J. Rakuno Gakuen Univ., 30 (1) : 5～14 (2005)

乳牛の妊娠に伴う末梢血中免疫グロブリン濃度変化と繁殖障害発症との関連

中田　健[1)*]・石川行一[1)]・佐藤太郎[2)]
森好政晴[1)]・澤向　豊[1)]

Relationship between Peripartum Peripheral Immunoglobulin Concentrations and Occurrence of Reproductive Disorders in Cows

Ken NAKADA[1)], Yukikazu ISHIKAWA[1)], Taro SATO[2)],
Masaharu MORIYOSHI[1)] and Yutaka SAWAMUKAI[1)]
(June 2005)

緒　　言

乳牛の周産期の生殖機能は，内分泌，免疫，そして栄養の相互関与により制御され，その中でも性ホルモンが重要な役割を果たすと考えられている。性ステロイドホルモンのプロジェステロンとエストラジオール-17βは妊娠維持および分娩発来に重要な役割を担っている[4]。

産婦人科領域では，不妊治療および避妊処置のための研究に，内分泌学に加えて免疫学が取り入れられ，妊娠成立には免疫が関与することが明らかにされている[10,11,13]。しかしながら，家畜の生殖免疫に関する報告は少ない。

牛の胎子の組織適合性抗原の半分は雄側に由来しているため，通常の生体反応では母体は同種移植片を拒絶する反応を起こすことになる。しかし，実際にはそのような反応を示すことなく，子宮内で約9ヵ月間の発育を継続する。この事象は，従来の移植免疫学では説明できず，何らかの特殊な免疫学的妊娠維持機構の存在が考えられる。

免疫調節物質の一種であるサイトカインは，造血系，内分泌系，神経系などの生命現象に深く関わり，各種臓器の免疫担当細胞以外の上皮細胞や間質細胞からも分泌され，生体機能を調節・制御する因子である。妊娠の維持に重要な役割を果たすサイトカインの大半は母体の活性化リンパ球から産生される。したがって，免疫担当細胞は胎子を認識し，活性化することで，妊娠が維持される[10,11]。免疫担当細胞である$CD4^+$ヘルパーT細胞は分泌するサイトカインの相違により，1型ヘルパーT細胞(Th 1)と2型ヘルパーT細胞（Th 2）に区分され，前者は主に細胞性免疫，そして後者は液性免疫機能を有することが知られている[8]。近年，産婦人科領域においてサイトカインであるインターロイキン(IL-)2，TNF-α，IFN-γなどを産生するとともにB細胞からIgG 2などの免疫グロブリンの産生を促し，細胞性免疫を誘導するTh1細胞，およびIL-4，IL-5，IL-6，IL-10，IL-13などを産生するとともにB細胞からIgG 1などの産生を促し，抗体産生を誘導するTh 2細胞の免疫作用の活性化が報告されている[8]。マウスでは，Th 1細胞よりもTh 2細胞が優位に立つことが妊娠維持に必要とされている[13,14]。このTh 2は，液性免疫に関与するIL-4，IL-5，IL-10，IL-6などを分泌するため，これらのサイトカインが妊娠維持に関与すると考えられる。一方，Th 1細胞は，流産や移植片拒絶反応などの促進に関与し，主にIL-2，インターフェロンγ（IFN-γ），腫瘍壊死因子α（TNF-α）などを分泌する。Th 1細胞とTh 2細胞には相互の機能を調節する性質があり，Th 1細胞から産生されるIFN-γはTh 2細胞の作用を抑制する[20]。

近年，プロジェステロンの妊娠維持作用の少なくとも一部はサイトカインの反応を介することが明ら

1) 酪農学園大学獣医学部生産動物医療学教室
Department of Large Animal Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan
2) 新潟県農業総合研究所　畜産研究センター　繁殖工学科
Livestock Research Center, Niigata Agricultural Research Institute, Tanahire, Shitada, Minamikanbara, Niigata 955-0046, Japan
＊連絡著者：中田　健
Correspondence: K. Nakada

かにされている。すなわち，未分化な Th 0 細胞がプロジェステロンレセプターを発現し，プロジェステロンの存在下で液性免疫作用を有する Th 2 細胞に分化することが報告されている[12]。また，プロジェステロンは脱落膜の免疫細胞に作用して，プロスタグランディン E 2（PGE 2）やマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）の産生を促進する。PGE 2 は Th 2 の強い誘導因子であり，この Th 2 細胞は IL-4，IL-6 を分泌する。人では IL-4，IL-6 または M-CSF が胎盤の絨毛膜に作用して合胞体性栄養膜細胞からヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）の合成，放出を促進する。この hCG はプロジェステロンの産生を促進することから，正のフィードバックを形成する[10,11]。人の子宮平滑筋に存在する血小板活性化因子（PAF）受容体は子宮収縮作用を持ち，これを不活性化する PAF-アセチルハイドロレース（PAF-AH）が存在し，PAF 活性を調節している。菌体成分であるリポポリサッカライド(LPS)，サイトカインである IL-1，IFN-γ，TNF-α，IL-6，IL-8，顆粒球-コロニー刺激因子（G-CSF）およびトランスフォーミング増殖因子-β（TGF-β），ステロイドホルモンであるエストラジオール-17 β，そしてデキサメサゾンなどは PAF-AH 活性を抑制し，PAF 活性を高め，子宮収縮が誘導される。一方，サイトカインの M-CSF と IL-10，そして，プロジェステロンは，逆に PFA-AH 活性を増強して分娩を抑制することが明らかにされている[16]。

