題 Relationship between lochia characteristics and subsequent development of endometritis in postpartum dairy cows.
3. 学会等名 31th World Buiatrics Cogress (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Osawa, T.
2. 発表標題 Diagnosis and Treatment of Uterine Diseases in Cattle, Especially Endometritis
3. 学会等名 38th World Veterinary Association Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takeshi Osawa, Kazuyuki Kanemaru, Koichiro Hemmi, Ikuo Kobayashi, Go Kitahara
2. 発表標題 Macrophage and cytokine dynamics in cervical ripening in cows
3. 学会等名 11th International Ruminant Reproduction Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷田部 陽美、小東 史織、金丸 和之、北原 豪、上松 瑞穂、大澤 健司
2. 発表標題 難産牛の分娩後1週から2週における悪露中の炎症性サイトカインの動態
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金丸 和之、北原 豪、上松瑞穂、遠見 広一郎、小林 郁雄、大澤 健司
2. 発表標題 黒毛和種牛の子宮頸管粘液中炎症性サイトカインによる長期在胎および難産の予測
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Osawa, T.
2. 発表標題 Reproductive tract disorders of periparturient cows
3. 学会等名 5th World Congress of Reproductive Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金丸 和之、北原 豪、上松瑞穂、遠見 広一郎、小林 郁雄、大澤 健司
2. 発表標題 黒毛和種経産牛の正常分娩に伴う子宮頸管熟化における炎症性サイトカインmRNAの動態
3. 学会等名 第116回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Osawa, T.
2. 発表標題 Inflammatory responses in tissue and mucus of reproductive tract in cows before and after calving
3. 学会等名 National Conference on Animal and Veterinary Sciences (AVS-2023) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷田部 陽美、小東 史織、金丸 和之、北原 豪、上松 瑞穂、大澤 健司
2. 発表標題 難産牛の分娩後 2 週までにおける血清アミロイドA (SAA) 濃度と悪露中の炎症関連サイトカインの動態
3. 学会等名 第41回日本獣医師会獣医学術学会年次大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Osawa, T.
2. 発表標題 Inflammatory responses in tissue and mucus of reproductive tract in perparturient cow
3. 学会等名 32nd World Buiatrics Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yatabe, M., Kohigashi, S., Kanemaru, K., Kitahara, G., Osawa, T
2. 発表標題 Association of lochia cytokines and serum amyloid A during the early postpartum period with subsequent reproductive performance in eutocia and dystocia beef cows
3. 学会等名 32nd World Buiatrics Congress
4. 発表年 2024年

〔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	佐々木 羊介 (Sasaki Yosuke) (60704674)	明治大学・農学部・専任准教授 (32682)	
研究 分担者	北原 豪 (Kitahara Go) (90523415)	宮崎大学・農学部・准教授 (17601)	

	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 協力者	上松 瑞穂 (Uematsu Mizuho)	宮崎県農業共済組合・生産獣医療センター・センター長	

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
---------	---------