

細菌毒素による乳牛の卵巣機能障害の病態解明と新規治療法の開発

真方 文絵 (東京大学大学院 農学生命科学研究科)

afmagata@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

分娩にともなう子宮への細菌感染によって起こる炎症性子宮疾患は乳牛のおよそ半数において発生し、繁殖性低下の主要因となっている。抗生物質投与を主とする既存の治療法は耐性菌出現のリスクが大きく、治癒後も長期にわたる不妊を引き起こすことから、革新的なアプローチによる治療法の開発が急務である。この問題を解決するため、炎症性子宮疾患による繁殖性低下を引き起こす分子として起因菌であるグラム陰性細菌が放出する毒素 (リポポリサッカライド: LPS) に焦点を当て、卵巣機能におよぼす分子作用機序を明らかにしたとともに、受精卵移植を活用した効率的な繁殖技術の開発に取り組んだ。

はじめに

乳牛の生産基盤は年々弱体化しており、生乳生産量は大きく伸び悩んでいる。この要因に、繁殖性の低下による乳牛飼養頭数の減少があげられる。繁殖性の指標とされる受胎率は低下の一途を辿り、平成元年に 62%であったのに対し、平成 29 年には 42%にまで低下している (家畜改良事業団、2017 年)。乳牛における繁殖障害の主要因に、子宮への細菌感染によって引き起こされる子宮炎や子宮内膜炎といった炎症性子宮疾患が存在する。分娩後最初の 2 週間に 25-40%の乳牛で子宮炎が認められ、長期不受胎牛における罹患率は 70%にもものぼる。炎症性子宮疾患により受胎率が 20%低下することが報告されており、乳牛の生産性におよぼす影響は甚大である。ところが、炎症性子宮疾患による受胎率低下の発生機序には未解明な点が多く、また既存の治療法による効果も少ないことから、根本的な治療法の確立が急務である。炎症性子宮疾患罹患牛の約半数において、卵胞発育不全などの卵巣機能障害が発生する^{1,2)}。そこで、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毒素に着目し、乳牛の卵巣機能におよぼす影響を精査した。

炎症性子宮疾患と細菌毒素

炎症性子宮疾患を示す乳牛の子宮から分離される細菌としては *Escherichia coli* と *Trueperella pyogenes* が最も一般的である。*E. coli* を含むグラム陰性細菌は、内毒素である LPS を産生することで、発熱や白血球の活性化、致死性ショックなど多岐にわたる障害を引き起こす。炎症性子宮疾患に罹患した乳牛では、子宮の炎症が治癒した後も長期にわたって血中の LPS 濃度が健康牛よりも高値を示すことを明らかにし、体循環する LPS が全身の免疫応答を惹起することによって末梢器官の機能に影響をおよぼす可能性を示した³⁾。さらに、LPS は次世代を作出する生殖細胞である卵子を育てる卵巣内の卵胞に移行することを発見した^{4,5,6)}。興味深いことに、卵胞液中の LPS 濃度は血中よりも高値を示したことから⁷⁾、子宮から体循環に移行した LPS が卵胞へと到達および蓄積し、卵巣機能に影響をおよぼすことが考えられた。さらに LPS は子宮の治癒後も卵胞に残留し、長期にわたる卵巣機能障害を引き起こす可能性を見出した。

細菌毒素による卵巣機能障害の発生機序の解明

LPS が卵巣機能におよぼす直接的な影響を明らかにするため、ウシ生体および体外培養システムを用いて詳細な検証を行った。その結果、高濃度の LPS を保有する卵胞では、発育した卵胞から分泌され、卵胞からの卵子の放出 (排卵) を促す性ステロイドホルモンであるエストラジオールの産生能が低下するとともに、細胞死が誘導されていることを発見した⁴⁾。さらに、卵胞液中に高濃度の LPS を含む卵巣から採取した卵子を体外で受精させたところ、子宮に着床可能な受精卵の発育ステージである胚盤胞期胚への発育が低下していた。これらの結果から、卵胞液中に存在する LPS が卵胞および内包される卵子の機能を低下させる可能性が考えられた。LPS による卵胞機能低下の作用点を明らかにするため、卵胞を構成する卵胞膜細胞と顆粒層細胞、および卵子を高純度に単離して単独で培養し、それぞれの細胞の機能におよぼす LPS の分子作用機序を精査した。その結果、LPS は卵胞膜細胞においてエストラジオールの基質であるプロジェステロンの産生を抑制したとともに⁸⁾、顆粒層細胞においてはエストラジオールの産生を阻害することを突き止めた⁹⁾。これらの知見より、LPS は性ステロイドホルモンの産生を低下させることによって、卵胞発育や排卵を障害する可能性が示された。さらに、卵胞内で起こる卵子の成熟過程を模倣した体外成熟培養法を用いて卵子の成熟能および胚発生能におよぼす LPS の影響について検証したところ、LPS は受精に必須の過程である減数分裂の再開を抑制したとともに、細胞質に存在するミトコンドリアの機能障害を引き起こすことを明らかにした¹⁰⁾。さらに、LPS 存在下で成熟させた卵子を体外受精に供したところ、胚盤胞期胚への発生率が低下した。これらの知見は、LPS は卵子の成熟機構を阻害することで、排卵したとしても受精およびその後の胚発生を障害し、受胎性の低下を引き起こす可能性を示唆している。

