

目次

| | 頁 |
|--|----|
| 緒言 | 3 |
| 第1章 滲出性子宮炎と子宮内膜炎を発症した牛の子宮から採取した <i>E. coli</i> の系統群グループ分類 | |
| I. 小緒 | 6 |
| II. 材料と方法 | 8 |
| 1. 供試動物 | |
| 2. 臨床検査 | |
| 3. 子宮内スワブ採取と細菌検査 | |
| 4. ゲノム DNA 抽出と PCR による <i>E. coli</i> の確認 | |
| 5. Triplex PCR | |
| 6. <i>E. coli</i> の系統分類 | |
| 7. 統計解析 | |
| III. 結果 | 13 |
| 1. 産後の子宮から分離された <i>E. coli</i> に関連する臨床症状 | |
| 2. <i>E. coli</i> の同定 | |
| 3. 分娩後の子宮から分離された <i>E. coli</i> とその系統的分布 | |
| IV. 考察 | 16 |
| V. 小括 | 19 |
| 第二章 滲出性子宮炎および子宮内膜炎に関連する <i>E. coli</i> の VF が臨床症状、繁殖成績、 <i>Trueperella pyogenes</i> (TP)との混合感染に与える影響 | |
| I. 小緒 | 20 |
| II. 材料と方法 | 21 |

| | |
|---|----|
| 1. 供試動物 | |
| 2. 臨床検査 | |
| 3. 子宮内スワブ採取と細菌検査 | |
| 4. ゲノム DNA 抽出と PCR による <i>E. coli</i> の確認 | |
| 5. RAPD-PCR | |
| 6. Virulence factor(VF)遺伝子の PCR | |
| 7. 統計解析 | |
| III. 結果 | 23 |
| 1. <i>E. coli</i> 同種異株の検出 | |
| 2. <i>E. coli</i> の VF の検出 | |
| 3. <i>E. coli</i> の VF と臨床症状 | |
| 4. <i>kpsMTII</i> の保有状況と TP 検出状況 | |
| IV. 考察 | 28 |
| V. 小括 | 33 |
| 総括 | 34 |
| 謝辞 | 35 |
| 引用文献 | 36 |
| 英文要旨 | 43 |
| 略語表 | 45 |

緒言

酪農において、牛が事故なく分娩を終え、その後泌乳を開始し、スムーズに泌乳最盛期を迎え受胎することは、個体管理上の重要な達成目標である。その過程で大きな障壁となるものの一つに子宮感染症がある。ほとんどすべての牛は、分娩直後に、弛緩した子宮頸部を通して外部環境から上行性に侵入してきた細菌によって子宮が汚染され感染する。子宮は分娩後 40 日目で約半数、60 日目で約 90% が常在細菌叢となるが[44]、細菌の排除がスムーズに行われない牛では子宮感染症が発症する。産後の子宮感染症は、産褥性および滲出性子宮炎、臨床型および潜在性の子宮内膜炎を引き起こし、空胎期間を延長させ、結果として繁殖成績の低下[20]や淘汰率の上昇[33]などの悪影響を及ぼす[16]。産褥性子宮炎は、子宮の肥大と赤褐色の水様性の子宮内分泌物を特徴とし、分娩後 21 日以内に全身疾患の兆候（乳量の減少、鈍痛、中毒症状）と 39.5°C 以上の発熱が見られる[47]。全身症状がない場合でも子宮角の異常な拡大と膿性の粘液を排出するものは滲出性子宮炎として分類される。また、多形核好中球の割合(PMN%)が分娩後 21~33 日では 18% 以上を、分娩後 34~47 日では 10% 以上を、子宮内膜炎とされている[29]。分娩後 40 日から 60 日の間で 5% をカットポイントとし、PMN 5% 以下を正常と判断する指標もある[21]。滲出性子宮炎や子宮内膜炎の治療には一般的に抗生物質が使用されるが、通常、抗生物質使用による出荷制限がかかり、乳や動物の出荷停止など、経済的にもマイナスの影響を与える。子宮感染症を予防し、スムーズに次の泌乳期間に移行させることは、産後の牛の管理にとって経済的に非常に重要である。産後の子宮内膜炎を発症させる細菌としては、*Escherichia coli* (*E. coli*) と *Trueperella pyogenes* (TP) が広く知られている[3, 47, 55]。子宮内への *E. coli* の定着は、子宮内膜への深刻なダメージと卵巣周期の乱れを引き起こし、その後の不妊につながる事が報告されている[25, 36, 56]。子宮内感染の初期段階では、*E. coli*

が病原体となり、その後、TP などの病原細菌の感染が引き起こされ、持続的な感染により慢性的な子宮疾患となる[17]。こういった細菌の持つリポ多糖(LPS)は、卵巣の卵胞膜細胞に作用し、黄体形成ホルモン (LH) により刺激された卵胞膜細胞のステロイド産生を阻害する[36]。また、産後早期の膣内に *E. coli* や LPS が存在すると、その後、TP やグラム陰性嫌気性菌による子宮感染症の発症が促進される[17]。分娩直後の *E. coli* の感染を防ぐことは、これらの LPS の作用を防ぎ、他の細菌による感染の予防に貢献することが想定される。これらの理由から、酪農では分娩後早期の *E. coli* の子宮内への感染に対応することが重要である。

子宮感染症では、子宮内膜以外の組織に感染する下痢原性大腸菌 (Diarrheagenic *E. coli* : DEC) や尿路病原性大腸菌 (uropathogenic *E. coli* : UPEC) などの腸管外病原性大腸菌 (Extra-intestinal pathogenic *E. coli* : ExPEC) が関与している可能性や、これまでに確認されていない特徴的な病原因子 (Virulence Factor: VF) を持った *E. coli* 株が子宮内膜に感染する可能性がある。多くの病原細菌において VF は、宿主組織細胞への特異的な接着に関わるタンパク質や糖鎖、毒素因子や莢膜などであることが報告されている。細菌の宿主組織表面への付着を決定する基本的なプロセスは、微生物表面タンパク質のアドヘンシンによって媒介される[31]。これまでの研究において、子宮から分離された *E. coli* は、DEC や ExPEC に関連する共通の VF 遺伝子の多くを持たず、その性質が明らかとされていないが、特定の VF を持たず、子宮内膜の上皮細胞や間質細胞に付着して侵入し、より多くの子宮内膜炎を引き起こす可能性がある。その特殊な株は、子宮内膜病原性大腸菌 (Endometrial Pathogenic *E. coli* : EnPEC) と報告されている[48]。EnPEC の進化的背景は明らかではないが、骨盤内炎症性疾患関連の EnPEC においては鉄イェルシニアバクチン取り込み受容体 (*fyuA*) 遺伝子が検出されたという報告もある。その報告では、臨床的に異常のない動物の子宮から分離された *E. coli* からは *fyuA* 遺伝子は検出されず、

子宮内膜炎を引き起こす病原因子の1つではないかと示唆されている[24]。病原性 *E. coli* の進化の起源を評価するために、病原性に関わる3つのゲノム領域 (*chuA*、*yjaA*、TSPE4.C2) を指標にした系統分析が用いられ、A、B1、B2、D の4つの主要な系統群グループに分類される手法が用いられている[26]。前述したように *E. coli* 子宮感染症の原因となる *E. coli* 群に関して、そのVFに関する研究は十分ではない中で、最近の研究では、VFの病原性に着目したものがあるが、病原性の決定的な要因としてのVFについては研究者によって結論が異なる[8, 9, 22, 30]。

以上のような背景をもとに、本研究の目的は、滲出性子宮炎や子宮内膜炎と関連する *E. coli* の特性を明らかにすることとし、*E. coli* の系統分類的な解析や、VFを同定し、それらが臨床症状とどのように関連するかを考察することとした。特に、滲出性子宮炎および子宮内膜炎から分離した *E. coli* を用いて、6つのVF遺伝子、*fimH*、*fyuA*、*kpsMTII*、*csgA*、*hra1*、*astA* の保有状況を調査し、VFと臨床症状やTPとの混合感染との関連性を調査することを目的とした。

牛の滲出性子宮炎および子宮内膜炎における
大腸菌の病原因子の
症状と繁殖成績対する影響に関する研究

山村文之介

牛の滲出性子宮炎および子宮内膜炎における
大腸菌の病原因子の
症状と繁殖成績対する影響に関する研究

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

獣医学専攻博士課程

山村文之介

獣医生化学

指導教員 教授 岩野英知

2021年度

第一章 滲出性子宮炎と子宮内膜炎を発症した牛の子宮から採取した *E. coli* の 系統群グループ分類

I. 小緒

子宮内感染症においては、子宮内膜以外の組織に感染する *E. coli* について、遺伝的背景や VF などの特性が明らかにされておらず、例えば DEC や UPEC などの ExPEC が関与している可能性や、これまでに確認されていない未知の *E. coli* 株が子宮内膜に感染する可能性がある。Sheldon らは、子宮内膜の上皮細胞や間質細胞に付着して侵入し、より多くの子宮内膜炎を引き起こす可能性が高い *E. coli* 株を EnPEC と命名したが[48]、この EnPEC の病原性に対する遺伝的背景は明らかではない。一般的に *E. coli* の遺伝的背景に基づく系統分析のための一つの *E. coli* 分類法として、病原性に関わる 3 つのゲノム配列 (*chuA*、*yjaA*、TSPE4.C2) を用いたの 4 つの主要な系統群グループ (A、B1、B2、D) に分類する方法がある[26]。従来はこのような系統的なグループ分けは、マルチローカス酵素電気泳動[26, 43]やリボタイピング[10-12]によって行われていたが、これらの技術はいずれも複雑で時間がかかる。Clermont らは腸管出血性大腸菌 O157:H7 のへム輸送に必要な遺伝子 *chuA* [14, 38, 51]、*E. coli* K-12 の全ゲノム配列から最初に同定された遺伝子で、その機能は不明な *yjaA* [13]、そして彼らのライブラリーから TSPE4.C2 と名付けられたゲノム配列断片[14]の 3 つのゲノム領域を対象とした triplex PCR による検出に基づいて、*E. coli* の病原性に基づく系統群を迅速に決定する手法を提案した[15]。具体的には、*chuA* 遺伝子を持つ病原性の高いものをグループ B2 と D とし、*chuA* 遺伝子を持たないものをグループ A および B1 と分類する。さらに、*yjaA* 遺伝子を持つものをグループ B2、持たないものをグループ D と分類する。最後に、TSPE4.C2 は、グル

ープ B1 株に存在し、グループ A 株には存在しないということにより、4つのグループに分類する手法である (図 1)。近年、より簡便なこの Clermont らの方法による系統分析にて、様々な疾患から分離された病原性の大腸菌を分類することが試みられ、ほとんどの常在菌は A および B1 に属し、病原性の高いものは B2、D に多く、様々な VF 遺伝子を保有していると報告されている [18]。一方で Sheldon らは、子宮疾患の動物からは A 群や B1 群の菌が分離されやすかったと記述している [48]。以上のように、滲出性子宮炎や子宮内膜炎に関わる *E. coli* の系統群の詳細は明らかにされておらず、臨床症状の経過や系統群との関係についても研究されていない。本章では、明らかな臨床症状を示す子宮内膜炎から分離した *E. coli* を用いて、*chuA*、*yjaA* および TSPE4.C2 の保有状況を調査し、Clermont らの方法による系統分析により、滲出性子宮炎と子宮内膜炎に関連する *E. coli* の系統群を明らかにすることとした。