乳牛の周産期には胎盤停滞，子宮内膜炎，あるいは卵胞発育障害，卵胞嚢腫などの卵巣機能異常が発症する。通常，胎盤停滞の発症率は 7～15％とされ，分娩後 12 時間を経過しても胎子胎盤が母胎盤から剥離せず，子宮腔に残存している状態をいう[15]。胎盤停滞を発症すると，大半は子宮内膜炎や子宮蓄膿症などを継発するため，子宮修復が遅延し，分娩間隔の延長をもたらす。胎盤停滞の原因として，解剖学的要因，遺伝的要因，栄養および妊娠末期におけるプロジェステロンの不足などが考えられているが，その原因はいまだ解明されていない[1]。卵胞発育障害は，卵巣に明瞭な卵胞の発育がないため，排卵が起こらず発情周期を回帰しない疾病で，多くは分娩後 15～45 日に発症する。その原因として，視床下部や下垂体におけるエストラジオール-17 β レセプターを持つ細胞数の減少によるエストラジオール-17 β 結合反応が低下し，その刺激による LH サージが起こらないこと，その誘因として泌乳量を高めるための濃厚飼料の多給および周囲のストレッサーなどが考えられている[2,6]。これらの生殖器疾病によって，初回授精までの日数は延長し，生涯の生産性は必然的に低下する。

乳牛の産後疾病の予防，早期診断そして予防のための対処法の開発は重要な課題であり，そのためには，妊娠期間中に発症が予知できる因子の発見が求められている。人ならびに齧歯類の報告[21,22]と同じく，牛においても妊娠期ならびに周産期の生殖関連ホルモン，サイトカイン，成長因子などが局所または全身性に作用し，胎盤発育，胎子排除の回避，分娩，胎盤の排除ならびに感染防御に重要な役割を果たしていることが考えられる。特に，分娩後に子宮内免疫系でヘルパー T 細胞の Th 2 細胞優勢から Th 1 細胞優勢に移行することが，その後の感染防御に対して重要であると考えられる。Ishikawa ら[3]は，乳牛の妊娠後期の IL-6 濃度変化と分娩後の繁殖障害発症との関連性を示唆する報告をしている。しかし，Th 1 細胞および Th 2 細胞両者のバランスおよび関係を検討する必要があると考えられる。

したがって，本研究では，免疫学的指標として血中 IgG 1 および IgG 2 の動態を観察し，乳牛の分娩後に発症した胎盤停滞，子宮内膜炎および卵胞発育障害，卵胞嚢腫などの卵巣機能異常と分娩前後の血中 IgG 1 および IgG 2 動態との関係を解析した。

材料および方法

1．供試動物

本学附属農場，岩手県農業研究センター畜産研究所および新潟県農業総合研究所畜産研究センターで繋養されているホルスタイン種雌牛をそれぞれ 76 頭，22 頭，24 頭を用いた。これらの平均産次数は 2.5±0.3 産であった。なお，IgG 1 および IgG 2 濃度の測定には本学付属農場で繋養されている供試牛のうち 27 頭を使用した。これらの平均産次数は 2.5±0.4 産であった。なお，いずれの供試牛の飼養形態も TMR 給餌であった。

供試牛は分娩後の胎盤停滞あるいは子宮内膜炎発症状況から以下のように区分した。

①正常群：分娩後 60 日までの間に胎盤停滞，子宮内膜炎のいずれも発症しなかった個体。
②胎盤停滞群：胎盤停滞を発症した個体。
③子宮内膜炎群：子宮内膜炎を単独で発症した個体。

なお，胎盤停滞処置後に子宮内膜炎を併発した個体は胎盤停滞群に含めた。

また，同供試牛は分娩後の血中プロジェステロン濃度の推移から以下のように区分した。

①卵巣機能正常群：分娩後 30 日以内の血中プロジェステロン濃度が 1.0 ng/ml 未満から 1.0 ng/

ml以上に上昇し，その後は正常な発情周期を繰り返した個体。

②回復遅延群：31～60日までに1.0 ng/ml未満から1.0 ng/ml以上に上昇し，その後は正常な発情周期を繰り返した個体。

③機能異常群：分娩後60日までの間に卵胞発育障害あるいは卵胞嚢腫発症のため1.0 ng/ml未満から1.0 ng/ml以上に上昇しなかった個体。

なお，発情周期はプロジェステロン濃度の増減により判定した。

2．実験方法

⑴　血液採取

血液は分娩予定日前60日，30日，21日，および14日，それ以降は分娩後60日まで2日間隔で正中尾静脈より採取した。血液は4℃で一夜静置した後，3,000 rpmで15分間遠心分離を行い，その血清を各項目の測定に供するまで－20℃以下で凍結保存した。また，ステロイドホルモン測定のためにヘパリンナトリウム加真空採血管を用いて採取後，直ちに3,000 rpmで20分間遠心分離を行い，その血漿を各項目の測定まで－20℃以下で凍結保存した。

⑵　ステロイドホルモンの酵素免疫測定（EIA）

血中のプロジェステロン，エストラジオール-17βおよびコルチゾール濃度はPrakash［36］の方法を改良した2抗体酵素免疫測定法によって測定した。プロジェステロン測定の第1抗体にウサギ抗プロジェステロン-3-（O-carboxy-methyl）oxime（CMO）血清（20071360, Biogenesis, Poole），標準物質にはプロジェステロン（SIGMA, St. Louis），また，標識抗原としてプロジェステロン-3-CMO（SIGMA，P 3277）をホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）（SIGMA-ARDRICH, P 6782）標識したもの（HRP-プロジェステロン）を使用した。エストラジオール-17β濃度測定には第1抗体にアメリカ，コロラド州立大学のG.D. Niswender博士より提供されたヒツジ抗エストラジオール-17β血清（GDN ＃255）使用した。また標準物質としてエストラジオール-17β（E 1132, SIGMA, St. Louis），標準抗原としてエストラジオール-17β-6-CMO（K 2126, SIGMA, St. Louis）にHRPを標識したもの（HRP-エストラジオール-17β）を使用した。コルチゾール測定の第1抗体には牛血清アルブミン（BSA）を結合させたコルチゾール（Cortisol-3-CMO-BSA; Steraloids Inc., Wilton, NH.）をウサギに免役して作成したウサギ抗コルチゾール血清（GM-2）を使用した。標準物質にコルチゾール（SIGMA, St. Louis），また標識抗原としてコルチゾール-3-CMOにHRPを標識したもの（HRP-コルチゾール）を使用した。Ca^{++}，Mg^{++}不含のダルベッコ-PBS（D-PBS）に0.1％牛血清アルブミン（BSA，SIGMA，St. Louis）と0.01％チメロザル（SIGMA, St. Louis）を加えたものを測定用緩衝液とし，D-PBSに0.05％ツィーン80（キシダ化学，大阪）を加えたものをプレート洗浄液とした。プロジェステロンとコルチゾール測定には96穴アッセイプレート（Costerハーフエリアプレート3690，コーニングインターナショナル㈱，東京）にヤギ抗ウサギIgG血清（Jackson, Pennsylvania），またエストラジオール-17β測定には96穴アッセイプレートにウサギ抗ヒツジIgG血清をコーテイングした後，ブロッキングを行ったものを用いた。

