

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850199

研究課題名(和文)子宮免疫および血流動態による牛の子宮機能評価マニュアルの確立

研究課題名(英文)Evaluation of uterine function by uterine immunity and blood flow in cattle

## 研究代表者

安藤 貴朗(Ando, Takaaki)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

研究者番号：40406898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：牛の子宮機能評価するため、超音波画像検査および試験的子宫洗浄を行い、炎症反応と細菌感染について健康な牛に対して分娩2週間後より継続的な調査を行ったところ、超音波画像検査による子宮内膜の輝度および貯留物、子宮還流液における顆粒球増加が細菌感染の有無を反映していた。子宮疾患により長期不妊と考えられる牛では、子宮内膜の高輝度領域および貯留物、子宮灌流液の混濁が細菌の分離に関わらず高率に認められた。本調査の結果、子宮内の炎症が原因で長期不妊となった牛では、超音波画像検査による子宮の検査が有効であり、細菌感染の有無にかかわらず子宮内膜の炎症が持続することで不妊となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the cattle to evaluate the uterine function by ultrasound examination and uterine perfused solution. Healthy cattle were investigated from 2 weeks after parturition. The brightness of the endometrium and uterine fluid by ultrasound image, granulocyte from uterine perfused solution were significantly increased. These results indicated that ultrasound examination reflects the uterine inflammation and bacterial infection in cattle. The long-term infertile cattle caused by uterine disorder showed increase of brightness of the endometrium and uterine fluid by ultrasound examination image, turbid uterine perfused solution regardless of bacterial infection in uterus. These results indicated that the cattle which became long-term infertility for intrauterine inflammation, the diagnosis of uterus by ultrasound examination was effective. It is estimated that infertility was suggested in what inflammation of the endometrium continued with or without bacterial infection.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：獣医学 臨床繁殖 子宮内膜炎 診断

1. 研究開始当初の背景

(1) 肉用牛の生産で優先されるのは、多数の産子を獲得して収益を上げることであり、牛の妊娠率を上昇させることは生産性の向上に不可欠である。肉用牛において長期不受胎となる症例が多くみられるが、その原因調査については不明な点が多い。

(2) 近年では、長期不受胎の原因となる繁殖障害として発情微弱、排卵障害、受胎率低下が世界的に問題となっている。牛の妊娠率に関する研究としては、黄体退行促進、卵胞発育や排卵時期の特定、除放性プロジェステロンによる人工的黄体期の形成などホルモ剤による卵巣制御に関するものが多い。また、牛では過剰排卵誘起による優良受精卵の採取および移植が日常的に行われており、長期不受胎の牛に対する受精卵移植などが試みられており、卵巣動態は正常であるにも関わらず妊娠しない牛に対しては、受精卵の着床や妊娠維持のために子宮環境を整える方法が検討されている。しかし、子宮内環境に関する研究は内分泌機能や卵巣動態制御に比較少なく、評価方法は定まっていない。

2. 研究の目的

(1) 分娩後の子宮における炎症反応と免疫機能、子宮血流動態、内分泌動態、細菌感染について生理的な変動を調査することで、各項目の相互関係を明らかにする。

(2) 子宮内膜炎や子宮蓄膿症など子宮疾患の牛における子宮機能を明らかにし、受胎に影響を及ぼす要因を解明するとともに、臨床的な子宮疾患の診断法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 調査 : 黒毛和種経産牛 10 頭(平均 5.0 歳、3.4 産)について分娩 2 週後、4 週後、6 週後に調査を行った。超音波画像検査は 6.5MHz のリニア型超音波プローブを直腸内に挿入後、子宮角分岐部の外径、子宮内膜の高輝度領域および子宮内貯留物の有無を B モード画像で、子宮動脈血流量の測定をパルスドップラーモードで採取した。同時に、薬剤注入棒を用いて生理食塩水 100ml で子宮内を洗浄し、灌流液における細菌感染の有無を調査するため、好気および微好気下で 24~48 時間の細菌培養を行った。さらに、灌流液の総白血球数を自動血球測定器により測定するとともに、2 倍量の 0.83% 塩化アンモニウム溶液 (pH7.2) を混合して溶血させ、4、1,000rpm、5 分間の遠心分離を行い、上清を除去した沈渣についてフローサイトメトリーを用いて白血球サブセット解析を行った。供試牛は分娩 2 週後の子宮灌流液より細菌が分離されたものを細菌感染群(5 頭)、細菌が認められなかったものを無菌群(5 頭)として、それぞれの検査結果を比較した。