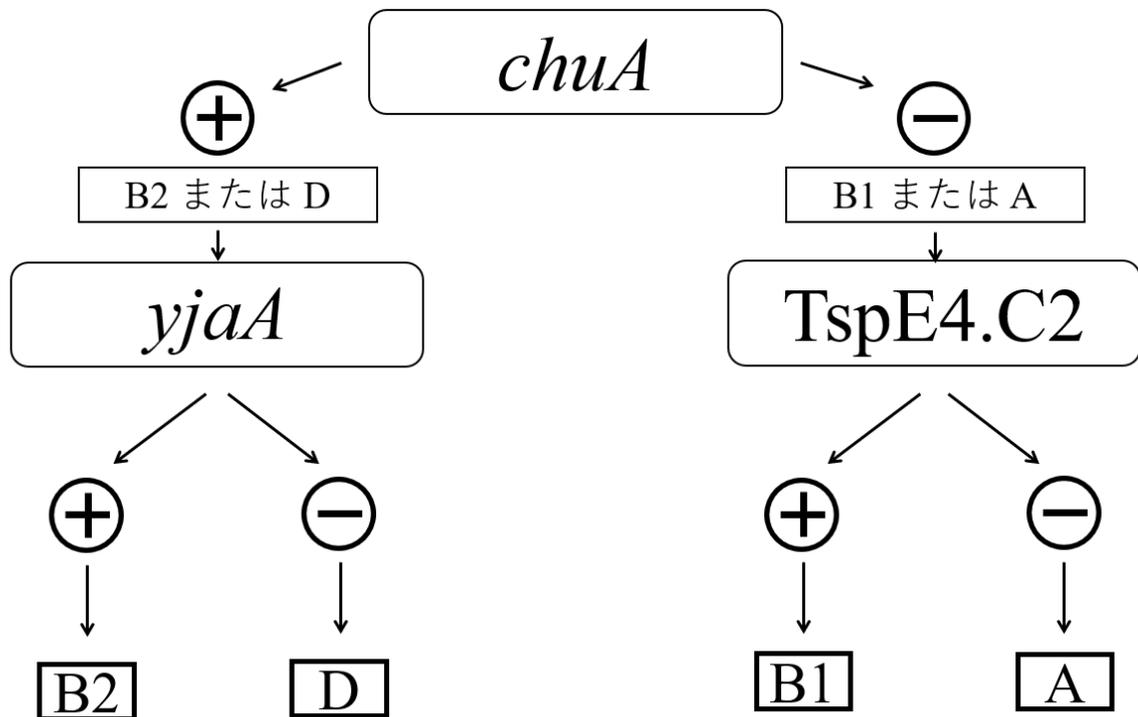


図 1 *chuA*、*yjaA*、TspE4.C2 を用いた系統分類法

Clermont ら (2000) より引用 (15)

II. 材料と方法

1. 共試動物

本研究は、酪農学園大学の動物実験施設ガイドライン（承認番号 VH17C10）に基づいて実施した。3つの酪農場から産後8日から66日の間に子宮内に *E. coli* が分離されたホルスタイン・フリーシアン牛 19頭を使用した。全頭が分娩房で単独分娩し、1日2回の搾乳を行い、臨床的には全身症状がなく、正常であることが確認された。

2. 臨床検査

子宮検査は分娩後7日±3日で開始し、子宮修復が完了するまで7日±3日おきに実施した。経直腸触診、膣鏡と超音波検査(HS-101v; HONDA ELECTRONICS CO.,LTD, Aichi, Japan)による生殖器検査によって、各牛の子宮修復状態を評価し記録した。分娩後21日以内の牛で全身症状がなく、子宮角径が異常に拡大し、膣内に膿性の子宮分泌物があった牛を滲出性子宮炎と定義した[47]。子宮内膜炎は、産後22日目以降に Sheldonらのスコアリングシステムにより診断した。子宮角の最大径と子宮頸の最大径を測定し、その大きさにより0から2の3段階でスコアリングした[45]。子宮角の最大径は、小（初産牛 3.5cm 未満、経産牛 4.0cm 未満）をスコア0、中（初産牛 3.5~5.5cm、経産牛 4.0~6.0cm）をスコア1、大（初産牛 5.5cm 以上、経産牛 6.0cm 以上）をスコア2とし、子宮頸の最大径は、小（初産牛 4.5cm 未満、経産牛 5.0cm 未満）をスコア0、中（初産牛 4.5~7.0cm、経産牛 5.0~7.5cm）をスコア1、大（初産牛 7.0cm 以上、経産牛 7.5cm 以上）をスコア2とした（表1）。膣粘液は、膣鏡検査によりその量と性状からそれぞれ0~3までの4段階でスコアリングした[55]。透明または半透明のものをスコア0、50ml 未満で白色の濃片がわずかに混入しているものをスコア1、50mL 未満で50%が白色またはオフホワイトの膿性物質を含むものをスコア2、50mL 以上の膿性物質を含む滲出液で白色または黄色のものをス

コア 3 とした。また、悪臭または血様のものにはスコア 3 を加算した（表 1 および図 2）。PMN% は分娩後 21~33 日では 18% 以下を、分娩後 34~47 日では 10% 以下を、それ以降に関しては Gilbert らの方法を一部改変し、分娩後 48~60 日では 5% 以下を正常とした [21, 55]（表 2）。トータルスコアが 1 以上の牛を子宮内膜炎と定義し、このトータルスコアが 0、PMN% が正常で、細菌が分離されなかった検査日を子宮修復完了日と定義した（表 2）。

表 1 滲出性子宮炎および子宮内膜炎の重症度評価スコアリングシステム

| 評価項目 | 分類 | スコア | |
|---|----------------------------|--------|---|
| 腔内の膿 | 性状 | 悪臭 | 3 |
| | | 無臭 | 0 |
| | | 血様 | 3 |
| | 量 | 50ml ≤ | 3 |
| | | 50ml > | 2 |
| | | 絮状物 | 1 |
| | | 正常 | 0 |
| 子宮角の最大径 | 大（初産5.5cm以上、経産6.0cm以上） | 2 | |
| | 中（初産3.5~5.5cm、経産4.0~6.0cm） | 1 | |
| | 小（初産3.5cm未満、経産4.0cm未満） | 0 | |
| 子宮頸の最大径 | 大（初産7.0cm以上、経産7.5cm以上） | 2 | |
| | 中（初産4.5~7.0cm、経産5.0~7.5cm） | 1 | |
| | 小（初産4.5cm未満、経産5.0cm未満） | 0 | |
| トータルスコア：8-10（重度） 4-7（中程度） 1-3（軽度） 0（正常） | | | |

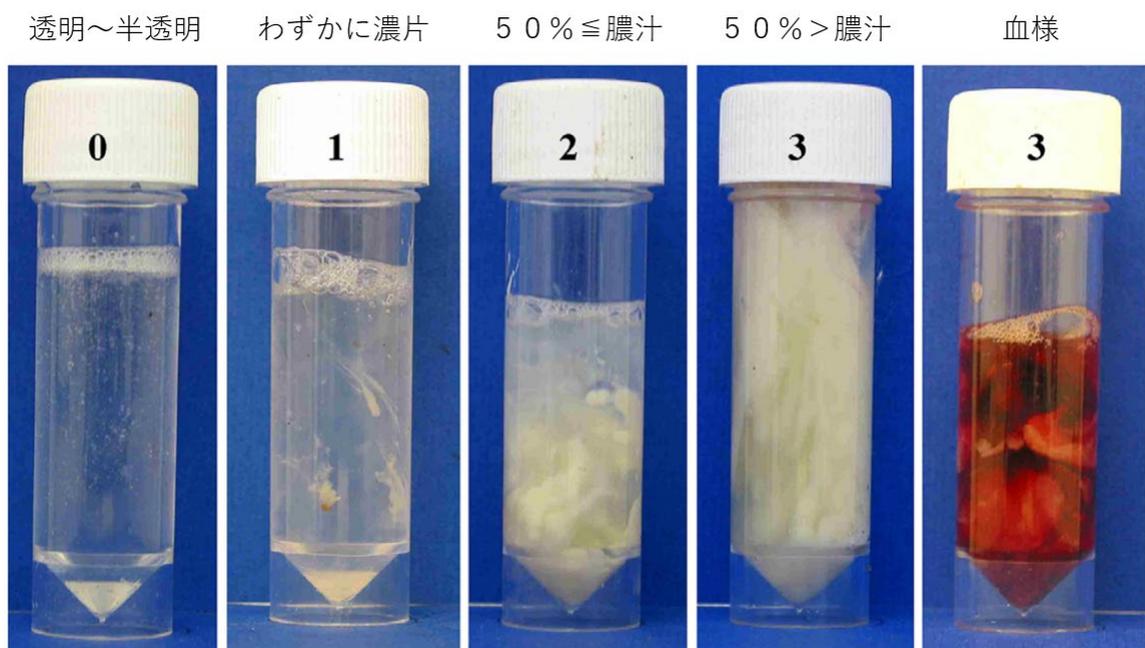


図2 膿粘液のスコアリング

膿粘液のスコアリングは、sheldon らの方法に従って行った (46)。

表2 PMN%を基にした子宮内膜炎診断基準

| 子宮内膜炎診断基準 (PMN%) |
|-------------------|
| >18% (分娩後 21～33日) |
| >10% (分娩後 34～47日) |
| > 5% (分娩後 48～60日) |

3. 子宮内スワブ採取と細菌検査

子宮内膜細胞診のための子宮内スワブは、滅菌したサイトブラシ器具 (Metricbrush; Fujihira Industry, Tokyo, Japan) を用いて採取した[4]。外性器は乾いたペーパータオルで拭いた後、塩化ベンザルコニウムと70%アルコールで消毒した。プラスチックのシースで覆われたサイトブラシを膈内に導入し、器具の先端を経直腸触診で外子宮口に導いた。外子宮口でシースの先端を破断

させた後、サイトブラシのみを子宮頸管から子宮体部に導入した。子宮体部にサイトブラシを挿入した後、ブラシを1回回転させて子宮内膜細胞を採取し、子宮体からサイトブラシの器具を引き抜き、滅菌したスライドガラスの上で塗抹した。塗抹した全てのスライドガラスをギムザ染色変法で染色し、光学顕微鏡を用いて200倍で400個以上の細胞を計数した。そして、子宮内膜表面の全細胞に対するPMNの出現率を算出した。塗抹後すぐに、サイトブラシ器具を、1mlの滅菌生理食塩水を入れた滅菌プラスチックチューブに懸濁した。懸濁液をよく攪拌した後、50 μ Lの懸濁液を5%羊血液寒天培地に塗抹し、37°Cで24~48時間培養した。培養後、すべてのコロニーの特徴、グラム染色、形態に基づいて細菌を同定した。また、*E. coli*はAPI 20 E (Sysmex Corp., Hyogo, Japan)を用いた生化学的プロファイルにより同定を行った。最終的に、19頭の牛から32サンプルの*E. coli*を分離し、25%グリセロールを含むLB培地に入れて-80°Cで保存した。この時、TPが同時に検出された場合にはその検出を記録した。

