

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08055

研究課題名(和文)牛の子宮内膜炎に関するファージを用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a new therapeutic method using phage for endometritis in cows

研究代表者

安藤 貴朗(Ando, Takaaki)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

研究者番号：40406898

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):分娩2週後の黒毛和種牛50頭およびホルスタイン種牛50頭について、子宮からの灌流液採取を行った。黒毛和種牛では32頭から細菌分離され、20頭がEscherichia coli (E.coli)であり、ホルスタイン種では28頭で細菌が分離され、16頭がE.coliであった。環境水からファージの分離を行い、濁度法により大腸菌増殖阻害試験を実施した。E.coli単独で培養を行うと2時間後には吸光度が上昇したが、同数のファージを混合して培養すると、7時間後まで吸光度の上昇は認められず、ファージの利用は分娩後の牛に対する細菌性子宮内感染症の新たな治療法となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、新規の治療法であるファージを用いた子宮内膜炎の治療法の開発と臨床応用についての基礎的研究を行った。E.coli以外の菌種に対しても有効なファージを複数合わせたカクテル化が成功すれば、臨床現場では菌種を特定することなく使用することができ、広く汎用性を持たせることが可能となる。さらに、この治療法を確立することで抗生剤への耐性化が進む細菌の感染症に対して、安全な治療法を確立することが可能となる。さらに、この治療法を確立することで抗生剤の耐性化の抑制と使用量削減により食の安全性に寄与し、空胎期間の短縮や授精回数の減少により牛の生産性を向上させることが可能となる。

研究成果の概要(英文):We collected perflusate from the uterus, isolated the bacteria in 50 Japanese black cows and 50 Holstein cows two weeks after calving. In Japanese Black cows, bacteria were isolated from 32 (64%), of which 20 (63%) were Escherichia coli (E. coli). On the other hand, in the Holstein cows, bacteria were isolated from 28 (56%), of which 16 (57%) were E. coli. Phages were isolated from environmental water, and Escherichia coli growth inhibition test using the turbidity method was carried out on phages. When the culture was performed only with E. coli, the absorbance increased 2 hours after the start of the culture, whereas when the same number of phages were mixed with the number of bacteria and the culture was performed, the increase of absorbance until 7 hours after the start of the culture was not seen. From these results, it could be used as a new therapeutic method for bacterial intrauterine infection in postpartum cows.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：牛 繁殖 子宮 細菌 ファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 産業動物である牛の生産で優先されるのは、乳用牛では分娩後の泌乳量の確保と後継牛の生産、肉用牛では生涯で多数の産子を獲得して収益を上げることであり、牛の妊娠率を上昇させることは生産性向上に不可欠である。乳用牛では、分娩後に泌乳の影響で免疫機能が低下するため、子宮機能や内分泌動態に関する調査が多く行われている。一方、肉用牛においても長期不受胎となる症例が多くみられるが、その原因調査については不明な点が多い。

(2) 近年では、長期不受胎の原因となる繁殖障害として発情微弱、排卵障害、受胎率低下が世界的に問題となっている。牛の妊娠率に関する研究としては、黄体退行促進、卵胞発育や排卵時期の特定、除放性プロジェステロンによる人工的黄体期の形成などホルモン剤による卵巣制御に関するものが多い。また、卵巣動態は正常であるにも関わらず妊娠しない牛に対しては、受精卵の着床や妊娠維持のために子宮環境を整える方法が検討されている。このことは、近年の受胎率低下の原因は内分泌の異常のみならず、受精卵の着床や妊娠維持に関わる子宮内の異常に起因することを示唆している。そのため、分娩後の牛の子宮内に感染した細菌を早期に特定して治療を行うことにより、子宮内環境を改善することが妊娠率を向上させるために必要であると考えられている。

(3) 現在、細菌感染症の治療としては抗生剤の使用が一般的であるが、薬剤耐性菌の出現により抗生剤を用いない新規の治療法が望まれている。ファージは、特定の細菌に対して抗菌作用を持つことが知らせており、細菌性疾患に関する研究はモデル動物としてのマウス以外に、人や牛、馬などに対する臨床応用を視野に入れた研究が行われている。乳牛において多発する細菌性疾患の一つとして乳房炎があり、乳房炎の主要起因菌である黄色ブドウ球菌に対する治療法としてファージを用いた治療が試みられている。また、緑膿菌やレンサ球菌、大腸菌など様々な細菌種に対するファージの分離も行われており、細菌性疾患に対する新規治療法として注目されている。

2. 研究の目的

(1) 牛において子宮内に感染して子宮内膜炎を惹起する菌種については、様々な種類が報告されている。これらの細菌は牛の品種によっても分離される菌種の割合が異なることが報告されており、臨床現場ではそれぞれの菌種を同定した後に治療することは困難であることから、臨床所見による菌種の推定と、それらをもとにした抗生剤による治療が行われている。本研究では、我が国での飼養頭数の95%以上を占めるホルスタイン種牛および黒毛和種牛のそれぞれの品種における子宮内に感染する菌種を明らかにし、それらに対する特異的なファージを明らかにする。

