

称号及び氏名 博士(獣医学) 喜田 加世子

学位授与の日付 平成19年2月20日

論文名 「イヌ子宮蓄膿症の発生機構の解明に関する研究」

論文審査委員 主査 玉田 尋通

副査 稲葉 俊夫

副査 馬場 栄一郎

論文要旨

緒言

イヌ子宮蓄膿症は、子宮腔に膿が貯留する子宮内細菌感染症であり、多くの場合大腸菌が検出される。罹患犬は重篤な中毒症状を示すことから、イヌにおける重要な子宮疾患の一つとされている。本症はその発生頻度が発情周期中に変化し、発情期には子宮内で大腸菌が検出されるにもかかわらず発生頻度は低く、卵巣で黄体が発育する発情休止期早期(10日頃)にきわめて高くなることが報告されている。一方、本症は性ステロイドホルモン剤を投与したイヌで発生率が高いことから、卵巣からのエストロゲンやプロジェステロンの分泌異常あるいは子宮におけるそれらのレセプターの発現異常が原因ではないかと疑われてきた。しかし、これまでのところ自然発症した子宮蓄膿症罹患犬にこのような異常は認められておらず、その発生機構はいまだ不明な点が多い。

イヌ子宮蓄膿症の最も効果的な治療法および予防法は、外科的に卵巣と子宮を摘出することである。しかし、この方法ではその後の繁殖を望むことはできない。内科的治療法として、黄体退行作用と子宮収縮作用を持つプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) と抗生物質の併用投与が行われることもあるが、高い再発率、 $PGF_{2\alpha}$ の強い副作用などの問題点が指摘されている。

本研究では、イヌ子宮蓄膿症の安全で効果的な予防法および治療法開発に向けて、いまだ明らかでない本症の発生機構を解明することを目指し、子宮あるいは全身における感染防御能の発情周期中の変化と本症発生との関わりについて検討した。

第1章 子宮内膜の初期防御バリアーとしてのムチン1の発現動態

粘膜上皮を物理的に覆い、細菌付着を阻害する感染防御バリアーの一つとして知られるムチン1 (MUC1) は、マウス子宮において発情周期中にその発現が変動することが報告されている。しかし、イヌ子宮における MUC1 発現やその動態はいまだ明らかでない。本章では、MUC1 発現と子宮蓄膿症発生との関係を検討するために、発情周期中および子宮蓄膿症のイヌ子宮における MUC1 発現を RT-PCR 法および免疫組織染色法によって調べた。

その結果、子宮内膜での MUC1 mRNA 発現量は、発情前期、発情期では高かったが、発情休止期 10 日で有意に減少し、その後発情休止期 35 日では発情期と同程度まで回復し、無発情期もその値は維持された。MUC1 の免疫組織染色では発情前期、発情期、発情休止期 35 日および無発情期の管腔および腺上皮細胞において強い免疫反応がみられたが、発情休止期 10 日ではほとんど染色されなかった。子宮蓄膿症罹患犬の子宮において、MUC1 mRNA 発現量は発情休止期 10 日と同程度に減少し、免疫組織染色でもほとんど染色されなかった。

以上の結果から、発情周期中のイヌ子宮内膜における MUC1 発現は、発情休止期 10 日に他の時期と比較して低下することが明らかとなった。

第2章 発情周期中の子宮内膜における大腸菌の付着性

ヒト腔上皮細胞に対する細菌の付着性は月経周期とともに変化することが報告されている。第1章で、細菌付着を阻害する MUC1 発現はイヌにおいて発情周期中に変動することが明らかとなったが、イヌ子宮内膜に対する細菌の付着性と MUC1 発現との関連は不明である。本章では、子宮蓄膿症罹患犬から分離された大腸菌 (PYO-252 株) 生菌を用いて、発情周期の各時期より採取したイヌ子宮内膜における付着菌数の変化を調べるとともに、各種糖と糖分解酵素の添加が大腸菌付着に及ぼす影響を調べ、その付着性状を解析した。

その結果、イヌ子宮内膜への大腸菌の付着菌数は、発情前期、発情期、発情休止期 35 日および無発情期と比較して発情休止期 10 日で有意に増加した。この大腸菌付着菌数と MUC1 mRNA 発現量との間には負の相関が認められた。また、発情休止期 10 日のイヌから採取した子宮内膜細胞への大腸菌の付着は、マンノース添加によって有意に抑制されたが、フルクトースとガラクトース添加では抑制されなかった。MUC1 の糖鎖に含まれる糖を分解する酵素の一つであるヒアルロニダーゼを用いて発情前期のイヌから採取した子宮内膜細胞を処理した後に大腸菌を添加したところ、付着菌数は増加する傾向が見られた。

以上の結果から、イヌ子宮内膜への大腸菌の付着菌数は、MUC1 発現とは逆に、発情休止期 10 日に他の時期と比較して増加することが明らかとなった。またこの付着は、上皮細胞に存在するマンノースレセプターを介している可能性が示された。