4. ゲノムDNAの抽出と、PCRによる*E. coli*の確認

分離した*E. coli*株が*E. coli*であることを遺伝子的にも確認するために*cdgR*遺伝子を検出した。GenElute TM Bacterial Genomic DNA Kits (SIGMA Ardrich/Merck, Darmstadt, Germany)を用いて、LB液体培地で一晩震盪培養した細菌からDNAサンプルを精製した。反応は、NEbuffer、dNTP mix(各0.2mM)、Taq DNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, United States)、primer mix (各0.5 μ M)を含む18 μ lのプレミックスを用いて、さらにDNA抽出液(50ng)を2 μ l加え、最終的に20 μ lの容量で行った。プライマーセットはEC_F(5'-CCAGGCAAAGAGTTTATGTTGA-3')およびEC_R(5'-GCTATTTTCCTGCCGATAAGAGA-3')[34]、増幅条件は94°Cで1分、57°Cで1分、72°Cで1分、最後に72°Cで2分とし、212bpの断片を生成した。増幅産物は2% (wt/vol) アガロースゲルで電気泳動して分離した。

5. Triplex PCR

前述と同様に調整した *E. coli* ゲノム DNA サンプルを用いて PCR を行った。反応は、NEbuffer、dNTP mix (各 0.2mM)、Taq DNA polymerase (New England Biolabs, United States)、6 種類のプライマー (各 0.5uM) を含む 18ul のプレミックスを用いて、さらに DNA 抽出液 (50ng) を 2ul 加え、最終的に 20ul の容量で行った。増幅条件は 94°C で 4 分間の変性、94°C で 5 秒、59°C で 10 秒の 30 サイクル、72°C で 5 分間の最終伸長ステップとした。使用したプライマーセットは、既報の ChuA.1 (59-GACGAACCAACGGTCAGGAT-39) および ChuA.2 (59TGCCGCCAGTACCAAAGACA-39)、YjaA.1 (59-TGAAGTGTCAGGAGACGCTG-39) および YjaA.2 (59ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-39)、TspE4C2.1 (59-GAGTAATGTCGGCATTCA-39) および TspE4C2.2 (59-CGCGCCAACAAAGTATTACG-39) [15] で、それぞれ 279bp、211bp、152bp の断片を生成した。すべての PCR において、DNA を含まない PCR 混合物からなるネガティブコントロールを行った。増幅産物は 2% (wt/vol) アガロースゲルで電気泳動して分離した。

6. *E. coli* の系統分類

Triplex PCR の結果を用いて、Clermont らの方法に従い分離株をグループ A、B1、B2、D に分類した [15]。chuA 遺伝子を検出した株をグループ B2 と D に、chuA 遺伝子を検出しなかった株をグループ A および B1 に分類した。次いで、yjaA 遺伝子を検出した株をグループ B2 株に、yjaA 遺伝子を検出しなかった株をグループ D 株には分類した。最後に、ゲノム配列断片 TSPE4.C2 を検出した株をグループ B1 株に、ゲノム配列断片 TSPE4.C2 を検出しなかった株をグループ A 株に分類することで分離株を A、B1、B2、D のグループに分類した (図 1)。

7. 統計解析

分離された *E. coli* 32 株を、滲出性子宮炎群 (n = 10) と子宮内膜炎群 (n = 22) に分けた。滲出性子宮炎群と子宮内膜炎群の牛は、それぞれ分娩後 21 日以内と 22 日以降と定義した。分娩後日数、膣粘液スコア、PMN%、トータルスコアを、正規性検定後 Student's t-test を用いて両群間で比較した。データは平均値±SD で表した。有意水準は 5%未満とした。

III. 結果

1. 産後の子宮から分離された *E. coli* に関連する臨床症状。

それぞれの個体の臨床症状と分離された *E. coli* の概要を表 3 にまとめた。

Sheldon の方法の変法[45]によって、3つの酪農場において産後 8 日から 66 日の間に滲出性子宮炎または子宮内膜炎と診断した 19 頭の牛から 32 株の *E. coli* が検出された。滲出性子宮炎の牛からは 10 株、子宮内膜炎の牛からは 22 株であった。平均分娩後日数は滲出性子宮炎群で 11.8 日、子宮内膜炎群で 37.8 日であった (表 4)。膣粘液スコアは滲出性子宮炎群で平均 3.2、子宮内膜炎群で平均 0.5 であった。PMN%は滲出性子宮炎群で平均 59.2%、子宮内膜炎群で平均 7.7%であった。トータルスコアは滲出性子宮炎群で平均 6.9、子宮内膜炎群で平均 1.7 であった(表 4)。TP との混合感染があった牛は 19 頭中 4 頭であった。

表 3 分離された *E. coli* による宿主牛の症状

| Cow No. | Bacterial No. | 分娩後日数 | 子宮頸 (cm) (±SD) | 子宮角 (cm) (±SD) | 膿粘液スコア | PMN(%) | トータルスコア | 細菌数 | TP同時検出 |
|---------|---------------|-------|----------------|----------------|--------|--------|---------|-----|--------|
| s2 | s2-1 | 14 | 7.0cm 2 | 5.5cm 2 | 0 | 6.5 | 4 | 20< | — |
| | s2-2 | 14 | 7.0cm 2 | 5.5cm 2 | 0 | 6.5 | 4 | 2 | — |
| s5 | s5-1 | 38 | 5.0cm 1 | 4.0cm 1 | 0 | 1.4 | 2 | 1 | — |
| s6 | s6-1 | 32 | 5.5cm 1 | 6.0cm 2 | 0 | 6.8 | 3 | 2 | — |
| s7 | s7-1 | 6 | ≈9.5cm 2 | 9.5cm 2 | 3 | 74.3 | 7 | ∞ | — |
| | s7-2 | 13 | ≈9.5cm 2 | 9.5cm 2 | 3 | 83.9 | 7 | 30< | + |
| s9 | s9-1 | 9 | ≈9.5cm 2 | >9.5cm 2 | 6 | 83.7 | 10 | 30< | — |
| | s9-2 | 9 | >9.5cm 2 | >9.5cm 2 | 6 | 83.7 | 10 | <10 | — |
| | s9-3 | 9 | >9.5cm 2 | >9.5cm 2 | 6 | 83.7 | 10 | 1 | + |
| s11 | s11-1 | 33 | 4.0cm 0 | 4.5cm 1 | 1 | 6 | 2 | 5 | — |
| s12 | s12-1 | 8 | ≈9.5cm 2 | ≈7.0cm 2 | 3 | 39.6 | 7 | 7 | + |
| | s12-6 | 29 | 5.5cm 1 | 3.5cm 0 | 2 | 41.8 | 3 | ∞ | + |
| s13 | s13-1 | 16 | ≈9.5cm 2 | — | 3 | (-) | 2 | 1 | + |
| | s13-4 | 43 | — | — | 0 | 4.9 | 0 | ∞ | — |
| s14 | s14-1 | 34 | 4.0cm 0 | 3.5cm 0 | 1 | 7.4 | 1 | 20 | — |
| | s14-2 | 48 | — | — | 0 | 0.5 | 0 | 5 | — |
| s15 | s15-1 | 31 | 3.5cm 0 | 3.5cm 0 | 2 | 0 | 2 | 3 | — |
| | s15-2 | 45 | 3.5cm 0 | 3.5cm 0 | 0 | 9.1 | 0 | 3 | — |
| | s15-3 | 66 | — | — | 0 | 0.4 | 0 | ∞ | — |
| s16 | s16-1 | 20 | ≈9.5cm 2 | 5.5cm 1 | 2 | 71.3 | 5 | 20 | — |
| s17 | s17-1 | 29 | ≈9.0cm 2 | 7.0cm 2 | 1 | 10.3 | 5 | ∞ | — |
| s18 | s18-1 | 50 | 4.5cm 0 | 4.5cm 1 | 0 | 0.01 | 1 | ∞ | — |
| s21 | s21-1 | 30 | 7.0cm 1 | 4.5cm 1 | 0 | 1.8 | 2 | 1 | — |
| | s21-2 | 30 | 7.0cm 1 | 4.5cm 1 | 0 | 1.8 | 2 | 1 | — |
| s23 | s23-1 | 33 | 4.5cm 0 | 4.0cm 1 | 0 | 0.74 | 1 | 3 | — |
| s24 | s24-1 | 43 | 5.0cm 1 | 4.0cm 1 | 0 | 4.8 | 2 | 6 | — |
| s25 | s25-1 | 38 | ≈9.5cm 2 | ≈7.5cm 2 | 0 | 35.2 | 4 | 1 | — |
| s27 | s27-1 | 34 | 4.0cm 0 | 5.0cm 1 | 0 | 10.8 | 1 | 2 | — |
| | s27-2 | 34 | 4.0cm 0 | 5.0cm 1 | 0 | 10.8 | 1 | 1 | — |
| | s27-3 | 34 | 4.0cm 0 | 5.0cm 1 | 0 | 10.8 | 1 | 1 | — |
| | s27-4 | 48 | — | — | 3 | 2.8 | 3 | 5 | — |
| s30 | s30-1 | 29 | 7.0cm 1 | 5.5cm 1 | 0 | 1.6 | 2 | 3 | — |

表 4 子宮炎群と子宮内膜炎群の症状

| グループ | <i>E.coli</i> 株数 | 分娩後日数 | 子宮修復評価 | | |
|-------|------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| | | | 腔粘液スコア | PMN% | トータルスコア |
| 子宮炎 | 10 | 11.8 ± 4.3 ^a | 3.2 ± 2.3 ^a | 59.2 ± 33.0 ^a | 6.9 ± 2.4 ^a |
| 子宮内膜炎 | 22 | 37.8 ± 9.3 ^b | 0.5 ± 0.8 ^b | 8.1 ± 7.7 ^b | 1.7 ± 1.3 ^b |

データは mean±SD.a/b,p<0.05.で示す

PMN%; the percentage of polymorphonuclear neutrophils

2. *E. coli* の同定

19頭の牛から32株の *E. coli* がされ、遺伝子的に確認するために PCR で *cdgR* 遺伝子を検出した。その結果、32株全てにおいて *cdgR* 遺伝子が検出され、全て *E. coli* であることが確認された (図3)。

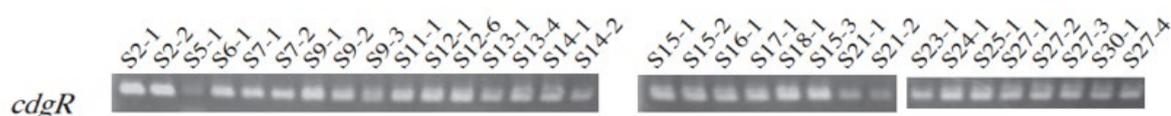


図3 *cdgR* 遺伝子の検出状況

3. 分娩後の子宮から分離された *E. coli* とその系統的分布

19頭の牛から分離された32株の *E. coli* について、これらの菌株の系統を調べるために、*chuA*、*yjaA*、TSPE4C2 のゲノム DNA 断片を PCR で検出し、Clermont らの方法[15, 26]で A、B1、B2、D の4つの系統群に分類した (図4)。81%の菌株が B2 に分類され、A、B1、D がそれぞれ 3、6、9%を占めていた。