各ホルモンの試料の調整と測定法は以下のとおりである。

1）プロジェステロン

血中プロジェステロンの抽出はジエチルエーテルによる一回抽出法で行った。すなわち，500 μlの血清を13×100 mmのガラス試験管に分注し，ジエチルエーテル2.5 mlを加え，5分間振盪させた後，5分間静置した。次に，メタノールを冷媒としたクライオクールに浸し水層を凍結させ，エーテル層を抽出して測定用試験管（12×75 mm）に移した。試験管は50℃に加温した恒温槽で乾固させた後，500 μlのジエチルエーテルを加え，室温に戻してから，測定用緩衝液500 μlに抽出物を溶解させEIAに供した。抗ウサギIgGコーティングプレートは洗浄液による3回洗浄を行った後，測定用緩衝液で希釈した標準品の希釈液50 μl，あるいはサンプル抽出液50 μlをウェル内に添加した。各ウェルに測定用緩衝液で30,000倍希釈した抗プロジェステロンを50 μlずつ加えた。さらに，測定用緩衝液で20,000倍希釈したHRPプロジェステロンを50 μlずつ加え，室温で24時間保持した。各ウェルは洗浄液による3回洗浄を行った後，TMB（3, 3’, 5, 5’-tetramethylbenzidine, Roche, Indianapolis）溶液を100 μlずつ加え，室温で1時間保持した。これに反応停止液（2 N-H_2SO_4）を50 μl加え，反応溶液の吸光度はマイクロプレートリーダー（MTP-100，コロナ電気，東京）を用い，波長450 nmで測定した。

2）エストラジオール-17β

血中エストラジオール-17βはプロジェステロンと同様にジエチルエーテルによる一回抽出法で行った。すなわち，抗ヒツジIgGコーティングプレートを洗浄液により3回洗浄を行った後，測定用緩衝液

で希釈した標準品の希釈液 50 μl, あるいはサンプル抽出液 50 μl をウェル内に添加した。各ウェルにアッセイ緩衝液で 2,000,000 倍希釈した抗エストラジオール-17β を 50 μl ずつ加え，これを 32℃で 24 時間静置した。その後，測定用緩衝液で 10,000 倍希釈した HRP-エストラジオール-17β を各ウェルあたり 50 μl ずつ加え，32℃で 5 時間保持した。各ウェルは洗浄液による 6 回洗浄を行い，TMB 溶液を各ウェルあたり 100 μl ずつ加え，室温で 1 時間保持した。これに反応停止液を 50 μl 加え，反応溶液の吸光度はマイクロプレートリーダーを用い，波長 450 nm で測定した。

3）コルチゾール

血中コルチゾールの抽出は，プロジェステロンの測定と同じく，ジエチルエーテルによる一回抽出法で行った。すなわち，抗ウサギ IgG コーティングプレートを洗浄液により 3 回洗浄を行った後，測定用緩衝液で希釈した標準品の希釈液 50 μl, あるいはサンプル抽出液 50 μl をウェル内に添加した。各ウェルに測定用緩衝液で 250,000 倍希釈した抗コルチゾールを 50 μl ずつ加え，さらに測定用緩衝液で 20,000 倍希釈した HRP-コルチゾールを各ウェルあたり 50 μl ずつ加え，室温で 24 時間保持した。その後，洗浄液で 3 回洗浄を行い，TMB 溶液を各ウェルあたり 100 μl ずつ加え，室温で 1 時間保持した。これに反応停止液を 50 μl 加え，反応溶液の吸光度はマイクロプレートリーダーを用い，波長 450 nm で測定した。

(3) IgG 1 および IgG 2 濃度測定

IgG 1 および IgG 2 は市販のキット（Bovine IgG 1, IgG 2 VET-RID Kit, BETHYL LABORATORIES, INC.）を用いて測定した。

3. 統計処理

それぞれの測定値は平均値±標準誤差で示した。同一グループ内の平均値の比較は Duncan's new multiple range test, また異なる 2 群の平均値の解析には Student's t-test および Welch t-test を用いた。

結　　果

1. 分娩前後の血中ステロイドホルモン濃度の変化

プロジェステロン濃度は，分娩前 60 日に 5.6±0.3 ng/ml を示し，その後も高値で推移したが，分娩前 3 日には 2.6±0.2 ng/ml まで低下し，分娩当日はさらに 0.3±0.1 ng/ml まで低下した。なお，分娩後は 24 日まで 1.0 ng/ml 以下の低値で推移した（図 1 a）。

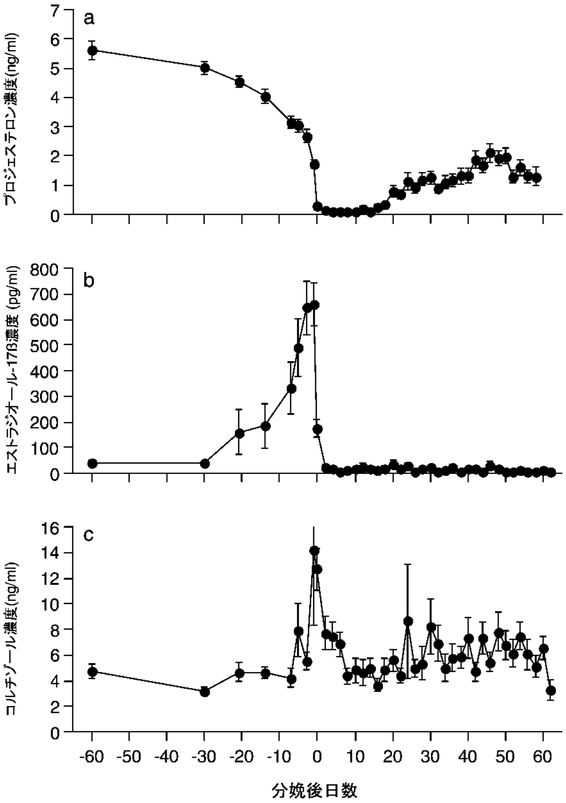

図 1　乳牛の分娩前後の血中プロジェステロン，エストラジオール-17β およびコルチゾール濃度の変化 0 は分娩日を示す。データはプロジェステロン：n＝122，エストラジオール-17β：n＝91，コルチゾール：n＝98 の平均±標準誤差を示す。