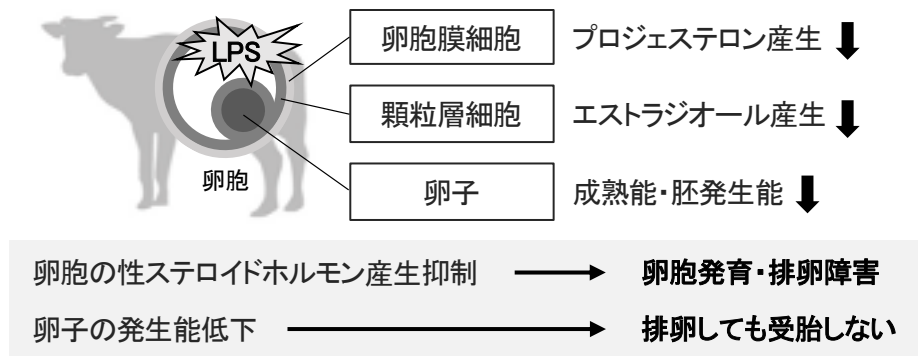


図 1. 卵胞液中に存在する細菌毒素 LPS による卵胞機能低下の作用機序

子宮に感染したグラム陰性細菌が放出する毒素である LPS が卵胞に移行し、卵胞の機能を低下させることで繁殖障害の一因となる可能性が考えられた。

繁殖性向上のための高品質ウシ受精卵の開発

LPS による排卵抑制および胚発生能低下の問題を解決するため、卵子を吸引採取して体外で受精させ、発育した受精卵を子宮内に移植することで妊娠を成立させる体外受精卵移植の技術改良に取り組んだ^{11,12)}。体外受精卵の移植による受胎率を向上させるために、品質の高い受精卵の選抜は最も重要な課題の一つである。そこで、タイムラプスシネマトグラフィーにより受精卵の発

育を継続的に観察し、異常な発生経過をたどった受精卵を廃棄することで、高い受胎率が望める受精卵を選抜する方法を確立した¹²⁾。20分おき10日間にわたるウシ受精卵のタイムラプス撮影によって、胚盤胞期胚まで発育した受精卵の36%が発育初期に細胞分裂異常を起こすことを発見した。胚盤胞期胚の形態学的評価による異常卵割の鑑別は困難であったが、分裂した細胞が再び融合する異常卵割 (reverse cleavage) を起こした胚では発育速度が低下していた。さらに、着床に必須の現象である孵化の発生率が低下するとともに、染色体異常の増加が認められた。異常卵割をおこした受精卵を健全なウシの子宮に移植したところ、受胎率が正常卵割胚の半分以上に低下していたことから、異常卵割が着床および妊娠成立に影響をおよぼす可能性が考えられた。以上の結果より、受精後早期のタイムラプス観察によって異常卵割を示した受精卵を摘発・除外することで、高い受胎率が望める受精卵の作出が可能になると考えられた。タイムラプス観察による受精卵の選抜技術を実用化および普及するためには、膨大な数のデータを効率的に解析するシステムが不可欠である。そこで、IoT (Internet of Things) 技術の活用によって優良な受精卵を自動選抜する、牛体外受精卵自動解析大量生産システムをSONY社と共同開発した。タイムラプス観察により得られた受精卵の画像をクラウドに自動転送し、人工知能のディープラーニングによって受精卵の画像を自動解析するとともに、巨大なデータベースを構築するシステムを開発した。解析データはリアルタイムでWebダッシュボードへ表示され、解析情報に基づいて客観的な評価・出荷判定を効率的に行うことで、安定して大量の高品質受精卵の生産を行うことが可能となった。