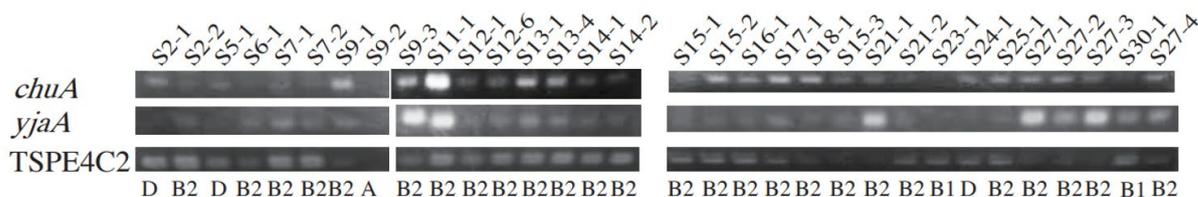


図4 各大腸菌株の *chuA*、*yjaA*、TSPE4C2 遺伝子の検出と系統分類

系統分類は写真の下段にそれぞれ (A、B1、B2、D) で記した。

IV. 考察

E. coli は産後の滲出性子宮炎や子宮内膜炎を発症させる細菌として重要な細菌であるが[3, 47, 55]、子宮内常在細菌としても報告されている[18]。一方で子宮内感染症においては *E. coli* が主病原体とされており、常在性の *E. coli* と病原性の高い *E. coli* の違いには、子宮内への定着や子宮内膜細胞に対する毒性に関わる特徴的な VF が関与していることが考えられる。しかし、現在までの研究においてウシ子宮内感染症に関わる *E. coli* の VF に関してははっきりと同定されていない。また、分離された *E. coli* の病原性を系統的に分類する Clermont らの方法において、様々な疾患で、病原性の少ない常在菌としての *E. coli* はグループ A および B1 に属し、B2、D 群は病原性が高いとされている[18]。この方法を用いた子宮疾患の牛から分離された *E. coli* は、A 群や B1 群の菌が分離されやすかったという報告や[22, 48]、対照的に病原性を有する ExPEC が主に B2 群と D 群に分布しているという報告もあり[15]、滲出性子宮炎や子宮内膜炎に関わる *E. coli* の系統群の詳細は明らかにされていない。これらの報告の背景として、産後の子宮内からの細菌分離の時期が早く、臨床診断が確定する前に行っていること、そのため常在菌も多く解析しており、本来の病原性のある大腸菌を確実に分析できていないのではないかと考えられた。よって本研究では、臨床症状をはっきりと示している個体から *E. coli* を分離することで

子宮内での炎症に関わる *E. coli* の性状、特に VF を同定することを目的とし、特に本章においては Clermont らの方法により系統的な解析を行った結果を基に、これまでの報告と比較し、考察することとした。滲出性子宮炎群と子宮内膜炎群の臨床症状の比較では、膣粘液スコアはそれぞれ平均 3.2 と平均 0.5、PMN% はそれぞれ平均 59.2% と平均 8.1%、トータルスコアはそれぞれ平均 6.9 と平均 1.7 で、有意に差が見られた (表 4)。これは、分娩後日数が浅い牛では生理的に膣粘液スコアや PMN% が高く、トータルスコアが高くなるものであり、これらに有意な差が出ていることにより、明確に滲出性子宮炎群と子宮内膜炎群とで違った群を比較しているものであることを示している。また、臨床現場での経直腸触診による診断結果がどちらも正当に評価されていることを示すものである。主として検出された細菌が *E. coli* であることが確認され (図 3)、TP との混合感染が見られた牛は 19 頭中 4 頭であった (表 3)。これは、*E. coli* や TP が産後の子宮感染症を発症させるという過去の報告と一致した [3, 47, 55]。

また *E. coli* の系統解析の結果、系統群の割合は過去の子宮内膜炎の報告とは異なり、滲出性子宮炎と子宮内膜炎を引き起こす系統グループは B2 のグループであり、明らかな臨床症状を呈した牛から分離された *E. coli* 株の大部分である 81% の株がグループ B2 に属していた (図 4)。Sheldon らは、滲出性子宮炎や子宮内膜炎を含む分娩後の子宮から分離された *E. coli* は、主に A 群と B1 群に属すると報告しているが [46]、この結果は、常在菌としての病原性の低い *E. coli* を多く解析していた結果ではないかと考えられる。このことから、本研究で臨床症状がはっきりした個体から分離した *E. coli* は、病原性の高いグループ B2 に属し、ExPEC であることが考えられ、病原性に関わる VF を持つ株である可能性が期待された。Clermont らは、ヒトの下痢、敗血症、新生児の髄膜炎および子宮と解剖学的に近接する尿路感染症を含む疾患に関わる大腸菌が B2 群と D 群に分布していると報告している [15]。よって、本研究で検出された 9% のグループ D に属する株も病原性の高い株であることによる結果であることが考

えられた。B2群およびD群の *E. coli* は、*chuA* を有するため、子宮内膜炎を引き起こす大腸菌の病原性にもこの *chuA* が大きく関わるものであることが示唆された。*chuA* はヘムの直接取り込みを仲介する役割を持つ[49]ことから、これらの *E. coli* は鉄取り込み能が高く、このことが子宮内での効率良い増殖に関連するものであることが考えられる。*yjaA* は *E. coli* K-12 のゲノム解析で最初に同定された遺伝子であるが、その役割は不明である[15]。*chuA* を保有するグループの中でも更に *yjaA* を保有するグループが B2 群であることを考慮すると、本研究で明らかな症状を示す牛の大部分から B2 群が検出されたことから、その役割が不明な *yjaA* が *chuA* の鉄取り込み能を相乗的に補足する形、または *yjaA* がその何らかの機能により、相加的に *E. coli* の病原性に関連する可能性が考えられる。異なるグループの *E. coli* による混合感染や細菌数と症状、病態の関係を解明するには特定の分娩後日数の牛に絞って更なる調査が必要である。

本研究では、過去の報告と異なり、病原性の高い B2 に分類される *E. coli* を明確に多く検出し、B2 グループの *E. coli* が大部分の滲出性子宮炎および子宮内膜炎を引き起こしていることを初めて確認することができた。これは、腔内や子宮内の常在菌（おそらく A、B1）が子宮炎、子宮内膜炎を引き起こすのではなく、分娩後に弛緩した子宮頸部を通して外部環境から病原性を持つ *E. coli* (B2、D) が上行性に侵入し、子宮を汚染し、感染した可能性があると考えられる。これは、本研究において明確に区分された滲出性子宮炎と子宮内膜炎の2つの異なるグループのどちらにおいても一貫しており、この分娩後の上行性の感染を防ぐことが滲出性子宮炎のみならず、それに続く子宮内膜炎を防ぐために有効であると考えられる。

V. 小 括

本章では、滲出性子宮炎および子宮内膜炎を実際に発症させている *E. coli* のみに焦点を当て、その病原性に関わる遺伝的な系統を明らかにした。その結果、分離された菌株のほとんどがグループ B2 に属しており、滲出性子宮炎および子宮内膜炎にはグループ B2 の ExPEC が発症やその病態に強く関連していることを示し、新たな知見を得ることができた。現在、滲出性子宮炎や子宮内膜炎は、抗生物質による治療が行われており、その弊害が薬剤耐性菌という形で露呈してきている。本研究により、常在菌ではなく、病原性の高いとされるグループである B2 の ExPEC が主に滲出性子宮炎や子宮内膜炎と関連しているという知見が得られたことにより、滲出性子宮炎や子宮内膜炎が分娩後の子宮が外部から汚染されて起こること示され、その汚染を防ぐことにより、滲出性子宮炎や子宮内膜炎を防ぐことができる可能性が考えられる。これは抗生物質を使用する機会自体の削減につながり、薬剤耐性菌の発生を防ぐために一定の効果が期待される。

第二章 滲出性子宮炎および子宮内膜炎に関連する *E. coli* の VF が臨床症状、繁殖成績、TP との混合感染に与える影響

I. 小緒

牛の滲出性子宮炎および子宮内膜炎を発症させる細菌として、*E. coli* と TP が広く知られているが[3, 47, 55]、同じ病原細菌であっても株間においてその性状は異なり、臨床症状を強く引き起こす株においては、宿主細胞への特異的な接着や、増殖に関わる病原遺伝子 (VF) を持っていることが知られ、同種細菌であってもそれぞれの病態において VF は異なっている。前章において、牛の滲出性子宮炎と子宮内膜炎には主に *chuA* と *yjaA* を保有する B2 群の *E. coli* がその発症に関わっていることを明らかにしたが、特に *chuA* は鉄取り込み能に関わるタンパク質をコードする遺伝子で、子宮内での増殖に関わっていることが考えられた。これらの遺伝子はともに *E. coli* の持つ VF 遺伝子であり、*chuA* と *yjaA* 以外にも多くの VF が *E. coli* の病原性に関わっていることがわかっている [9, 22, 30]。しかし、子宮感染症の原因となる特異的な VF に関する研究は十分ではない。最近の研究では、VF の病原性に着目したものもあるが、病原性の決定的な要因としての VF については、研究者によって結論が異なる [8, 9, 22, 30]。Bicalho らは *E. coli* の VF は、TP や壊死桿菌などの発生を促進すると記述している [8]。また、*fimH*、*hlyA*、*cdt*、*kpsMTII*、*ibeA*、*astA* といった腸管外大腸菌や腸管内大腸菌に共通する 6 つの VF が子宮炎や子宮内膜炎と関連することを報告しており、*fimH* と他の 5 つの VF は相乗的な関係にあるとしている [9]。また Kassé らの報告では、*hra1* と *kpsMTII* のみが産後子宮炎と関連すると結論づけている [30]。更に、Moreno は、*fyuA* と *csgA* の VF 遺伝子を持つことが子宮内膜疾患の危険因子であると報告している [22]。しかし、いずれの報告にお

いても臨床症例から分離された *E. coli* からの検出率は低く、臨床症状に関与する VF として同定されているものはない。また、*E. coli* の LPS が TP との混合感染を招くことは明らかにされているものの、その混合感染を招く *E. coli* の VF に関する研究や臨床症状の経過と VF との関係についても研究も見当たらない。本章の目的は、滲出性子宮炎や子宮内膜炎の経過において、*E. coli* の VF が臨床症状や TP との混合感染に関与している可能性を調査することである。明らかに症状を示す滲出性子宮炎と子宮内膜炎の牛の子宮から分離した *E. coli* を用いて、既報から特に重要であることが推測される 6 つの VF 遺伝子、*fimH*、*fyuA*、*kpsMTII*、*csgA*、*hra1*、*astA* の保有状況を調査し、滲出性子宮炎および子宮内膜炎の臨床症状と TP との混合感染の有無を調査することにより、子宮内感染に関係する可能性のある *E. coli* の VF について明らかにすることとした。

II. 材料と方法

1. 共試動物

本研究は、酪農学園大学の動物実験施設ガイドライン(承認番号 VH17C10)に基づいて実施した。3 つの酪農場から産後 8 日から 66 日の間に子宮内に *E. coli* が分離されたホルスタイン・フリーシアン牛 19 頭を使用した。全頭が分娩房で単独分娩し、1 日 2 回の搾乳を行い、臨床的には先進症状がなく、正常であることが確認された。

2. 臨床検査

第一章の II 材料と方法 2 に記載した。

3. 子宮内スワブ採取と細菌検査

第一章の II 材料と方法 3 に記載した。

4. ゲノム DNA 抽出と PCR による *E. coli* の確認

第一章の II 材料と方法 4 に記載した。

5. RAPD PCR

前述と同様に調整した *E. coli* ゲノム DNA 50ng を用いて、プライマー 20pmol, dNTP mix (各 0.2mM)、Taq DNA ポリメラーゼ 1.25unit, Taq DNA polymerase (New England Biolabs, United States) を含む 25ul で PCR を行った。プライマーは、既報の 5'-GCGATCCCCA-3' (プライマー名: 1283) を使用した[1]。増幅の条件は、94°C×1分、36°C×1分、72°C×2分、最後に 72°C×2分とした。増幅産物は 2% (wt/vol) アガロースゲルで電気泳動により分離した。