エストラジオール-17β 濃度は，分娩前 60～30 日まで 40.6～41.5 pg/ml の範囲で推移したが，分娩前日に急激な上昇を認め，最高値の 658.9±85.2 pg/ml に達した。分娩後 2 日には 22.3±11.0 pg/ml まで低下した（図 1 b）。

コルチゾール濃度は分娩前 60 日～7 日まで 3.2～4.7 ng/ml の範囲で推移したが，分娩前 5 日頃から上昇を示し，分娩前日には最高値の 14.3±5.8 ng/ml に達した。分娩後 8 日には 4.3±0.6 ng/ml の低値となり，分娩前日と比較し，有意な低下を認めた（P＜0.05）。その後，分娩後 60 日までは 3.6±0.5～7.8±1.5 ng/ml の範囲で推移した（図 1 c）。

2. 分娩前後の血中 IgG 1 および IgG 2 濃度の変化

IgG 1 濃度は分娩前 60 日に 701±110 mg/dl を示したが，分娩当日には 340±93 mg/dl となり，有意な低下を示した（P＜0.05）。分娩後は 14 日に 492±62 mg/dl まで上昇した（図 2 a）。IgG 2 濃度は分娩前 60 日に 1979±209 mg/dl，また分娩当日には 2150±226 mg/dl を示したが，分娩後 14 日には

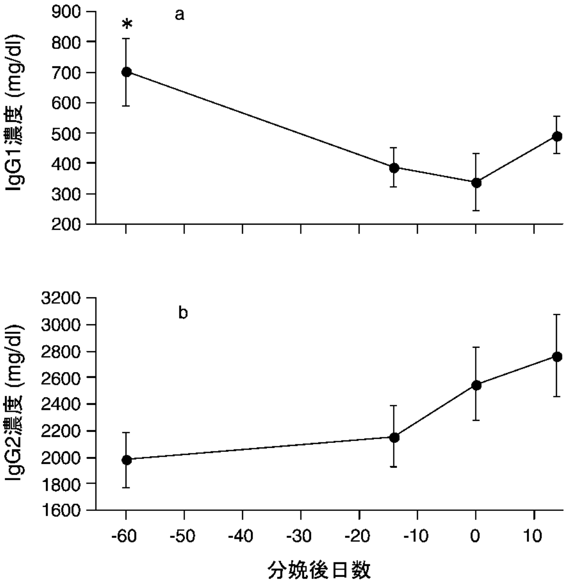

図２　乳牛の分娩前後の血中 IgG 1 および IgG 2 濃度の変化
0 は分娩日を示す。データは n＝21 の平均±標準誤差で示す。＊：分娩日と有意差あり（P＜0.05）。

2776±310 mg/dl まで上昇した（図 2 b）。

3．胎盤停滞牛と子宮内膜炎発症牛の分娩前後の血中ステロイドホルモン濃度の変化

(1)　プロジェステロン

プロジェステロン濃度は，分娩前 4 日までいずれの群においても 1.0 ng/ml 以上の高値で推移したが，分娩前日から分娩当日にかけて急激な低下を示した。胎盤停滞群および子宮内膜炎群は正常群と比較し，やや低値で推移する傾向が認められた（図 3 a, b）。正常群のプロジェステロン濃度は分娩後 20 日に 1.0±0.3 ng/ml まで上昇し，その後は 1.0 ng/ml 以上で推移したのに対し，胎盤停滞群は分娩後 36 日を除いて 46 日まで 1.0 ng/ml 以下の低値で推移した。子宮内膜炎群は分娩後 30 日に 1.3±0.6 ng/ml まで上昇し，それ以降は正常群と同じような増減の動態を示した。

(2)　エストラジオール-17 β

エストラジオール-17 β 濃度は，分娩前 60 日から分娩前 21 日までいずれの群においても低値で推移したが，それ以降は上昇の傾向を認め，分娩前日に最高値を示した（図 4 a, b）。そのうち，子宮内膜炎群は分娩前に正常群と比較し，やや高値で推移する傾向が認められた。なお，いずれの群のエストラジオール-17 β 濃度も分娩翌日から低下を示した。

(3)　コルチゾール濃度の変化

正常群のコルチゾール濃度は，分娩前 60 日から 3 日まで緩やかな上昇を示したが，分娩前日から急激な上昇を認め，分娩当日に最高値となり，分娩後 2 日から低下した。胎盤停滞群は分娩前日まで正常群よりやや低値を示した（図 5 a）。また，子宮内膜炎群も，分娩前 60 日の 5.0±1.8 ng/ml を除き，分娩前日まで正常群より低い値を示した（図 5 b）。しかし，胎盤停滞群および子宮内膜炎群と正常群の分娩前コルチゾール濃度の推移には有意な差がみられなかった。また，分娩当日のコルチゾール濃度も，正

