

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 山村 文之介

学位の種類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当

学位論文の題目 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  
の症状と繁殖成績に対する影響に関する研究

審査委員

主査 教授 岩野 英知（獣医生化学）

副査 教授 樋口 豪紀（獣医衛生学）

副査 教授 大塚 浩通（生産動物内科学）

## 学位論文要旨

### 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 症状と繁殖成績に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

獣医生化学 山村文之介

酪農において、牛が事故なく分娩、泌乳開始し、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。その過程で子宮感染症は繁殖成績を悪化させ、生産を低下させる、防ぐべき重要な課題である。*Escherichia coli* (*E. coli*) は、牛の雌生殖器の常在菌として知られているが、一方で生殖器疾患や不妊症の原因となる重要な病原菌である。最近の研究では、子宮内大腸菌の病原因子 (VF) に注目が集まっているが、実際の子宮内の VF はこれまで明確に特定されていなかった。本研究の目的は、牛の滲出性子宮炎および子宮内膜炎とその臨床症状に関連する *E. coli* の VF を特定することである。3カ所の酪農場において、分娩後8日から66日の間に明らかな臨床症状を呈したホルスタイン種の乳牛19頭の子宮から、32株の *E. coli* と4株の *Turperea pyogenes* (TP) の混合菌が検出された。*E. coli* の病原性に関わる3つのゲノム配列 (*chuA*、*yjaA*、TSPE4.C2) を用いた A, B1, B2, D の4つの主要な系統群グループに分類する方法により、グループ分けを行った。大腸菌の6つのVF (*fimH*、*fyuA*、*kpsMTII*、*hra1*、*csgA*、*astA*) をPCRにより保有状況を調べ、臨床症状と繁殖成績 (混合TP、膣分泌物スコア、PMN、子宮修復までの日数など) を検査した。

第一章では、明らかに臨床症状を示す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、*chuA*、*yjaA* および TSPE4.C2 の保有状況を調査し、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した。これまでの報告において、子宮感染症を発症し、明らかな症状を示す牛に焦点を絞った調査は行われておらず、関連する *E. coli* の系統群は明らかにされて来なかったが、本章では、過去の健康な牛も含めた報告と比べて B2 に分類される *E. coli* を明確に多く検出し、B2 グループの腸管外病原性大腸菌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が確認された。これには鉄取り込みに必要な遺伝子である *chuA* が関わっていることが考えられた。これにより、

滲出性子宮炎や子宮内膜炎は、腔内や子宮内の常在菌はなく、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 *E. coli* により引き起こされることが明らかとなった。

第二章では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* の 6 つの VF 遺伝子 (*fimH*, *fyuA*, *kpsMTII*, *csgA*, *hra1*, *astA*) の保有状況の調査と、臨床症状および TP との混合感染の有無を調査することにより、臨床症状の悪化と TP との混合感染を招く可能性のある *E. coli* の VF について明らかにした。6 つの VF の中でも 4 つの VF (*fimH*, *hra1*, *csgA*, *astA*) がすべての大腸菌株から検出され、*fyuA* は子宮内膜炎株の 2 株を除くすべての株から、*kpsMTII* は滲出性子宮炎と子宮内膜炎のそれぞれ 60%と 50%から検出され、少なくともこれら 6 つの VF が滲出性子宮炎と子宮内膜炎の発症に強く関与していることがわかった。子宮修復期間は、*kpsMTII* を保有する *E. coli* 感染牛では 61.6 日、*kpsMTII* を保有しない *E. coli* 感染牛では 40.6 日であり、*kpsMTII* が子宮修復期間を延長させる要因であることが証明された。また、調査個体の中で TP に混合感染した全ての牛は、それ以前に *kpsMTII* を保有する *E. coli* に感染していた。TP に混合感染していた牛は若い個体であった。*E. coli* の 6 つの VF の中で、*kpsMTII* が特に若い個体に TP の混合感染を招くことが明らかとなった。

本研究では、初めて滲出性子宮炎や子宮内膜炎に関連する *E. coli* の系統を明らかにし、その感染経路と *E. coli* の病原性に関連する 6 つの VF を決定した。その中で、*kpsMTII* は TP との混合感染を招き、繁殖成績に影響を与える子宮修復期間を延長させることが明らかとなった。本研究の成果は、これまでに調べられたメカニズムや VF の研究をさらに進めることで、産後の子宮感染症発症における大腸菌の本質的な特徴の解明に貢献するものである。また、病原性の高い *E. coli* が外部から侵入することにより、滲出性子宮炎や子宮内膜炎を起こし、その結果、TP の感染や繁殖成績の悪化を招くことを明らかにしたことにより、抗生物質の適正使用よりも先にある、抗生物質の不使用を目指すためになされるべきことを明確に示す証拠として、大きな価値があるものと考えられる。

# 論文審査の要旨および結果

## 1 論文審査の要旨および結果

審査は、1) 体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2) 科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