6. VF 遺伝子の PCR

前述と同様に調整した *E. coli* ゲノム DNA サンプルを用いて PCR を行った。反応は、NEbuffer、dNTP mix (各 0.2mM)、Taq DNA polymerase (New England Biolabs, United States)、primer mix (各 0.5uM) を含む 18ul のプレミックスを用いて 20ul の容量で行い、最後に DNA 抽出液 (50ng) を 2ul 加えた。増幅の条件は、94°C で 1 分、55- 63°C で 1 分 (各プライマーセットに応じて、表 5 [2, 22, 30, 34])、72°C で 1 分、最後に 72°C で 2 分とした。すべての PCR において、DNA を含まない PCR 混合物からなるネガティブコントロールを行った。増幅産物は 2% (wt/vol) アガロースゲルで電気泳動により分離した。

表 5 PCR に使用したプライマーの詳細

| 標的遺伝子 | プライマー名 | プライマー塩基配列 (5' to 3') | アニーリング温度 | アンプリコンサイズ (bp) | 参考文献 |
|----------------|-----------|-------------------------|----------|----------------|------|
| <i>cdgR</i> | EC_F | CCAGGCAAAGAGTTTATGTTGA | 57 | 212 | [34] |
| | EC_R | GCTATTTCTGCCGATAAGAGA | | | |
| <i>fimH</i> | fimH-F | TGCAGAACGGATAAGCCGTGG | 63 | 508 | [40] |
| | fimH-R | GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA | | | |
| <i>fyuA</i> | fyuA-F | TGATTAACCCCGCGACGGGAA | 63 | 880 | [40] |
| | fyuA-R | CGCAGTAGGCACGATGTTGTA | | | |
| <i>kpsMTII</i> | kpsMTII-F | GCGCATTTGCTGATACTGTTG | 63 | 272 | [40] |
| | kpsMTII-R | CATCCAGACGATAAGCATGAGCA | | | |
| <i>csgA</i> | csgA-F | ACTCTGACTTGACTATTACC | 55 | 200 | [40] |
| | csgA-R | AGATGCAGTCTGGTCAAC | | | |
| <i>hral</i> | hral-F | TCACTGCAGACCAGCGTTTC | 58 | 537 | [30] |
| | hral-R | GTAACCTCACACTGCTGCACCT | | | |
| <i>astA</i> | astA-F | TGCCATCAACACAGTATATCCG | 58 | 102 | [2] |
| | astA-R | ACGGCTTTGTAGTCCTTCCAT | | | |

7. 統計解析

第一章で行った統計解析に加えて全試験個体を *kpsMTII* 保有群 (n=12) と *kpsMTII* 非保有群 (n=7) に分け、平均産次数、子宮修復日数、初回授精日数、空胎期間、TP 混合感染について正規性検定後 Student's t-test を用いて両群間で比較した。データは平均値±SD で表した。有意水準は 5%未満とした。

III. 結果

1. *E. coli* 同種異株の検出

19頭の牛から分離同定した *E. coli* 32株を RAPD-PCR により株間のゲノム上の差異を検出して、株間の相違を確認した。分離した 32株の *E. coli* のほぼ全てで異なるパターンのバンドが検出され、それぞれが異なる株であることが示唆された (図 5)。

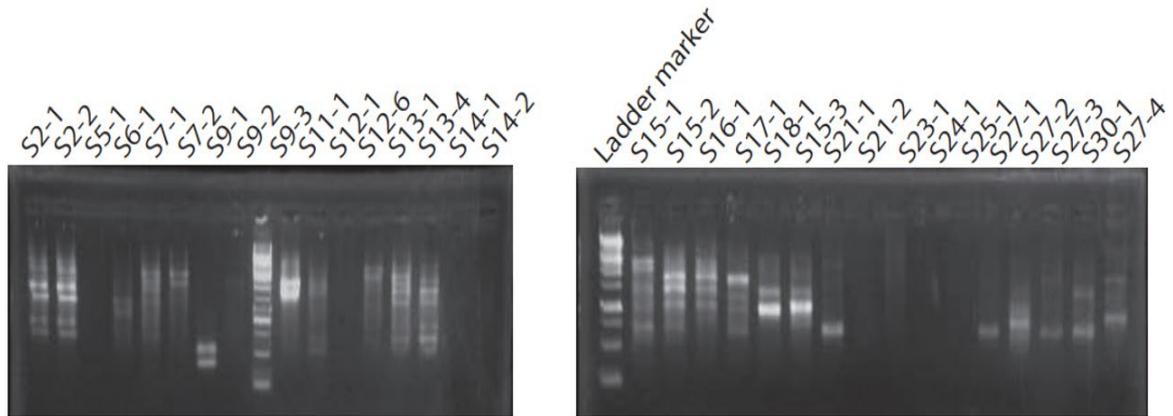


図5 RAPD-PCRによる大腸菌異株の確認

2. *E. coli* の VF の検出

分離した *E. coli* が臨床症状に関わると予想した 6 つの VF の保有状況を PCR により調査した (図 6、表 5)。また、滲出性子宮炎および子宮内膜炎の症状との比較を表 6 にまとめた。滲出性子宮炎群の *E. coli* 10 株すべてに 5 種類の VF (*fimH*、*fyuA*、*hra1*、*csgA*、*astA*) が検出された (図 6、表 6)。これら 5 種類の VF の保有率は、産褥期以降も 90.9~100% と高かった (表 6)。中でも *fyuA* は子宮内膜炎群の 2 頭のみ検出されなかった。滲出性子宮炎群と子宮内膜炎群から分離された *E. coli* における *kpsMTII* の保有率は、それぞれ 60.0% および 50.0% であった (表 6)。*kpsMTII* のみ、保有率に大きな違いが見られた。

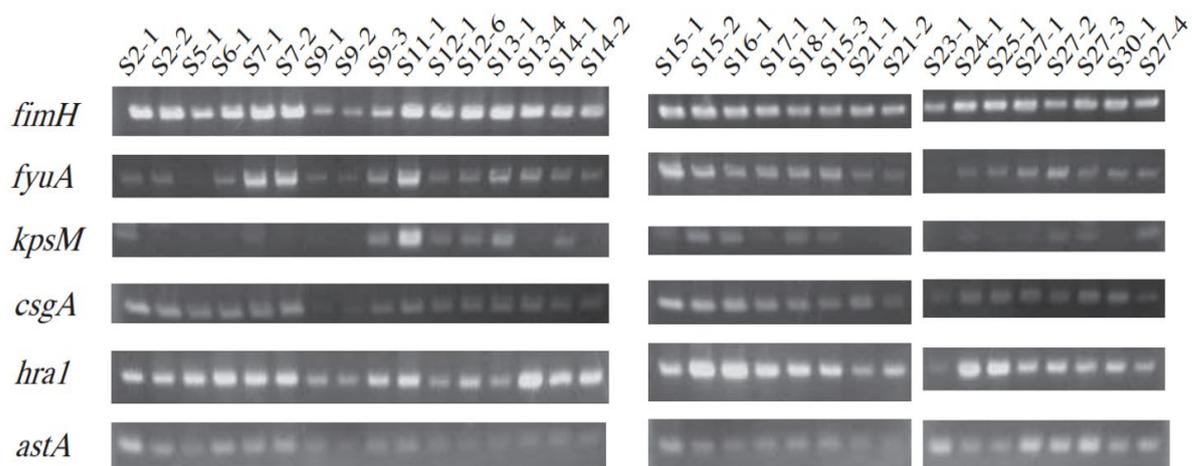


図 6 各 *E. coli* 株の VF 遺伝子検出状況

表 5 検出細菌株と *E. coli* の保有 VF

| Cow No. | Bacterial No. | 分娩後日数 | 検出細菌 | <i>fimH</i> | <i>fyuA</i> | <i>kpsMT II</i> | <i>hra1</i> | <i>csgA</i> | <i>astA</i> |
|---------|---------------|-------|----------------|----------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| s2 | s2-1 | 14 | <i>E. coli</i> | + | + | + | + | + | + |
| | s2-2 | 14 | <i>E. coli</i> | + | + | - | + | + | + |
| s5 | s5-1 | 38 | <i>E. coli</i> | + | - | - | + | + | + |
| s6 | s6-1 | 32 | <i>E. coli</i> | + | + | - | + | + | + |
| s7 | s7-1 | 6 | <i>E. coli</i> | + | + | + | + | + | + |
| | s7-2 | 13 | <i>E. coli</i> | + | + | - | + | + | + |
| | s7-3 | 13 | TP | | | | | | |
| | s7-4 | 21 | TP | | | | | | |
| | s7-6 | 28 | TP | | | | | | |
| | s7-7 | 45 | TP | | | | | | |
| | s7-8 | 48 | TP | | | | | | |
| | s9 | s9-1 | 9 | <i>E. coli</i> | + | + | - | + | + |
| s9-2 | | 9 | <i>E. coli</i> | + | + | - | + | + | + |
| s9-3 | | 9 | <i>E. coli</i> | + | + | + | + | + | + |
| s9-4 | | 9 | TP | | | | | | |
| s9-5 | | 15 | TP | | | | | | |
| s11 | s11-1 | 33 | <i>E. coli</i> | + | + | + | + | + | + |
| s12 | s12-1 | 8 | <i>E. coli</i> | + | + | + | + | + | + |
| | s12-2 | 8 | TP | | | | | | |
| | s12-4 | 15 | TP | | | | | | |
| | s12-5 | 22 | TP | | | | | | |
| | s12-6 | 29 | <i>E. coli</i> | + | + | + | + | + | + |
| | s12-7 | 29 | TP | | | | | | |
| s13 | s13-1 | 16 | <i>E. coli</i> | + | + | + | + | + | + |
| | s13-2 | 16 | TP | | | | | | |
| | s13-3 | 22 | TP | | | | | | |
| | s13-4 | 43 | <i>E. coli</i> | + | + | - | + | + | + |
| s14 | s14-1 | 34 | <i>E. coli</i> | + | + | + | + | + | + |
| | s14-2 | 48 | <i>E. coli</i> | + | + | - | + | + | + |
| s15 | s15-1 | 31 | <i>E. coli</i> | + | + | + | + | + | + |
| | s15-2 | 45 | <i>E. coli</i> | + | + | + | + | + | + |

表 6 滲出性子宮炎および子宮内膜炎における検出 *E. coli* の VF 遺伝子保有状況

| グループ | <i>E. coli</i> 株数 | 分娩後日数 | 子宮修復評価 | | | VF保有 <i>E. coli</i> 株 (%) | | | | | |
|-------|-------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|-------------|----------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | 膿粘液スコア | PMN% | トータルスコア | <i>fimH</i> | <i>fyuA</i> | <i>kpsMTII</i> | <i>hraI</i> | <i>csgA</i> | <i>astA</i> |
| 子宮炎 | 10 | 11.8 ± 4.3 ^a | 3.2 ± 2.3 ^a | 59.2 ± 33.0 ^a | 6.9 ± 2.4 ^a | 100 | 100 | 60.0 | 100 | 100 | 100 |
| 子宮内膜炎 | 22 | 37.8 ± 9.3 ^b | 0.5 ± 0.8 ^b | 8.1 ± 7.7 ^b | 1.7 ± 1.3 ^b | 100 | 90.9 | 50.0 | 100 | 100 | 100 |