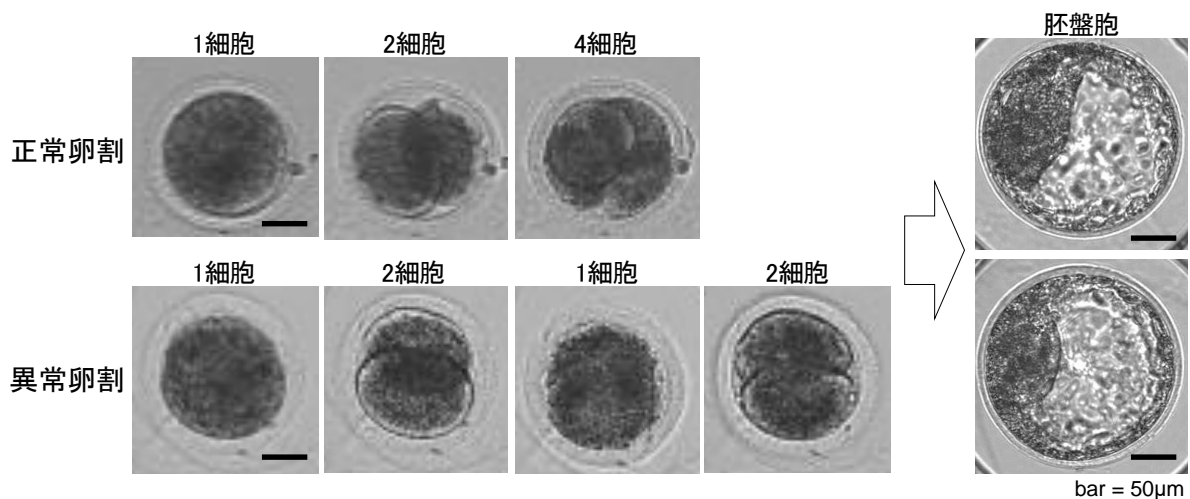


図2. 正常卵割および異常卵割胚の発生経過

分裂した細胞が再び融合する異常卵割 (Reverse cleavage) を起こした受精卵は形態学的に正常な胚盤胞期胚へと発育するが、染色体異常の増加が認められた。文献12より一部改編。

今後の展望

本研究では、細菌毒素であるLPSが卵巣機能障害を引き起こす分子作用機序を明らかにしたとともに、体外受精卵移植の技術改良によって高い受胎率が望める高品質ウシ受精卵の選抜方法を確立した。今後は哺乳類の生殖中枢である視床下部-下垂体-卵巣軸に焦点を当て、生殖機能を最上位から支配する神経ペプチドであるキスペプチンの分泌に対するLPSの作用を検証する。これにより、LPSによる卵胞発育および排卵抑制に対する治療法の開発に資する新たな繁殖制御剤の確立を目指す。

謝辞

本賞の受賞にあたり、公益社団法人日本畜産学会よりご推薦をいただきました。柏崎直巳理事長はじめ関係の諸先生方および事務局の皆様には厚くお礼申し上げます。本研究は帯広畜産大学大学院畜産学研究科、JA 全農 ET 研究所、および東京大学大学院農学生命科学研究科にて行われたものです。多大なるご支援とご指導をいただきました清水隆博士、大野喜雄所長、および浦川真実博士に深甚なる謝意を表します。またソニーネットワークコミュニケーションズ株式会社 篠田昌孝博士をはじめとする共同研究者の方々に心よりお礼申し上げます。

引用文献

1. **Magata F**: Lipopolysaccharide-induced mechanisms of ovarian dysfunction in cows with uterine inflammatory diseases. *J Reprod Dev*. 66: 311-317, 2020
2. **真方文絵**, 清水隆: 分娩後の子宮回復と子宮内膜炎: 乳牛における炎症性子宮疾患と卵巣機能, LPS に関するクロストーク. *臨床獣医*. 36 (7): 51-56, 2018
3. **Magata F**, Morino I, Teramura M, Tsunoda E, Kawashima C, Haneda S, Miyamoto A, Kida K, Shimizu T: 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 (2): 248-253, 2017
4. **Magata F**, Horiuchi M, Echizenya R, Miura R, Chiba S, Matsui M, Miyamoto A, Kobayashi Y, Shimizu T: Lipopolysaccharide in ovarian follicular fluid influences the steroid production in large follicles of dairy cows. *Anim Reprod Sci*. 144: 6-13, 2014
5. Shimizu T, Ishizawa S, **Magata F**, Kobayashi M, Fricke PM, Miyamoto A: Involvement of lipopolysaccharide in ovarian cystic follicles in dairy cow: Expressions of LPS receptors and steroidogenesis-related genes in follicular cells of cystic follicles. *Anim Reprod Sci*. 195: 89-95, 2018
6. **Magata F**, Kubota R, Shimizu T: Association among endometrial hyperemia, uterine bacterial infection, and characteristics of large ovarian follicles in dairy cows. *J Vet Med Sci*. 81: 1313-1317, 2019
7. **Magata F**, Ishida Y, Miyamoto A, Furuoka H, Inokuma H, Shimizu T: 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 (1): 81-84, 2015
8. **Magata F**, Horiuchi M, Miyamoto A, Shimizu T: Lipopolysaccharide (LPS) inhibits steroid production in theca cells of bovine follicles: Distinct effect of LPS on theca cell function in pre- and post-selection follicles. *J Reprod Dev*. 60 (4): 280-287, 2014
9. Shimizu T, Miyauchi K, Shirasuna K, Bollwein H, **Magata F**, Murayama C, Miyamoto A: 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, 2012
10. **Magata F**, Shimizu T: Effect of lipopolysaccharide on developmental competence of oocytes. *Reprod Toxicol*. 71: 1-7, 2017
11. **Magata F**, Tsuchiya K, Okubo H, Ideta A: Application of intracytoplasmic sperm injection to the embryo production in aged cows. *J Vet Med Sci*. 81: 84-90, 2019
12. **Magata F**, Ideta A, Okubo H, Matsuda F, Oono Y: Growth potential of bovine embryos presenting abnormal cleavage observed through time lapse cinematography. *Theriogenology*. 133: 119-124, 2019