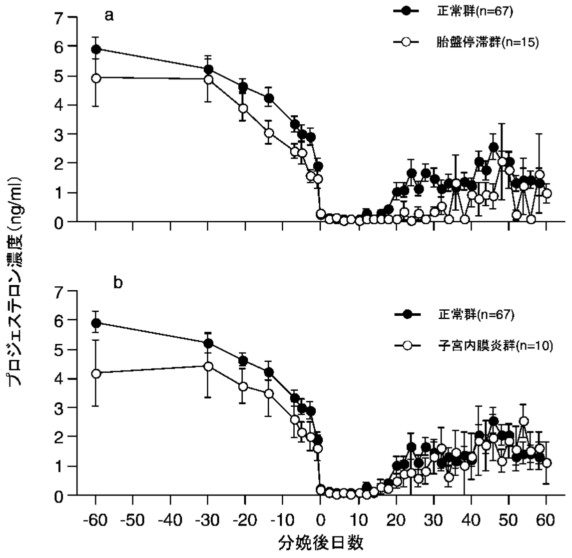

図３　正常群と胎盤停滞群，子宮内膜炎群の分娩前後の血中プロジェステロン濃度変化の比較
0 は分娩日を示す。データは平均±標準誤差で示す。

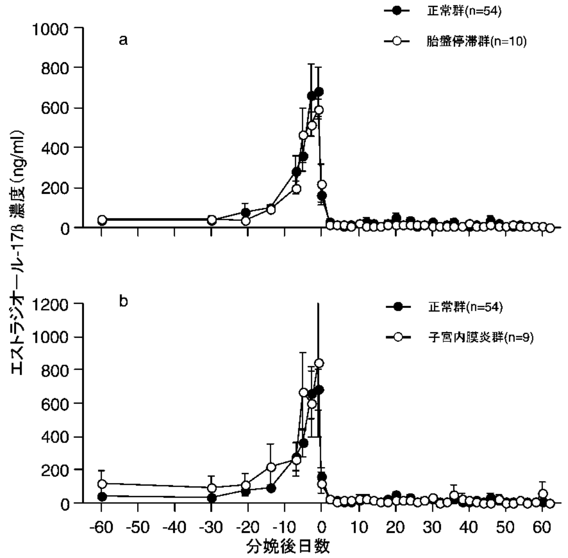

図４　正常群と胎盤停滞群，子宮内膜炎群の分娩前後の血中エストラジオール-17 β 濃度変化の比較
0 は分娩日を示す。データは平均±標準誤差で示す。

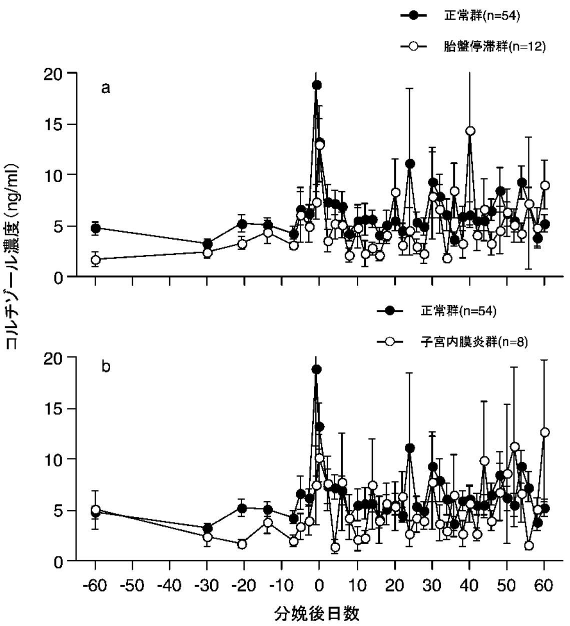

図５　正常群と胎盤停滞群，子宮内膜炎群の分娩前後の血中コルチゾール濃度変化の比較
0は分娩日を示す。データは平均±標準誤差で示す。

常群で18.9±10.6 ng/ml，胎盤停滞群で13.0±3.7 ng/ml，そして子宮内膜炎群では9.4±2.5 ng/mlを示し，3群間に有意な差は認められなかった(図5)。

4．胎盤停滞牛と子宮内膜炎発症牛の分娩前後のIgG 1およびIgG 2濃度の変化

正常群の分娩前60日のIgG 1濃度は828±169 mg/dlを示したが，分娩当日には366±213 mg/dlまで低下した。しかし，分娩後14日には470±113 mg/dlまで上昇した。胎盤停滞群の分娩前60日は419±85 mg/dlを示し，正常群と比較して有意に低く（P<0.05)，それ以降も分娩後14日まで低値で推移した（図6 a)。子宮内膜炎群では分娩前14日の393±178 mg/dlを除き，正常群より高く推移する傾向を示したが，有意な差は認められなかった（図6 b)。

IgG 2濃度は正常群で分娩前60日に1,601±308 mg/dlを示したが，分娩当日には最高値の3,145±510 mg/dlまで上昇した。胎盤停滞群の分娩前60日のIgG 2濃度は2,450±350 mg/dlを示し，正常群と比較して，高値であった。しかし両群の間に有意な差は認められなかった。なお，分娩前14日から分娩当日までは大きな変化を示すことなく推移した（図6 c)。子宮内膜炎群では分娩前60日から分娩後14日まで1,700 mg/dl前後を推移し，分娩前14日から分娩後14日までは正常群と比較し，低値を示したが，有意な差は認められなかった（図6 d)。

5．卵巣機能異常牛の分娩前後の血中IgG 1およびIgG 2濃度の変化

正常群の分娩前60日と14日のIgG 1濃度は回復遅延群および機能異常群と比較して高値を示した（図7 a)。また，正常群の分娩前60日のIgG 1濃度は機能異常群と比較し，有意に高かった(P<0.05)。正常群の分娩前60日のIgG 2濃度は他の2群と比較して低値を示したが，分娩当日には上昇を認めた。しかし，供試期間の機能異常群のIgG 2濃度は正常群と比較して有意差を認めなかった（図7 b)。