データは mean±SD.a/b,p<0.05.で示す

3. *E. coli* の VF と臨床症状

*kpsMTII*を検出した牛と *kpsMTII*を検出しなかった牛との比較では、膿粘液スコアがそれぞれ 1.7±1.7 と 0.1±0.4、PMN%がそれぞれ 24.5±29.7 と 8.3±12.4 であり、有意な差が認められ、子宮修復に要した日数はそれぞれ 61.6±21.2 日と 40.6±7.7 日であり、*kpsMTII*を検出した牛では有意に子宮修復に日数を要した。一方、初回授精日数はそれぞれ 109.6±42.8 日と 93.0±32.7 日、空胎日数はそれぞれ 167±78.0 日と 134.8±97.3 日であり、有意差はなかったものの *kpsMTII*を検出した牛において日数を要する傾向があった（表 7）。

表 7 *kpsMTII* 検出群、非検出群における繁殖パラメータ比較

| | 頭数 | TP混合感染 (%) | 平均産次数 | 膿粘液スコア | PMN% | 子宮修復日数 | 初回授精日数 | 空胎日数 |
|--------------------|----|------------|------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------|--------------|
| <i>kpsMTII</i> 検出 | 12 | 33% (4/12) | 2.2 ± 1.4 ^a | 1.7 ± 1.7 ^a | 24.5 ± 29.7 ^a | 61.6 ± 21.1 ^a | 109.6 ± 42.8 | 167.6 ± 78.0 |
| <i>kpsMTII</i> 非検出 | 7 | 0% (0/7) | 4.3 ± 2.6 ^b | 0.1 ± 0.4 ^b | 8.3 ± 12.4 ^b | 40.6 ± 7.7 ^b | 93.0 ± 32.7 | 134.8 ± 97.3 |

データは mean±SD.a/b,p<0.05.で示す

4. *kpsMTII* の保有状況と TP 検出状況

大腸菌が分離された 19 頭の牛のうち 33.3%にあたる 4 頭の牛 (s7, s9, s12,s13) から *E. coli* と同時、または *E. coli* が非検出後に TP が検出された。また、これらの牛において TP が検出されてからは子宮回復判定に至るまで TP の感染が持続した (表 3)。統計的に有意な差はなかったものの、TP が検出された個体は、100%の個体が *kpsMTII* を保有する *E. coli* に感染しており、*kpsMTII* を保有しない *E. coli* に感染した牛は TP に感染しなかった (表 7)。

IV. 考察

本章では、滲出性子宮炎および子宮内膜炎から分離された *E. coli* の VF と臨床症状や繁殖成績、そして TP の混合感染との関連性を検討した。VF 遺伝子の検出率は、5 つの VF (*fimH*, *fyuA*, *hra1*, *csgA*, *astA*) では 90.9~100%、*kpsMTII* では 50%であり過去の報告[9, 22, 30, 48]と比較して高かった(表 6)。これらの VF は、その機能が既に報告されている。*fimH* は、最もよく研究されているアドヘシンの一つであり、*E. coli* では最も多く検出される VF である[9, 22, 30]。一般的に、*E. coli* の哺乳類細胞への付着に関与しており[28]、感染への足掛かりとなることから、最も重要な VF であると言われている[32]。この点においては、Sheldon らも *fimH* が子宮内膜細胞への接着にも関与していることを示唆しているが[48]、他の報告においてその検出率は 87~89%程度であり、我々の検出率よりは低い[9, 22, 30]。*hra1* は、もともと子豚や子羊に病原性を持つ O9 : H10 : K99 *E. coli* 株の自己凝集性および血球凝集性タンパク質として報告された VF で[35]、非病原性大腸菌にも存在するが、腸管凝集性大腸菌 (EAEC) などの病原性の高い *E. coli* のコロニー形成に関わっており、この自己凝集能力により貪食を回避するためのバイオフィルムの形成に関与している[7, 19, 37]。この *hra1* については、Kassé らにより乳牛の子宮内感染症との関連が初めて報告されたが、その保有率は 21%程度であり、本研究の検出率よりかなり低い[30]。*astA* は、ヒトの下痢の発症に関与する EAEC 熱安定性毒素 1

(EAST1) をコードする遺伝子である [53]。Bicarho らは、EAST1 が牛の産後の子宮感染症の発症に重要な役割を果たしている可能性があり、VF 遺伝子 *astA* が *fimH* に次いで 2 番目に重要な子宮炎の予測因子であることを報告しているが [9]、EAST1 による毒力発現の機序は明らかにされていない [53]。 *fyuA* と *csgA* はともにバイオフィーム形成に関与する VF である [24, 50]。 *fyuA* は、尿路感染症の最も一般的な病原体の一つである UPEC に高い頻度で見られる鉄取り込み受容体の遺伝子である [23]。 *csgA* は、バイオフィームを形成するアミロイドである Curli の構造の一部で、様々な病原性タンパク質の機能を高める働きがあり [5, 50, 52]、 *fuyA* と共に産後子宮障害の発症に広く関与している [22]。これら報告からまとめると、子宮炎、子宮内膜炎発症における推測されるメカニズムとして、 *fimH* が子宮内膜への接着に作用し、 *hra1* がコロニー形成を促進し、 *fyuA* と *csgA* がともにバイオフィーム形成を促進することで *E. coli* にとって子宮内にて安定した感染が成立するよう働くと考えられる。さらに、 *astA* が毒素として子宮上皮細胞に直接的な悪影響を与えているものと考えられる。これまでの報告では滲出性子宮炎や子宮内膜炎の発症以前からサンプリングを行ったため常在菌の分離率が比較的高かったと考えられ、VF の検出率が低かったが、本研究では発症した牛からのみサンプリングを行ったため VF の検出率が高く、より明確に病原性に関連する VF を特定できたと考える。驚くべきことに、産後の子宮から分離された大腸菌 32 株すべてに 4 種類の VF (*fimH*, *hra1*, *csgA*, *astA*) が検出された (表 6)。この結果は、これら 4 つの VF が滲出性子宮炎および子宮内膜炎の発症と強く関連していることを支持するものである。32 株のうち、 *fyuA* を欠いていたのは 2 株のみであった (表 5)。これらの菌株は同時に *kpsMTII* を欠いており、臨床症状は比較的軽かった。これらの株は系統群 B1 および D に属し、比較的病原性が低い系統であることと一致し、比較的病原性の高い株に限り *kpsMTII* を保有することを示している (図 4)。一方で、前章において、 *E. coli* の鉄取り込みに必要な遺伝子である *chuA* [49] が *E. coli* の病原性に大きく

関わることを示したが、この *fyuA* もまた *E. coli* の鉄取り込みに関わる VF である [24]。前章において、*yjaA* が *chuA* の鉄取り込み能を補足する形で病原性を増強する可能性を考察したが、本章において *fyuA* を欠如した株は系統群 B1 または D であったことを考慮すると、*E. coli* の鉄取り込み能が病原性に強く関連していることが裏付けられる。地球上に鉄は多く存在しているにもかかわらず、生体や細菌が利用可能な形で存在する鉄は限られているため、それぞれが効率的な鉄取り込み機構を備えることで競争している [54]。子宮は解剖学的に鉄をあまり含まない尿路系と近接していることから、病原性以前に強力な鉄取り込み能を持たなければ生き残ること自体が難しいということの結果である可能性もある。鉄取り込み能がどのようにして子宮に対する病原性を発揮するかというメカニズムに関しては、*in vitro* を含めた鉄を制限した環境での調査など、更なる研究が必要である。

kpsMTII は、他の VF に比べて検出率が低かった (表 8)。*kpsMTII* は、莢膜タンパク質 K1 または K5 をコードしている [30]。これらのタンパク質は、感染の初期段階において、細菌の表面や補体系と相互作用することで、非特異的な免疫を回避または打ち消す役割を果たしている [27]。*kpsMTII* は、ニワトリの蜂窩織炎 [15] や女性の尿路感染症との関連も報告されている [40, 41]。Bicalho らは、子宮が *kpsMTII* 遺伝子を持つ子宮内 *E. coli* に汚染された牛は、子宮が汚染されていなかった牛に比べて、妊娠する可能性が 9.2 倍低いことを報告している [9]。Kassé らは、*kpsMTII* を持つ *E. coli* が泌乳開始 1-7 日目に子宮内で検出された牛は、*E. coli* が検出されなかった牛に比べて 6.2 倍、*kpsMTII* を持たない *E. coli* に感染した牛に比べて 3.2 倍、その産後子宮感染症を引き起こす可能性が高いと報告している [30]。また、Moreno らは *kpsMTII* が乳牛のリピートブリーダー症候群の原因となる可能性があるとして報告している [22]。このように、これまでの報告では、*kpsMTII* が産後の子宮の問題を引き起こすことが一貫して認められているが、臨床症状との関係については、これまで報告されて

いない。本研究において *kpsMTII* の有無と臨床症状を比較した結果、*kpsMTII* が存在する場合は、それが存在しない場合に比べて腔粘液スコアと PMN% が有意に悪化することがわかった (表 7)。前述の滲出性子宮炎・子宮内膜炎に関連する他の 5 つの VF に加えて、*kpsMTII* が病態をさらに悪化させる要因であることが考えられる。また、分娩後の子宮修復に要した日数は、*kpsMTII* 保有群では 61.3 日であったのに対し、*kpsMTII* 非保有群では 40.6 日であり、*kpsMTII* 保有群では子宮修復に有意に時間がかかっていることがわかった (表 7)。これにより、*kpsMTII* が乳牛の産後の子宮修復を遅らせることに関連していることが明らかになった。これは、*kpsMTII* にコードされる K1 または K5 タンパク質が、細菌の表面や補体系と相互作用することや、分子擬態することで、免疫認識を回避するシステムの結果であると考えられる [27]。*kpsMTII* は子宮修復を遅らせる要因ではあることが示されたが、興味深いことに、子宮修復達成後に続くはずの、初回授精日数や空胎日数を長引かせる要因ではなかった。このことは、*E.coli* に対し免疫力が勝り、自浄作用による感染の克服と *kpsMTII* による子宮修復遅延を克服後、卵巣機能や、精子にとっての子宮内環境などが全て整って初めて人工授精、受精、着床に至ることから、子宮修復遅延とは別の要因によるものであると考えられる。また、本研究では繁殖検診が毎週行われていたため、妊娠を達成するための全ての条件が揃ってすぐに適切な授精ができたことも、これらに差が出なかった要因と考えられる。通常は 2 週間に一度の繁殖検診が行われるが、地域によっては 1 ヶ月に一度、場合によっては行われていないことを考慮すると、例えば、*kpsMTII* 陰性群の牛が分娩後 40 日前後で子宮修復の完了を確認できれば、その牛は畜主の観察の対象となるが、少ない頻度の繁殖検診が分娩後 40 日から 60 日の間で行われた場合、*kpsMTII* 陽性群の牛はその後一か月以上子宮修復が完了していない牛として放置される可能性があり、*kpsMTII* による子宮修復の遅延は、その後の繁殖成績に大きく影響するものと考えられる。