(2) 調査 : 供試牛は 1 つの農場で飼育されている黒毛和種繁殖雌牛で、分娩後 120 日以上が経過しても妊娠していない 28 頭の内、卵巣疾患(卵巣静止および卵巣嚢腫)が原因と考えられるものを除いた 18 頭(平均 5.9 ± 2.0 歳、3.2 ± 1.4 産)で、分娩後日数は 145.6 ± 19.0 日であった。生殖器の検査は腔鏡検査による腔内膿瘍物の有無、超音波画像検査による子宮角分岐部の外径、子宮内膜の高輝度領域および子宮内腔の貯留物の有無を B モード画像で、子宮動脈血流量の測定をパルスドップラーモードで採取した。同時に、薬剤注入棒を用いて生理食塩水 100ml で子宮内を洗浄し、灌流液における細菌感染の有無を調査するため、好気および微好気下で 24~48 時間の細菌培養を行った。さらに、灌流液の総白血球数を自動血球測定器により測定するとともに、フローサイトメトリーを用いて白血球サブセット解析を行った。

4. 研究成果

(1) 調査 : 分娩後の繁殖成績では、無菌群に比較して細菌感染群で初回授精日が平均 62.6 日から 72.8 日と 10 日間、空胎期間は 66.8 日から 89.6 と 23 日間有意に延長した(表 1, p<0.05)。その結果、授精回数は無菌群で平均 1.2 回であったものが、平均 1.6 回と増加した。超音波画像検査では、妊娠側の子宮角外径、子宮動脈血流量は両群ともに分娩 2 週後から 4 週後に有意に減少した(p<0.05)。子宮内膜の高輝度領域および子宮内貯留物は、分娩 2 週後には全頭で認められたが、分娩 4 週後には無菌群では 3 頭および 2 頭と減少したのに対し、細菌感染群では 5 頭すべてに認められた(図 1-2、写真 1-2)。子宮灌流液中の細胞数は、分娩 2 週後から 6 週後にかけて両群ともに有意に減少した(図 3, p<0.05)。分娩 2 週後において、多核球数は細菌感染群で無菌群に比較して有意な高値を示したが(p<0.05)、単核球数は有意に低値であった(p<0.05)。また、分娩 2 週後の白血球サブセットでは、細菌感染群で無菌群に比較して CD4 陽性 T 細胞数、CD8 陽性 T 細胞数、CD14 陽性単球数が有意に低値を示した(p<0.05)。さらに、分娩 6 週後における CD4/CD8 比は細菌感染群で無菌群に比較して有意に低値であった(p<0.05)。

表 1. 分娩後の繁殖成績

	発情回帰			初回授精日	空胎日数	平均授精回数
	2W	4W	6W			
細菌感染群	0頭 (0%)	2頭 (40%)	4頭 (80%)	72.8 ± 9.7 *	89.6 ± 20.4 *	1.6 ± 0.5
無菌群	0頭 (0%)	3頭 (60%)	5頭 (100%)	62.6 ± 1.2	66.8 ± 13.4	1.2 ± 0.4

\* : 群間で有意差あり(p<0.05)