第3章 子宮内膜の初期防御バリアーとして分泌されるラクトフェリンの発現動態

ラクトフェリン (LF) はトランスフェリンファミリーに属する鉄結合性糖蛋白質であり殺菌作用を持つ物質として知られている。ヒトやマウスの子宮内膜上皮細胞における LF 発現は、卵胞期で強く、黄体期に低下することが報告されている。しかし、イヌ子宮における LF 発現やその動態はいまだ明らかでない。本章では、LF 発現と子宮蓄膿症発生との関

係を検討するために、発情周期中および子宮蓄膿症のイヌ子宮における LF 発現を RT-PCR 法および免疫組織染色法によって調べた。

その結果、子宮内膜での LF mRNA 発現量は、発情前期と発情期では高かったが、発情休止期 10 日で急激に減少し、発情休止期 35 日と無発情期では低いまま維持されていた。LF 免疫組織染色において、発情前期と発情期では上皮細胞が強く染色されたが、発情休止期 10 日から無発情期の間ではほとんど染色されなかった。子宮蓄膿症罹患犬の子宮内膜においては、LF mRNA 発現量は発情期と同程度まで増加しており、免疫組織染色において、上皮細胞とともに間質に浸潤している好中球に強い免疫反応がみられた。

以上の結果から、イヌ子宮内膜における LF 発現は、発情前期および発情期で上昇し、発情休止期から無発情期の間で低下することが明らかとなった。また、LF は細菌感染に反応して上皮細胞と好中球に発現し、イヌ子宮内の細菌除去に働いている可能性が示された。

第 4 章 発情周期に伴う末梢血単核球の免疫反応の変動

第 1 章、第 3 章において、局所的感染防御因子の発現の低下がイヌ子宮蓄膿症の発生に関与する可能性が示された。一方、細菌感染に対する反応として、全身性免疫の存在も重要と思われる。近年、卵巣ホルモンが全身性免疫反応に影響を及ぼすことがわかってきている。すなわち、エストロジェンは免疫担当細胞の活性を促進し、プロゲステロンはこれを抑制する。しかし、イヌにおいて全身性免疫反応に及ぼす卵巣ホルモンの影響についての報告はない。本章では、 $[^3\text{H}]$ -thymidine の取り込み量を指標に、大腸菌刺激による発情周期中のイヌ末梢血単核球の増殖反応の変化とそれに及ぼす卵巣ホルモンの効果を調べた。また、一般的に細菌感染はリンパ球におけるインターフェロン γ (IFN γ) の産生を刺激し細胞性免疫を活性化させると言われているため、大腸菌で刺激したイヌ末梢血単核球における IFN γ 発現に及ぼす卵巣ホルモンの効果を RT-PCR 法および ELISA 法を用いて調べた。

その結果、PYO-252 株の刺激による発情周期中のイヌ末梢血単核球の増殖反応は、無発情期と比較して発情休止期 10 日で有意に低下し、発情期で有意に上昇した。発情前期、発情休止期 35 日は無発情期と差はなかった。マイトゲンである Concanavalin A および大腸菌リポ多糖 (LPS) あるいは大腸菌標準株の刺激ではこのような発情周期中の変動は見られなかった。無発情期のイヌから採取した末梢血単核球の PYO-252 株の刺激による増殖反応は、エストロジェンの添加によって上昇し、プロゲステロンの添加によって低下した。一方、無発情期のイヌから採取し PYO-252 株で刺激した末梢血単核球における IFN γ mRNA 発現量と蛋白質の産生は、エストロジェンによって増加し、プロゲステロンによって減少した。

以上の結果から、子宮蓄膿症由来大腸菌刺激による抗原特異的な末梢血単核球の増殖反応は、発情期に上昇し、発情休止期 10 日で低下することが明らかとなった。また、この反応と大腸菌で刺激した末梢血単核球における IFN γ 発現は、エストロジェンによって上昇し、プロゲステロンによって低下することが示された。

総括

本研究では、イヌの子宮あるいは全身における感染防御能の発情周期中の変化とイヌ子

宮蓄膿症発生との関わりを検討し、以下のような結論を得た。

1. 発情周期中の子宮内膜における細菌付着阻害因子 MUC1 の発現は、子宮蓄膿症の発生が多い発情休止期 10 日に他の時期と比較して低下することが明らかとなった。
2. 発情周期中の子宮内膜における大腸菌の付着菌数は、発情休止期 10 日に他の時期と比較して増加することが明らかとなった。
3. 発情周期中の子宮内膜における殺菌物質 LF の発現は、発情前期および発情期で上昇し発情休止期から無発情期の間で低下することが明らかとなった。
4. 発情周期中における末梢血単核球の子宮蓄膿症由来大腸菌刺激に対する増殖反応は、発情期に上昇し発情休止期 10 日で低下することが明らかとなった。また、この反応と大腸菌で刺激した末梢血単核球における細胞性免疫活性化因子 $\text{INF}\gamma$ の発現は、エストロゲンによって上昇し、プロゲステロンによって低下することが示された。