kpsMTII 保有群と *kpsMTII* 非保有群では、TP との混合感染の比率はそれぞれ 33.3%と 0%であった (表 7)。全ての混合感染例において、*kpsMTII* を保有する *E. coli* が早期に検出された (表 5)。産後早期に膣内に *E. coli* や LPS が存在すると、産後後期に TP やグラム陰性嫌気性菌による子宮感染症が発生しやすくなることから [17]、VF の中でも *kpsMTII* はこの移行に関わっていることが考えられる。また、若齢動物では *E. coli* と TP の混合感染例が多く、今回検出された *kpsMTII* を持つ *E. coli* に感染した個体は、有意に産次が低かった (表 7)。Moore らは、処女雌牛の子宮から TP の s16 rRNA 遺伝子配列が検出されたことを報告している [39]。これらのデータは、我々が臨床現場で遭遇する TP 感染症 (臍帯炎、膿瘍、乳房炎など) は、子牛、育成牛、若齢牛に多く見られるという事実と一致しており、年齢と TP 感染症との関係や、他疾患での *E. coli* の VF と TP 感染症との関係性が推察される。以上のことから、*E. coli* の持つ 6 つの VF (*fimH*, *fyuA*, *hra1*, *csgA*, *astA*, *kpsMTII*) の中でも、特に *kpsMTII* が臨床症状の悪化、子宮修復の遅延、TP との混合感染と誘発する可能性が明らかになった。近年では莢膜の K 抗原を標的とするバクテリオファージも見つかっている [42]。中には *kpsMTII* がコードするタンパク質を特異的に認識し、溶菌することができるバクテリオファージが存在する可能性があり、このバクテリオファージが発見され、これを使ったファージセラピーが可能となれば、*kpsMTII* が発現し、強い病原性を持つ大腸菌をターゲットとした治療ができる可能性がある。一方で、生産性の向上という酪農の目的のためには治療ではなく病気を出さないことがより重要であり、*kpsMTII* 陽性の *E. coli* による感染を防ぐ必要があるが、その選別は現実的に不可能であるため、*E. coli* 自体による感染を防ぐことが重要である。つまり、最善の解決策は牛を汚さないことであるが、そのためにファージセラピーを予防的に使うことも一つの考え方として有効であると考えられる。本章では、初めて子宮感染症に強く関連する VF を特定することができた。今後、それぞれの VF が産後の子宮感染症の発症にどの

ように関与しているか、そのタンパク質の発現量や発現パターン、メカニズムの解明にはさらなる研究が必要である。

V. 小 括

本章では、牛の滲出性子宮炎および子宮内膜炎を発症させる細菌として広く知られる *E. coli* の持つ VF が臨床症状や繁殖成績にどう関係しているか、また、*E. coli* の VF と TP の混合感染との関係を明らかにした。既報から特に重要だと推測される 6 つの VF (*fimH*, *fyuA*, *hra1*, *csgA*, *astA*, *kpsMTII*) が滲出性子宮炎および子宮内膜炎の発症において重要であり、特に *kpsMTII* が症状の悪化と子宮修復の遅延、更に TP との混合感染を引き起こす要因であることを初めて明らかにした。子宮修復の遅延は酪農において生産性を大きく悪化させる要因であり、また、子宮感染症発症後、TP が *E. coli* による感染の後に感染源となり、その持続的な感染により慢性子宮疾患となることから、症状の悪化、子宮修復遅延、TP による感染の前段階でその感染源の変遷に関わる要因を明らかにしたことは、慢性子宮疾患の予防の礎となり、酪農経営の改善に大きく貢献するものと考えられる。前章において B2 グループの ExPEC が子宮内感染を引き起こすことを明らかにしたが、その要因となる外部環境からの汚染を防ぐことが、急性の炎症のみならず、それに引き続く慢性的な子宮疾患を予防、更には繁殖成績の改善に寄与すると考えられる。外部環境からの汚染を防ぐことが本質的に重要であることは本章においても一貫している。また、それにより、獣医師が持つ社会的使命である食品の安全性の確保や抗生物質を使用する機会自体の更なる削減につながり、本章の結果は大きな価値があるものと考えられる。

総括

本研究では、牛の滲出性子宮炎と子宮内膜炎が、常在細菌により引き起こされるものではなく、分娩後に弛緩した子宮頸部を通して外部環境から上行性に侵入し子宮を汚染し感染した B2 グループの ExPEC によって引き起こされることが多いこと、その中でも特定の VF (*fimH*, *fyuA*, *hra1*, *csgA*, *astA*, *kpsMTII*) を持つものが症状を引き起こし、特に *kpsMTII* を持つものが膿粘液スコアと PMN% の悪化を主体とする症状の悪化、それに続き、子宮修復の遅延を引き起こすこと、更に TP による混合感染を引き起こすことを明らかにした。この *E. coli* の滲出性子宮炎や子宮内膜炎への影響を防ぐためには、感染症の 3 大要素（病原体、感染経路、感受性宿主）を意識する必要がある。酪農場において、牛が飼育されている環境は必ずしも清潔に保たれているわけではなく、むしろ、牛にとっては感染を引き起こしやすい環境で、感染症の 3 大要因の中でも病原体と感染経路が牛にとって都合の悪い環境で飼育されていると言える。滲出性子宮炎や子宮内膜炎は分娩時からその後の飼育環境から *E. coli* が侵入して起こり、今回明らかにした一連の繁殖成績悪化をもたらす要因が引き起こされるものと考えられる。地域によっては分娩舎の設置のない地域や、敷料が経済的、地理的要因から手に入らない、または手に入っても処理する方法がない地域も存在する。昨今、世界中で問題となっている薬剤耐性菌の出現の対策には、本研究によるエビデンスを基に飼養管理の改善が求められる。また、2020 年から続く COVID19 による世界経済や物流の悪化でインフレが進み、酪農業界としても飼料や原油の高騰により事業存続が危ぶまれる事態が発生しており、コスト削減が急がれている。滲出性子宮炎や子宮内膜炎は酪農経営の中で大きなコストであり、その発生を未然に防ぐことが牛や個別の酪農家のみならず、農業経済や世界経済の発展へ貢献するものとなる。その意味で本研究から明らかになったことはエビデンスとして大きな意味を持つものとなると思う。

謝辞

本研究の遂行と本論文の作成にあたり、終始ご指導及びご校閲を賜りました酪農学園大学 獣医学研究科 獣医生化学研究室 岩野英知教授と藤木純平講師、酪農学園大学 獣医学研究科 獣医衛生学研究室 樋口豪紀教授、酪農学園大学 獣医学研究科 生産動物病態学研究室 大塚浩通教授、酪農学園大学 獣医学研究科 獣医繁殖学研究室 杉浦智親助教に深く感謝いたします。本研究の採材や実験の遂行にあたり、お世話になりましたオホーツク NOSAI・Munby Montgomery 獣医師、湧別牛群管理サービス・塩倉悠靖獣医師に深く労いと感謝を申し上げます。

社会人大学院での本論文執筆にあたり、仕事との両立に関し、精神的サポートを賜りました。十勝 NOSAI・星恵理子獣医師、千賀幸獣医師、坂上久里子獣医師、大和田歩獣医師、神澤彩獣医師、石井千晶獣医師、神澤聖也獣医師、串間宏充獣医師、株式会社ファームノート・中村友美獣医師、のべやま動物診療所・片桐憲和獣医師、片桐愛美獣医師、株式会社ノースベッツ・室矢武則獣医師、湧別牛群管理サービス・吉成健志獣医師、吉成奈奈獣医師、NOSAI 千葉西部家畜診療所の皆様に深く感謝申し上げます。

参考文献

1. Akopyanz, N., Bukanov, N. O., Westblom, T. U., Kresovich, S. and Berg, D. E. 1992. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **20**: 5137–5142.
2. Antikainen, J., Tarkka, E., Haukka, K., Siitonen, A., Vaara, M. and Kirveskari, J. 2009. New 16-plex PCR method for rapid detection of diarrheagenic *Escherichia coli* directly from stool samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**: 899–908.
3. Azawi, O. I. 2008. Postpartum uterine infection in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **105**: 187–208.
4. Barlund, C. S., Carruthers, T. D., Waldner, C. L. and Palmer, C. W. 2008. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology.* **69**: 714–723.
5. Barnhart, M. M. and Chapman, M. R. 2006. Curli Biogenesis and Function. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**: 131–147.
6. Bartlett, P. C., Kirk, J. H., Wilke, M. A., Kaneene, J. B. and Mather, E. C. 1986. Metritis complex in Michigan Holstein-Friesian cattle: incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. *Prev. Vet. Med.* **4**: 235–248.
7. Bhargava, S., Johnson, B. B., Hwang, J., Harris, T. A., George, A. S., Muir, A., Dorff, J. and Okeke, I. N. 2009. Heat-resistant agglutinin 1 is an accessory enteroaggregative *Escherichia coli* colonization factor. *J. Bacteriol.* **191**: 4934–4942.
8. Bicalho, M. L. S., Machado, V. S., Oikonomou, G., Gilbert, R. O. and Bicalho, R. C. 2012. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and

- uterine diseases of dairy cows. *Vet. Microbiol.* **157**: 125–131.
9. Bicalho, R. C., Machado, V. S., Bicalho, M. L. S., Gilbert, R. O., Teixeira, A. G. V., Caixeta, L. S. and Pereira, R. V. V. 2010. Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* **93**: 5818–5830.
 10. Bingen, E., Denamur, E., Brahimi, N. and Elion, J. 2016. Genotyping May Provide Rapid Identification of *Escherichia coli* K1 Organisms That Cause Neonatal Meningitis Author (s): Edouard Bingen , Erick Denamur , Naïma Brahimi and Jacques Elion Published by : Oxford University Press Stable URL : <http://www.jstor>. **22**: 152–156.
 11. Bingen, E. H., Denamur, E. and Elion, J. 1994. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**: 311–327.
 12. Bingen, E., Picard, B., Brahimi, N., Mathy, S., Desjardins, P., Elion, J. and Denamur, E. 1998. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J. Infect. Dis.* **177**: 642–650.
 13. Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. and Shao, Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science (80-.)*. **277**: 1453–1462.
 14. Bonacorsi, S. P. P., Clermont, O., Tinsley, C., Le Gall, I., Beaudoin, J. C., Elion, J., Nassif, X. and Bingen, E. 2000. Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. *Infect. Immun.* **68**: 2096–2101.
 15. Clermont, O., Bonacorsi, P. and Bingen, E. 2000. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4555–4558.

16. De Brito, B. G., Gaziri, L. C. J. and Vidotto, M. C. De Brito, B. G., Gaziri, L. C. J. and Vidotto, M. C. 2003. Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis. *Infect. Immun.* **71**: 4175–4177.
17. Dohmen, M. J. W., Joop, K., Sturk, A., Bols, P. E. J. and Lohuis, J. A. C. M. 2000. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. *Theriogenology.* **54**: 1019–1032.
18. Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventré, A., Elion, J., Picard, B. and Denamur, E. 2001. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology.* **147**: 1671–1676.
19. Fagan, R. P., Lambert, M. A. and Smith, S. G. J. 2008. The Hek outer membrane protein of *Escherichia coli* strain RS218 binds to proteoglycan and utilizes a single extracellular loop for adherence, invasion, and autoaggregation. *Infect. Immun.* **76**: 1135–1142.
20. Gilbert, R. O., Shin, S. T., Guard, C. L., Erb, H. N. and Frajblat, M. 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology.* **64**: 1879–1888.
21. Gilbert, R. O., Shin, S. T., Guard, C. L., Erb, H. N. and Frajblat, M. 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology.* **64**: 1879–1888.
22. Gonzalez Moreno C, Torres Luque A, Oliszewski R, Rosa RJ, O. M. 2020. Characterization of native *Escherichia coli* populations from bovine vagina of healthy heifers and cows with postpartum uterine disease. *PLoS One.* **15**: 1–21.
23. Habibi, M., AsadiKaram, M. R. and Bouzari, S. 2017. Evaluation of prevalence, immunogenicity and efficacy of FyuA iron receptor in uropathogenic *Escherichia coli* isolates as a vaccine target against urinary tract infection. *Microb. Pathog.* **110**: 477–483.