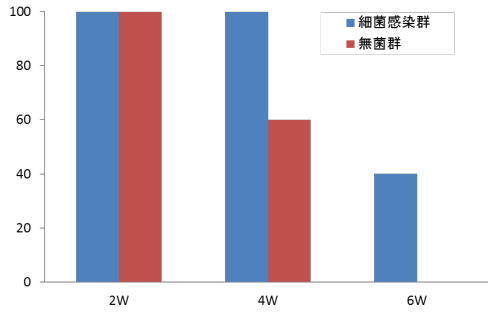


図1. 子宮内膜の高輝度領域の変化

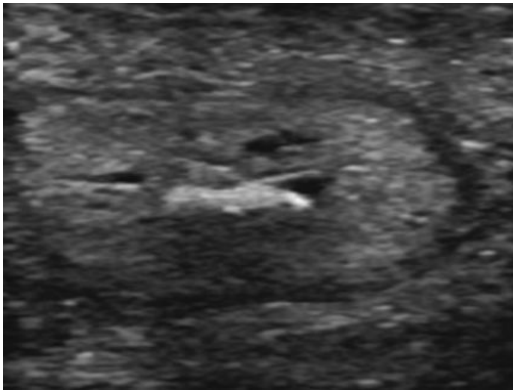


写真1. 超音波検査による子宮内膜に高輝度領域を有する症例

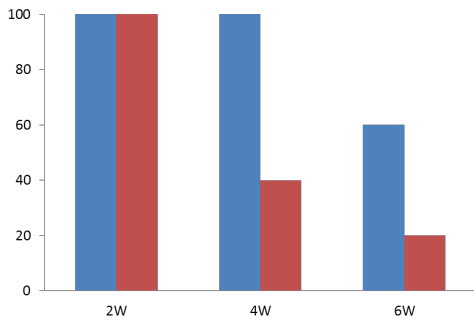


図2. 子宮内貯留物の変化

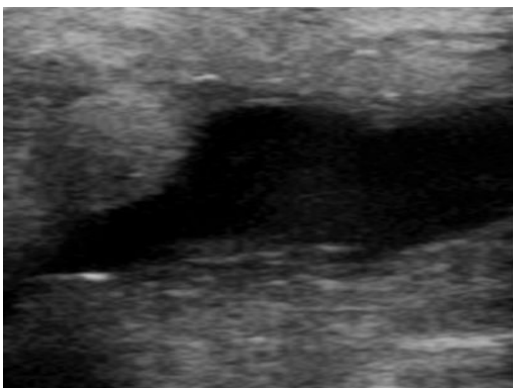


写真2. 超音波検査による子宮内に貯留物を有する症例

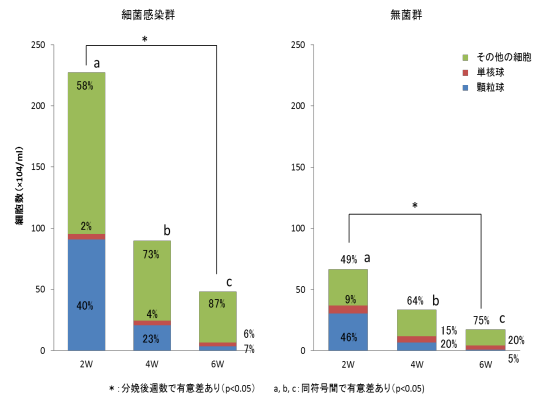


図3. 子宮灌流液中の細胞数と割合の変化

(2) 調査 : 分娩後の黒毛和種雌牛の経時的な調査の結果より、黒毛和種牛において分娩2週後に細菌感染が認められた場合、子宮の修復が遅延するとともに発情回帰の遅延が起こり、受胎率の低下や授精回数が増加など繁殖成績が低下する可能性が示唆された。また、分娩2週後での子宮内における細菌感染には細胞性免疫機能の低下が関与しており、分娩6週後ではさらに液性免疫機能を低下させる可能性が示唆された。

(3) 調査 : 供試牛18頭のうち、腔鏡検査により腔内に膿瘍物の貯留が認められた牛は2頭(11.1%)であった(表2)。全頭で左右の子宮角外径および子宮動脈血流量に左右差は認められず、子宮内膜の高輝度領域は13頭(72.2%)、子宮内腔の貯留物は15頭(83.3%)に認められた。子宮灌流液に混濁が認められた牛は13頭(72.2%)で、細菌培養検査では5頭(27.8%)より細菌(*E. coli*: 2頭、*S. gallinarum*: 2頭、*Trueperella pyogenes*: 1頭)が分離された(写真3-4)。灌流液の沈渣では、多核白血球数が30.3%と単核白血球の7.2%に比較して高値を示した(図4)。