考　　察

供試牛の血中プロジェステロン濃度は，分娩前60日から高値で推移したが，分娩前日から急激な低下を認め，分娩当日には0.3±0.1 ng/mlまで低下した。そして，分娩後24日までは1.0 ng/ml以下の低値で推移した。また，エストラジオール-17β濃度は分娩前60～21日まで低値を示したが，その後ゆるやかな上昇を認め，分娩前10日から分娩前日までは急激な上昇を示し，これらの結果はSmithら[17]の報告と一致した。分娩後のプロジェステロン濃度は24日以降から1.0 ng/ml以上に上昇したが，これは卵巣機能の回復に伴い，新たな黄体が形成されたことを示す。コルチゾール濃度は分娩前5日頃から上昇を認め，分娩前日は最高値の14.3±5.8 ng/mlに達したが，分娩当日から顕著な低下を示した。これらの結果は，Thorburnら[19]の報告と同様であり，プロジェステロン濃度の低下に伴うエストラジオール-17β濃度の増加は成長した胎子から産生されたコルチゾールが母胎盤中17α-ヒドロキシラーゼなどのホルモン変換酵素を活性化させ，エストラジオール-17βへの変換を促進していることを支持するものであった。

近年，産婦人科領域においてサイトカインであるIL-2，TNF-α，IFN-γなどを産生するとともにB細胞からIgG 2などの免疫グロブリンの産生を促し，細胞性免疫を誘導するTh 1細胞およびIL-4，IL-5，IL-6，IL-10，IL-13などを産生するとともにB細胞からIgG 1などの産生を促し，抗体産生を誘導するTh 2細胞の免疫作用の活性化が報告されている[8]。従来から，妊娠の維持は免疫の抑制によると考えられていたが，最近の研究において人の脱落膜組織のリンパ球が活性化することにより，多くのサイトカインを分泌することが明らかになった。分娩前60日のIgG 1濃度は分娩当日と比較し，有意に高

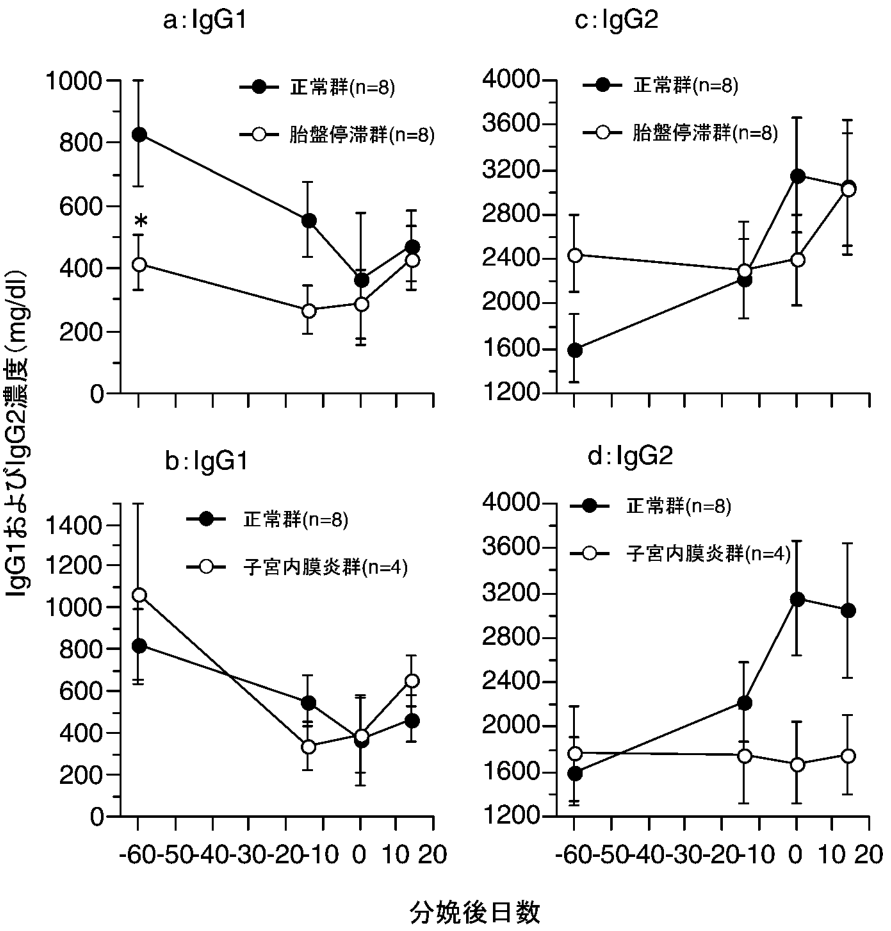

図６ 正常群と胎盤停滞群，子宮内膜炎群の分娩前後の血中 IgG 1 および IgG 2 濃度変化の比較
0 は分娩日を示す。データは平均±標準誤差で示す。＊：正常群との間に有意差あり（P<0.05)。

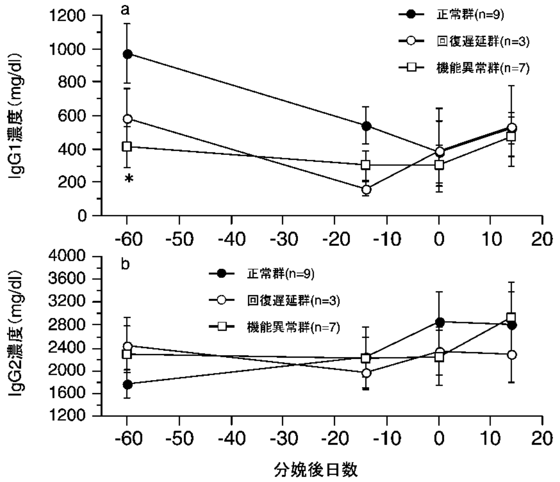

図７ 卵巣機能正常群，回復遅延群および機能異常群の分娩前後の血中 IgG 1 および IgG 2 濃度変化の比較
0 は分娩日を示す。データは平均±標準誤差で示す。＊：正常群との間に有意差あり（P<0.05)。

く，IgG 2 濃度は分娩後に上昇傾向を示した。これらの結果は，妊娠期に免疫が抑制されているのではなく，活性状態にあり，さらに液性免疫である Th 2 細胞が優位になっていると考えられ，分娩に伴って液性免疫から細胞性免疫優位の環境に変換する可能性を示唆している。すなわち，分娩当日と比較し，分娩後 2 週には IgG 1 濃度は増加し，また IgG 2 濃度も増加していることから，分娩後 1～2 週で妊娠に伴う特異的な免疫機構から通常の状態に回復することが推察された。これらの結果は，IL-6 濃度が妊娠期に高く，分娩後に低くなることから分娩を境に免疫環境が変化することを示した Ishikawa ら[3] の報告を支持するものであった。