24. Hancock, V., Ferrières, L. and Klemm, P. 2008. The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology*. **154**: 167–175.
25. Herath, S., Lilly, S. T., Santos, N. R., Gilbert, R. O., Goetze, L., Bryant, C. E., White, J. O., Cronin, J. and Sheldon, I. M. 2009. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **7**: 1–13.
26. Herzer, P. J., Inouye, S., Inouye, M. and Whittam, T. S. 1990. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 6175–6181.
27. Jann, K. and Jann, B. 1992. Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance. *Can. J. Microbiol.* **38**: 705–710.
28. Jones, C. H., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Nicholes, A. V., Abraham, S. N. and Hultgren, S. J. 1995. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 2081–2085.
29. Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S. and Johnson, W. H. 2004. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. **62**: 9–23.
30. Kassé, F. N., Fairbrother, J. M. and Dubuc, J. 2016. Relationship between *Escherichia coli* virulence factors and postpartum metritis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **99**: 4656–4667.
31. Klemm, P. and Schembri, M. A. 2000. Bacterial adhesins: Function and structure. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**: 27–35.
32. Krogfelt, K. A., Bergmans, H. and Klemm, P. 1990. Direct Evidence that the FimH Protein Is the Mannose-Specific Adhesin of *Escherichia coli* Type 1 Fimbriae. *Infect. Immun.* **58**: 1995–1998.

33. LeBlanc, S. J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Bateman, K. G., Keefe, G. P., Walton, J. S. and Johnson, W. H. 2002. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **85**: 2223–2236.
34. Lindsey, R. L., Garcia-Toledo, L., Fasulo, D., Gladney, L. M. and Strockbine, N. 2017. Multiplex polymerase chain reaction for identification of *Escherichia coli*, *Escherichia albertii* and *Escherichia fergusonii*. *J. Microbiol. Methods.* **140**: 1.
35. Lutwyche, P., Rupps, R., Cavanagh, J., Warren, R. A. J. and Brooks, D. E. 1994. Cloning, sequencing, and viscometric adhesion analysis of heat-resistant agglutinin 1, an integral membrane hemagglutinin from *Escherichia coli* O9:H10:K99. *Infect. Immun.* **62**: 5020–5026.
36. Magata, F., Horiuchi, M., Miyamoto, A. and Shimizu, T. 2014. Lipopolysaccharide (LPS) inhibits steroid production in theca cells of bovine follicles in vitro: Distinct effect of LPS on theca cell function in pre- and post-selection follicles. *J. Reprod. Dev.* **60**: 280–287.
37. Mancini, J., Weckselblatt, B., Chung, Y. K., Durante, J. C., Andelman, S., Glaubman, J., Dorff, J. D., Bhargava, S., Lijek, R. S., Unger, K. P. and Okeke, I. N. 2011. The heat-resistant agglutinin family includes a novel adhesin from enteroaggregative *Escherichia coli* strain 60A. *J. Bacteriol.* **193**: 4813–4820.
38. Mills, M. and Payne, S. M. 1995. Genetics and regulation of heme iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* **177**: 3004–3009.
39. Moore, S. G., Ericsson, A. C., Poock, S. E., Melendez, P. and Lucy, M. C. 2017. Hot topic: 16S rRNA gene sequencing reveals the microbiome of the virgin and pregnant bovine uterus. *J. Dairy Sci.* **100**: 4953–4960.
40. Moreno, E., Johnson, J. R., Pérez, T., Prats, G., Kuskowski, M. A. and Andreu, A. 2009. Structure and urovirulence characteristics of the fecal *Escherichia coli* population among healthy women. *Microbes Infect.* **11**:

- 274–280.
41. Moreno, E., Planells, I., Prats, G., Planes, A. M., Moreno, G. and Andreu, A. 2005. Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **53**: 93–99.
 42. Pertics, B. Z., Cox, A., Nyúl, A., Szamek, N., Kovács, T. and Schneider, G. 2021. Isolation and characterization of a novel lytic bacteriophage against the k2 capsule-expressing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain 52145, and identification of its functional depolymerase. *Microorganisms.* **9**: 1–20.
 43. Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N. and Whittam, T. S. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 873–884.
 44. Sheldon, I. M. and Dobson, H. 2004. Postpartum uterine health in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **82–83**: 295–306.
 45. Sheldon, I. M. and Noakes, D. E. 1998. Comparison of three treatments for bovine endometritis. *Vet. Rec.* **142**: 575–579.
 46. Sheldon, I. M., Noakes, D. E., Rycroft, A. N., Pfeiffer, D. U. and Dobson, H. 2002. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction.* **123**: 837–845.
 47. Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S. and Gilbert, R. O. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology.* **65**: 1516–1530.
 48. Sheldon, I. M., Rycroft, A. N., Dogan, B., Craven, M., Bromfield, J. J., Chandler, A., Roberts, M. H., Price, S. B., Gilbert, R. O. and Simpson, K. W. 2010. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *PLoS One.* **5**:

49. Spurbeck, R. R., Dinh, P. C., Walk, S. T., Stapleton, A. E., Hooton, T. M., Nolan, L. K., Kim, K. S., Johnson, J. R. and Mobley, H. L. T. 2012. Escherichia coli isolates that carry vat, fyua, chua, and yfcv efficiently colonize the urinary tract. *Infect. Immun.* **80**: 4115–4122.
50. Swasthi, H. M., Bhasne, K., Mahapatra, S. and Mukhopadhyay, S. 2018. Human Fibrinogen Inhibits Amyloid Assembly of Biofilm-Forming CsgA. *Biochemistry.* **57**: 6270–6273.
51. Torres, A. G. and Payne, S. M. 1997. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Mol. Microbiol.* **23**: 825–833.
52. Tükel, Ç., Raffatellu, M., Humphries, A. D., Wilson, R. P., Andrews-Polymenis, H. L., Gull, T., Figueiredo, J. F., Wong, M. H., Michelsen, K. S., Akçelik, M., Adams, L. G. and Bäumlér, A. J. 2005. CsgA is a pathogen-associated molecular pattern of Salmonella enterica serotype Typhimurium that is recognized by Toll-like receptor 2. *Mol. Microbiol.* **58**: 289–304.
53. Veilleux S, D. J. 2006. Presence of Escherichia coli carrying the EAST1 toxin gene in farm animals. *Vet. Res.* **37**: 3–13.
54. Wandersman, C. and Delepelaire, P. 2004. Bacterial iron sources: From siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**: 611–647.
55. Williams, E. J., Fischer, D. P., Pfeiffer, D. U., England, G. C. W., Noakes, D. E., Dobson, H. and Sheldon, I. M. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology.* **63**: 102–117.
56. Williams, E. J., Sibley, K., Miller, A. N., Lane, E. A., Fishwick, J., Nash, D. M., Herath, S., England, G. C. W., Dobson, H. and Sheldon, I. M. 2008. The effect of escherichia coli lipopolysaccharide and tumour necrosis factor alpha on ovarian function. *Am. J. Reprod. Immunol.* **60**: 462–473.

Studies on the effects of virulence factors of Escherichia coli on symptoms and reproductive performance in clinical metritis and endometritis in dairy cows

Rakuno Gakuen University Graduate School

[Doctoral course] Veterinary Medicine

Veterinary Biochemistry YAMAMURA Fuminosuke

In dairy farming, accident-free calving, initiation of lactation, smooth lactation, and conception are important goals to achieve in management. *Escherichia coli* (*E. coli*) is known to be a commensal bacterium of the female reproductive organs of cattle, but it is also an important pathogen that causes reproductive diseases and infertility. Recent studies have focused on the virulence factors (VFs) of *E. coli* regarding the uterus disease, but the actual VFs have not been clearly identified. The objective of this study was to identify *E. coli* VFs associated with clinical metritis and endometritis and their clinical manifestations in cattle. Thirty-two strains of *E. coli* and 4 strains of *Turpereaella pyogenes* (TP) were isolated in the uteri of 19 Holstein dairy cows with obvious clinical signs of clinical metritis and endometritis between 8 and 66 days after parturition at three dairy farms. Three genomic sequences associated with *E. coli* pathogenicity (*chuA*, *yjaA*, and TSPE4.C2) were used to group the strains into four major phylogenetic groups, A, B1, B2, and D. Six VFs of *E. coli* (*fimH*, *fyuA*, *kpsMTII*, *hral*, *csgA* and *astA*) were examined for carriage by PCR, and clinical symptoms and reproductive performance (mixed TP, vaginal discharge score, PMN, days to uterine repair, etc.) were investigated.

In Chapter 1, the carriage of *chuA*, *yjaA*, and TSPE4.C2 in *E. coli* isolates from clinical uterine and endometrial infections that clearly showed clinical symptoms were investigated, and the phylogenetic groups of *E. coli* associated with clinical uterine and endometrial infections was identified. Although previous reports have not focused on cows with uterine infections and obvious symptoms, and the related *E. coli* phylogenetic groups have not been clarified, present study, more *E. coli* classified as high pathogenic B2 were clearly detected than in previous reports that included healthy cows. These results suggested that extraintestinal pathogenic *E. coli* of the high pathogenic B2 group caused the majority of

clinical metritis and endometritis.

In Chapter 2, we investigated the possession of six VF genes (*fimH*, *fyuA*, *kpsMTII*, *csgA*, *hral*, and *astA*) in *E. coli* isolated from the uterus of cows with apparent clinical metritis and endometritis, and investigated the clinical symptoms and the presence of mixed infection with TP. Among the six VFs, four VFs (*fimH*, *hral*, *csgA*, and *astA*) were detected in all *E. coli* strains, *fyuA* was detected in all but two of the endometritis strains, and *kpsMTII* was detected in 60% and 50% of clinical metritis and endometritis, respectively. These results demonstrated that at least six VFs were found to be strongly involved in the pathogenesis of clinical metritis and endometritis. Interestingly, the uterine repair time was 61.6 days in *E. coli*-infected cows carrying *kpsMTII* and 40.6 days in *E. coli*-infected cows without *kpsMTII*, proving that *kpsMTII* is a factor that prolongs the uterine repair time. Furthermore, *kpsMTII* was found to cause mixed infection of TP, especially in young animals.

In this study, for the first time, we identified the strains of *E. coli* associated with clinical metritis and endometritis including the route of infection, and determined six VFs associated with the pathogenicity of these *E. coli*. Among them, *kpsMTII* was found to cause mixed infections with TP and prolong the uterine repair period that affected reproductive performance. Our results will contribute to the elucidation of the essential features of *E. coli* in the development of postpartum uterine infections through further studies of the mechanisms and VFs investigated so far. In addition, by demonstrating that the external invasion of highly pathogenic *E. coli* causes clinical metritis and endometritis, resulting in TP infection and poor reproductive performance, the study clearly demonstrates that what should be done to achieve the non-use of antibiotics, which goes beyond the proper use of antibiotics. We believe that this evidence is of great value.

略語表

| | |
|----------|--------------------------------------|
| DNA | Deoxyribonucleic Acid |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| RAPD-PCR | Random Amplified Polymorphic DNA-PCR |