以上、本研究は雌イヌの発情周期と関連する感染防御機構の一端を明らかにした。特に、発情休止期 10 日頃に子宮内膜における局所的な感染防御因子の発現や全身の細胞性免疫能が低下することが示され、これが同時期におけるイヌ子宮蓄膿症の発生頻度の上昇に結びつく可能性が考えられた。今後、感染防御因子を含む局所あるいは全身性の免疫機能の調節が、イヌ子宮蓄膿症の新たな予防法あるいは治療法へと応用されることが期待される。

審査結果の要旨

イヌ子宮蓄膿症は、子宮腔に膿が貯留する細菌感染症であり、成犬に多発して重篤な中毒症状を示すことから、イヌにおける重要な子宮疾患の一つとされている。本症は性ステロイドホルモン剤を投与すると発生率が高くなるので、卵巣のホルモン分泌異常あるいは子宮におけるそれらのレセプターの発現異常が原因である可能性が考えられてきた。しかし、自然発症した子宮蓄膿症罹患犬にこのような異常は認められず、本症の発生機構は未だ明らかでない。また、本症に対する最も効果的な治療法および予防法は、卵巣と子宮の摘出であるが、この方法ではその後の繁殖は望めない。内科的治療法として、プロスタグランジン $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) と抗生物質の併用投与が行なわれることもあるが、再発率が高く、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ には強い副作用があるなどの問題がある。

本研究は、未だ確立されていない安全で効果的なイヌ子宮蓄膿症の予防法および治療法の開発に向けて、本症の発生機構を解明することを目的としている。特に発情周期中の発情休止期 10 日頃に本症の発生頻度が高くなることと子宮あるいは全身における感染防御能との関連について検討した研究をまとめたものであり、次のような成果を得ている。

1. 粘膜上皮を物理的に覆い、細菌付着を阻害する感染防御バリアーの一つとして知られるムチン 1 (MUC1) のイヌ子宮における発現と子宮蓄膿症発生との関係を検討するために、発情周期中および子宮蓄膿症のイヌ子宮における MUC1 発現を RT-PCR 法および免疫組織染色法によって調べた。その結果から、発情周期中のイヌ子宮内膜における MUC1 発現は、発情休止期 10 日に他の時期と比較して低下することを明らかにした。また、子宮蓄膿症罹

患犬の子宮では、MUC1 発現は 発情休止期 10 日と同レベルであることを明らかにした。

2. 子宮蓄膿症罹患犬から分離された大腸菌 (PYO-252 株) 生菌を用いて、発情周期の各時期より採取したイヌ子宮内膜における付着菌数の変化を調べるとともに、各種糖と糖分解酵素の添加が大腸菌付着に及ぼす影響を調べ、その付着性状を解析した。その結果から、イヌ子宮内膜への大腸菌の付着菌数は、MUC1 発現とは逆に、発情休止期 10 日に他の時期と比較して増加することを明らかにした。またこの付着が、上皮細胞に存在するマンノースレセプターを介している可能性を示した。

3. トランスフェリンファミリーに属する鉄結合性糖蛋白質であり、殺菌作用を持つ物質として知られているラクトフェリン (LF) の発現と子宮蓄膿症発生との関係を検討するために、発情周期中および子宮蓄膿症のイヌ子宮における LF 発現を RT-PCR 法および免疫組織染色法によって調べた。その結果から、イヌ子宮内膜における LF 発現は、発情前期および発情期で上昇し、発情休止期から無発情期の間で低下することを明らかにした。また、子宮蓄膿症罹患犬では、LF は細菌感染に反応して上皮細胞と好中球に発現し、イヌ子宮内の細菌除去に働いている可能性を示した。

4. [³H]-thymidine の取り込み量を指標に、大腸菌刺激による発情周期中のイヌ末梢血単核球の増殖反応とそれに及ぼす卵巣ホルモンの効果を調べた。また、細菌感染はリンパ球におけるインターフェロン γ (IFN γ) の産生を刺激して細胞性免疫を活性化させるので、大腸菌で刺激したイヌ末梢血単核球における IFN γ 発現に及ぼす卵巣ホルモンの効果を RT-PCR 法および ELISA 法を用いて調べた。その結果から、子宮蓄膿症由来大腸菌刺激による抗原特異的な末梢血単核球の増殖反応は、発情期に上昇し、発情休止期 10 日で低下することを明らかにした。また、この反応と大腸菌によって刺激された末梢血単核球における IFN γ 発現が、エストロゲンによって上昇し、プロゲステロンによって低下することを示した。

以上、本研究では、雌イヌの発情周期中に感染防御能が変化することを明らかにした。特に、発情休止期 10 日頃に子宮内膜における局所的な感染防御因子の発現や全身の細胞性免疫能が低下することが示され、これが同時期におけるイヌ子宮蓄膿症の発生頻度の上昇に結びつく可能性を示唆している。これらの研究成果は、繁殖障害の研究に新しい方向性を示すとともに、獣医繁殖学の分野に貢献するところが大きいと評価される。よって、本論文の審査ならびに学力確認の結果と併せて、博士 (獣医学) の学位を授与することを適当と認める。