牛の胎盤停滞発症の原因は現在まで明確にされていないが，一般的に高泌乳量，乾乳期過肥，運動不足，胎盤の未熟などが誘因とされている[1]。プロジェステロンは子宮内膜の着床性を誘起するとともに，子宮平滑筋の自発的収縮を抑制して，胚の着床に適した環境を作り，妊娠の維持に重要な役割を果た

す[9]。また，プロジェステロンの作用として，NK細胞の活性を抑制するとともにTh 0細胞からTh 2細胞の変化を誘導し，IL-6，IL-4などのサイトカインを放出することが知られている[10,11]。人ではIL-6やIL-4が絨毛に作用し，hCG分泌を促進する。hCGはプロジェステロンに対して正のフィードバック作用を有し，分泌を促している[10,11]。したがって，妊娠期間におけるプロジェステロンとhCGは高濃度で推移することから，両者の間に何らかの関係があると考えられている。胎盤停滞牛では，分娩前60日間の血中プロジェステロンおよびIgG 1濃度が低く推移したことから，何らかの胎盤機能異常が発生に関与するものと考えられる。胎子はその組織適合性抗原の50％が父親由来であることから，母体には同種移植片である。したがって，胎子は母体から拒絶されるべきであるが，それを抑制する特殊な免疫学的妊娠維持機構が存在し[18,23]，それを誘発する胎子胎盤側からの信号として主要組織適合性抗原（MHC）クラスⅠ分子が考えられている[18]。Joostenら[5]は牛の胎盤停滞発症の要因として，MHCクラスⅠ分子の適合性に関する報告を行っている。胎子胎盤からのMHCの発現は同種移植片としての受胎産物が拒絶されない役割を果たすと考えられ，母体と胎子の間の適合性が高いほど胎盤停滞の発生率が高くなると報告している。今回の結果では，胎盤停滞群の分娩前の血中IgG 1濃度は正常群と比べ低値で，IgG 2濃度は高値で推移した。Ishikawaら[3]は胎盤停滞を示した牛の分娩前のIL-6濃度が正常群より低値で推移すること報告している。これらのことから，母体の受胎産物に対する同種移植片としての反応が低く，分娩に至るまでの期間の免疫系の変換が正常に進まず，分娩後の胎盤排出を妨げることが胎盤停滞の発症に関連していることが推察される。特に，胎盤停滞群の分娩前のIgG 1濃度は正常群と比較し，有意に低値であることが判明した。したがって，分娩前60日頃の血中IgG 1濃度を測定することにより，胎盤停滞の予知に応用できる可能性が示唆された。

牛の子宮における細菌感染の成立および子宮内膜炎の発症には，性ステロイドホルモンの分泌が密接に関連している[27]。子宮内膜炎発症牛の分娩前2週の血中IgG 1濃度は正常群と比較し低く，IgG 2濃度は高く推移する傾向を示した。また，分娩後14日まで正常群と比較し，IgG 2は明らかに低値で推移した。Ishikawaら[3]は子宮内膜炎を発症した牛の分娩前後のIL-6濃度が正常群より高値で推移すること報告している。これらのことは，子宮内膜炎を発症する牛は，分娩後にTh 2型からTh 1型優勢の免疫状態への変換が不十分であることが推察される。本来ならば，分娩後はTh 2型からTh 1型優勢の感染防御機構に切り換わり，細胞性免疫応答による感染体の排除，あるいは抗体産生による病原体の排除が行われる。しかし，Th 2からTh 1への変換が不完全であったため，この機構が作用せず，子宮内膜炎を発症する原因の一つになったと考えられる。

卵巣機能回復遅延群および機能異常群の分娩前の血中IgG 1濃度は正常群に比較して低値で推移した。これは両群の免疫系の異常が分娩前から少なからず起こっていたことを示し，それがを引き金となり，卵巣機能の回復を遅らせた原因の一つと考えられた。特に，機能異常群の分娩前60日のIgG 1濃度は正常群と比較し，有意に低値であった。したがって，分娩前60日頃に血中IgG 1濃度を測定することにより，分娩後の卵巣発育障害・卵胞嚢腫などの卵巣機能異常を予知する可能性が示唆された。

これらのことから，分娩後の胎盤停滞，子宮内膜炎および卵胞発育障害・卵胞嚢腫などの卵巣機能異常の乳牛では分娩前の免疫グロブリン濃度に異なる変化があることが判明した。妊娠維持と分娩には免疫関連物質と各種ホルモンやその他の因子が相互的に作用していることから，分娩前60日頃に血中IgG 1およびIgG 2濃度を測定することにより，分娩後の繁殖障害発症を予知できる可能性が示唆された。

要　　約

乳牛では，いわゆる周産期疾病の発症率が高く，産後疾病の予防，早期診断・対処法の開発は重要な課題である。そのためには妊娠期間中の定期的な検診などによる危険因子の早期摘発と早期排除のための判定指標が必要である。したがって，乳牛の妊娠期間の胎盤機能および免疫機能と分娩後の繁殖障害発症との関係を明らかにすることを目的に実験を行った。

乳牛の分娩前後における血液中のステロイドホルモンであるプロジェステロン，エストラジオール-17βおよびコルチゾール，免疫項目としてIgG 1およびIgG 2濃度の測定を行った。そして，分娩後の胎盤停滞，子宮内膜炎および卵巣機能異常の発症と分娩前後の血中ステロイドホルモン，IgG 1およびIgG 2濃度の変化との関連を調べた。胎盤停滞群の分娩前60日のIgG 1濃度は正常群と比較し，有意な低値を示し，Th 2型免疫とTh 1型免疫の均衡が崩れたことと考えられた。また，子宮内膜炎群の分娩前2週

のIgG 1濃度は正常群と比較して低値で，また，分娩前7日から分娩後14日までのIgG 2濃度は低値を示した。以上の結果から，乳牛の分娩後の胎盤停滞，子宮内膜炎および卵胞発育障害・卵胞嚢腫などの卵巣機能異常の発症には分娩前の免疫機能の異常が関連していることが示唆された。

したがって，乳牛の分娩前60日頃の血中IgG 1, IgG 2濃度の測定は分娩後の胎盤停滞の発症，また分娩前60日のIgG 1濃度の測定は卵巣機能異常の発生を予知する因子として有用であることが示唆された。

謝　辞

本研究の一部は，平成16年度酪農学園大学共同研究補助金の援助を受けたものである。

引 用 文 献

[1] Borsberry, S. and Dobson, H. 1989. Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds. *Vet Rec* 124: 217-219.