### 論文の概要について

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内で感染した特定の腸管外病原性大腸菌 (ExPEC B2 群、D 群) によって引き起こされること、その中でも病原性に関わる特定の遺伝子である Virulent Factor (VF) の (*fimH*, *fyuA*, *hra1*, *csgA*, *astA*, *kpsMTII*) を持つものが症状を引き起こすことを初めて特定した。特に *kpsMTII* を持つ大腸菌では、膿粘液スコアと PMN% の悪化を主体とする臨床症状の悪化、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可能性が高いことを明らかにした。これらの結果を、以下のよう第二章にまとめた。

#### 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大腸菌の系統群グループ分類

#### 第二章

滲出性子宮炎および子宮内膜炎に関連する大腸菌の VF と臨床症状、繁殖成績、*Trueperella pyogenes* (TP) との混合感染に与える影響

### 研究の背景と目的

酪農生産において、事故なく分娩を終え、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。子宮感染症は、分娩後 21 日以内に全身症状を伴う産褥性子宮炎と子宮内の限局した炎症となる滲出性子宮炎があり前者は治療対象となるが後者が見過ごされ、その後の子宮内膜炎への発症につながるものが危惧される。そのため、この初期の段階での病原性細菌の特定が重要な課題となっている。産後の細菌性の炎症は、まず大腸菌の感染から始まり、その後 *Trueperella pyogenes* (TP) などの複合的な感染へ移行すると考えられている。近年、大腸菌も VF を持つ病原性が強いものと、常在性で比較的病原性が弱いものがあることが明らかとなっているが、牛の子宮内感染症を引き起こす大腸菌について、多くの既報はあるが、明確な VF は同定されていない。そこで本研究では、分娩後、明確な子宮炎を引き起こした牛個体から細菌を分離同定し、その病原性遺伝子 VF を特定し、さらに臨床症状との比較を行うことでその増悪に関わる遺伝子を特定することを目的とした。

## 研究の成果

第一章では、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大腸菌について、Clerrmont らの報告に従って系統群グループ分類を行なった。その結果これまでの牛子宮内感染症における既報と異なり、分離された大腸菌は、病原性の高い B2 (81%)、D 群 (9%) に分類されることが明らかとなった。

第二章では、滲出性子宮炎および子宮内膜炎に関連する大腸菌の VF と臨床症状、繁殖成績、*Trueperella pyogenes* (TP) との混合感染に与える影響を精査した。その結果、*fimH*、*fyuA*、*hra1*、*csaA*、*astA* といった VF をほぼ 100% 保有していることを確認した。また *KpsMTII* 遺伝子を保有する大腸菌は、膿粘液スコア、PMN%、子宮修復日数、初回日数、空胎日数など全てにおいて症状悪化を招き、さらに TP との混合感染を招くことが示唆された。本結果は、牛の産後の子宮内感染症に関与する大腸菌の VF を初めて明確に規定することができたことが示唆され、今後、病原性の低い常在型の大腸菌と比較することで子宮内感染症を引き起こす大腸菌の VF を確定することが期待された。

## 研究の評価

本研究では、酪農生産現場において最も生産性における重要な子宮内炎症性疾患である滲出性子宮炎と子宮内膜炎の発症メカニズムに関わる大腸菌の病原性遺伝子 (VF) の特徴を精査し、病原性悪化に関連する VF を初めて明らかにした。このような子宮内炎症に関わる既報は多数あるが、どの論文でも VF の検出率は低く、子宮内炎症を引き起こすための大腸菌の特徴は明らかでなかった。そのような点から、本研究の成果はこの分野において画期的であり、今後高い評価を受けていく成果として認められるものである。また本成果により、分娩後 21 日以内の早い段階から、今回同定した VF を持つ大腸菌の有無を調べることにより、早期の治療的介入が可能となり、産後子宮内の修復を早め、その後の炎症を引き起こすことなくスムーズな管理が可能となることが考えられる。そのような基礎的なデータから臨床的な応用に至る成果を得たという点において、申請者の日頃から生産動物医療の改善を目指すという視点が本研究の立案に十分に生かされており、さらにその成果を今後、実践できることも評価に値する。

## 学位論文の一部を公表した論文

Yamamura, F., Sugiura, T., Munby, M., Shiokura, Y., Murata, R., Nakamura, T., Fujiki, J. and Iwano H. Relationship between *Escherichia coli* virulence factors, notably *kpsMTII*, and symptoms of clinical metritis and endometritis in dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science* 2022 Jan 27. In press doi: 10.1292/jvms.21-0586.

以上のことから、山村 文之介 氏は、博士 (獣医学) の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

## 2 最終試験の結果

審査委員 3 名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2022 年 2 月 8 日

審査委員

主査 教授 岩野 英知

副査 教授 樋口 豪紀

副査 教授 大塚 浩通