表2. 生殖器の検査結果一覧

		あり	なし
腔鏡検査	腔内膿瘍物	2 (11.1%)	16 (88.9%)
	子宮角外径の左右差*	0 (0%)	18 (100%)
超音波画像検査	子宮血流の左右差*	0 (0%)	18 (100%)
	子宮内膜の高輝度	13 (72.2%)	5 (27.8%)
	子宮内腔の貯留物	15 (83.3%)	3 (16.7%)
子宮灌流液検査	灌流液の混濁	13 (72.2%)	5 (27.8%)
	細菌分離	5 (27.8%)**	13 (72.2%)

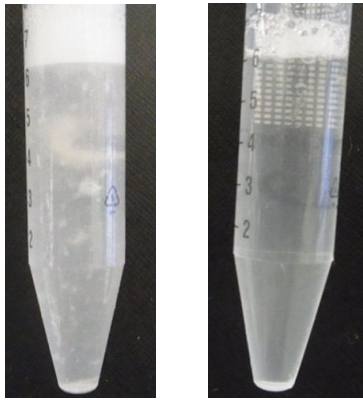


写真 3 . 子宮洗浄時に混濁が認められた症例 (左)と混濁が認められなかった症例(模擬)の子宮灌流液



写真 4 . 子宮灌流液の細菌培養検査により細菌が分離された症例の検査結果

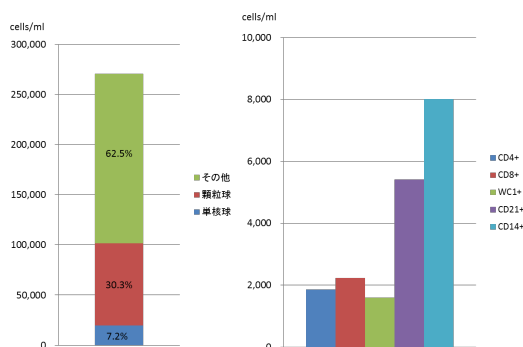


図 4 . 子宮灌流液中の細胞数と割合

(4) 調査 : 分娩後の長期にわたり不妊の黒毛和種雌牛のうち、卵巣疾患が原因となるものを除いたものについて子宮機能の調査を行った結果、超音波画像検査では子宮内膜の高輝度領域の有無、子宮内腔への貯留物が認められる症例が多くみとめられ、子宮内炎症の診断法として有効であることが明らかとなった。一方、子宮内からの細菌分離率は30%未満であったにもかかわらず、子宮灌流液中の多核白血球数が単核白血球数よりも増加していることから、細菌感染の有無にかかわ

らず子宮内膜の炎症が持続することが不妊の原因となっている可能性が示唆された。

(5) 以上の調査の結果より、分娩後の繁殖機能の調査としては、分娩2週後における子宮内細菌の有無が、その後の子宮内膜の炎症に影響していることが明らかとなり、子宮内の感染の有無を明らかにすることが重要であると考えられた。また、子宮内の炎症の有無を確認する検査として超音波画像診断による子宮内膜および貯留物の確認が有効であった。子宮の異常に起因する長期不妊の牛においても、同様の超音波画像所見が得られることから、子宮内の炎症を早期に抑制することで、分娩間隔の短縮など生産性を向上させる可能性が示唆された。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

牧田 拓自、安藤 貴朗、小尾 岳士、窪田 力、黒毛和種牛における分娩後の子宮環境の変化に関する調査、日本産業動物獣医学会(九州地区)、2014年10月4日、鹿児島県鹿児島市

安藤 貴朗、牧田 拓自、長郷 佑亮、藤川 拓郎、小尾 岳士、窪田 力、黒毛和種牛における分娩後の細菌感染と子宮機能の変化、平成 26 年度獣医学術学会年次大会、2015 年 2 月、岡山県岡山市

安藤 貴朗、藤川 拓郎、小尾 岳士、窪田 力、黒毛和種牛の長期不妊牛における子宮内炎症反応の調査、平成 27 年度獣医学術学会年次大会、2016 年 2 月、秋田県秋田市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.vet.kagoshima-u.ac.jp/kadai/  
V-Theri/theri/index.php](http://www.vet.kagoshima-u.ac.jp/kadai/V-Theri/theri/index.php)

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

安藤 貴朗 (ANDO, Takaaki)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准  
教授

研究者番号：40406898

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者

窪田 力 (KUBOTA Chikara)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教  
授

研究者番号：80420652