[2] Garverick, H.A. 1997. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci* 80: 995-1004.

[3] Ishikawa, Y., Nakada, K., Hagiwara, K., Kirisawa, R., Iwai, H., Moriyoshi, M. and Sawamukai, Y. 2004. Changes in interleukin-6 concentration in peripheral blood of pre- and post-partum dairy cattle and its relationship to postpartum reproductive diseases. *J Vet Med Sci* 66: 1403-1408.

[4] Johke, T., Fuse, H. and Oshima, M. 1971. Changes of plasma prolctin level during late pregnancy and early lactation in the goat and the cow. *Jap. J. Zootech. Sci.* 42: 173-179.

[5] Joosten, I., Sanders, M. F. and Hensen, E. J. 1991. Involvement of major histocompatibility complex class I compatibility between dam and calf in the aetiology of bovine retained placenta. *Anim Genet* 22: 455-463.

[6] Kawate, N., Yamada, H., Suga, T., Inaba, T. and Mori, J. 1997. Induction of luteinizing hormone surge by pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone analogue in cows with follicular cysts. *J Vet Med Sci* 59: 463-466.

[7] Lewis, G.S. 2004. Steroidal regulation of uterine immune defenses. *Anim Reprod Sci* 82-83: 281-294.

[8] Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M.A. and Coffman, R.L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348-2357.

[9] Okuda, K., Uenoyama, Y., Naito, C., Sakabe, Y. and Kawate, N. 1999. Luteinizing hormone receptors in the bovine corpus luteum during the oestrous cycle and pregnancy. *Reprod Fertil Dev* 11: 147-151.

[10] Piccinni, M.P., Maggi, E. and Romagnani, S. 2000. Role of hormone-controlled T-cell cytokines in the maintenance of pregnancy. *Biochem Soc Trans* 28: 212-215.

[11] Piccinni, M.P., Scaletti, C., Maggi, E. and Romagnani, S. 2000. Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy. *J Neuroimmunol* 109: 30-33.

[12] Robertson, S.A., Seamark, R.F., Guilbert, L. J. and Wegmann, T.G. 1994. The role of cytokines in gestation. *Crit Rev Immunol* 14: 239-292.

[13] Saito, S., Sakai, M., Sasaki, Y., Tanebe, K., Tsuda, H. and Michimata, T. 1999. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1: Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. *Clin. Exp. Immunol.* 117: 550-555.

[14] Saito, S., Tsukaguchi, N., Hasegawa, T., Michimata, T., Tsuda, H. and Narita, N. 1999. Distribution of Th1, Th2, and Th0 and the Th1/Th2 cell ratios in human peripheral and endometrial T cells. *Am J Reprod Immunol* 42: 240-245.

[15] Sandals, W.C., Curtis, R.A., Cote, J.F. and Martin, S.W. 1979. The effect of retained placenta and metritis complex on reproductive performance in dairy cattle − a case control study. *Can Vet J* 20: 131-135.

[16] Schafer-Somi, S. 2003. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review.

Anim Reprod Sci 75: 73–94.
[17] Smith, V.G., Edgerton, L.A., Hafs, H.D. and Convey, E.M. 1973. Bovine serum estrogens, progestins and glucocorticoids during late pregnancy parturition and early lactation. *J Anim Sci* 36: 391–396.
[18] Szekeres-Bartho, J. 2002. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol* 21: 471–495.
[19] Thorburn, G.D. 1992. The placenta, PGE2 and parturition. *Early Hum Dev* 29: 63–73.
[20] Tranchot-Diallo, J., Gras, G., Parnet-Mathieu, F., Benveniste, O., Marce, D., Roques, P., Milliez, J., Chaouat, G. and Dormont, D. 1997. Modulations of cytokine expression in pregnant women. *Am J Reprod Immunol* 37: 215–226.
[21] Vince, G.S. and Johnson, P.M. 1996. Is there a Th2 bias in human pregnancy? *J Reprod Immunol* 32: 101–104.
[22] Voisin, G.A. 1998. Immunology understood through pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 40: 124–129.
[23] Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L. and Mosmann, T.R. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 14: 353–356.

Summary

The objective of this study was to investigate the relationship between peripartum peripheral immunoglobulin concentrations and occurrence of postpartum reproductive disorders in cows. Blood samples were collected from 122 cows for 120 days before and after calving, and peripheral serum was analyzed for concentrations of IgG1, IgG2, progesterone, estradiol-17β and cortisol. The cows were divided post-partum into 3 groups according to reproductive diseases (retained placenta, endometritis, normal) or 3 other groups according to recovery of ovarian cyclicity (delayed, abnormal, normal) within 60 days of calving. Pre-calving IgG1 levels were significantly lower in the group with retained placenta than in the normal group ($P<0.05$). IgG2 levels around calving were lower in the endometritis group than in the normal group, and progesterone levels around calving were in the groups with retained placenta and endometritis than in the normal group. In the groups with delayed or abnormal cyclicity, the pre-calving IgG1 levels were lower than those in the normal group. Results of this study suggest that disorders in immunological and reproductive functions during late gestation have a causal relationship with reproductive disorders occurring post-partum in dairy cows. In conclusion, the levels of immunoglobulin and reproductive hormones measured during gestation may be useful markers for predicting postpartum reproductive disorders in cows.

Key words: Endometritis, IgG1, IgG2, Pregnancy, Retained placenta