(2) 現在、繁殖障害の治療方法としては原因となる菌種に有効と考えられる抗生剤の投与が行われているが、薬剤耐性菌の出現が懸念される。また、抗生剤を使用しない治療として子宮内へのヨード剤投与が行われているが、子宮への刺激による炎症の惹起や低濃度使用による不十分な殺菌作用などの問題がある。そのため、臨床的に安全かつ十分な殺菌作用を持つ治療法が望まれており、ファージセラピーの臨床への応用について検証する。

3. 研究の方法

(1) 牛の生殖器検査

分娩2週間前後の黒毛和種繁殖牛およびホルスタイン種搾乳牛について、超音波画像検査により生殖器の確認を行った。超音波画像検査は6.5MHzのリニア型超音波プローブを直腸内に挿入し、卵巣内の構造物の確認、子宮角分岐部の外径、子宮内膜の高輝度領域および子宮内貯留物の有無をBモード画像で確認した。

(2) 子宮からの灌流液採取

超音波画像検査の後に、それぞれの牛について子宮灌流液の採取を行った。子宮灌流液の採取は、16Gのバルーンカテーテルを子宮体へ挿入後、生理食塩水を50ml注入して子宮内を手でマッサージし、その後に注入した生理食塩水を回収した。

(3) 子宮灌流液からの細菌分離

子宮から回収した灌流液を用いて、細菌分離を実施した。子宮内細菌の有無を確認するため、羊血液寒天培地、エドワード培地、クロムアガー培地、DHL培地を用いて好気および微好気下で24~48時間の細菌培養を行った。分離された細菌はそれぞれ菌種の同定を行った。

(4) 特異的ファージの分離と溶菌性確認

子宮灌流液から回収された細菌のうち、最も分離率が高かった *Escherichia coli* (*E.coli*) について、鹿児島県内の環境水を用いて溶菌性のあるファージを分離した。そのうち、溶菌性が高かったファージについて、濁度法を用いた大腸菌増殖阻害試験を実施した。

4. 研究成果

(1) 牛の生殖器検査

調査は黒毛和種繁殖牛 50 頭、およびホルスタイン種搾乳牛 50 頭について実施した。黒毛和種繁殖牛の平均年齢は 5.1 ± 1.3 歳で、平均分娩後日数は 14.7 ± 1.8 日であった。超音波画像検査では、すべての牛で妊娠側の子宮角外径が非妊娠側と比較して有意に長く、子宮内に貯留物が確認された（写真 1）。子宮内貯留物は高輝度膿性であるものが多かった（写真 2）。子宮内膜の高輝度領域は 43 頭（86%）で認められた。

ホルスタイン種搾乳牛の平均年齢は 3.5 ± 0.5 歳で、平均分娩後日数は 14.3 ± 1.5 日であった。超音波画像検査では、黒毛和種と同様にすべての牛で妊娠側の子宮角外径が非妊娠側と比較して有意に長く、子宮内貯留物が確認された。子宮内膜の高輝度領域は 37 頭（74%）で認められた（写真 3）。

超音波画像検査の結果から、分娩 2 週間前後では黒毛和種とホルスタイン種の乳肉どちらの品種においても、子宮の形態的な修復はされておらず、膿性の悪露が貯留している牛が多いことが明らかとなった。



写真 1. 経直腸からの牛の生殖器の超音波画像検査



写真 2. 超音波画像検査により子宮内に高輝度の膿性貯留物を有する症例



写真 3. 超音波画像検査により子宮内膜に高輝度領域を有する症例

(2) 子宮からの灌流液採取

調査を行ったすべての牛で、子宮内に生理食塩水を注入した後に灌流液の回収が実施できた。黒毛和種とホルスタインの両種ともに回収した子宮灌流液はすべて混濁しており、多くは膿が混入して黄色を呈していた（写真 4）。一部の牛では、子宮内の血液が混入して赤褐色を呈するものが認められた（写真 4）。

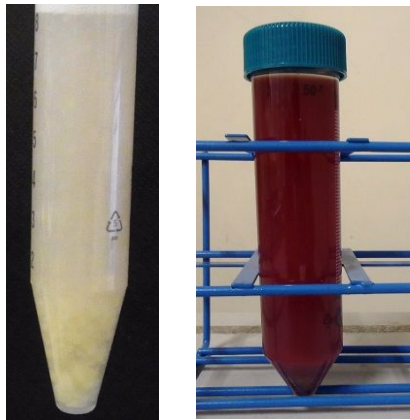


写真4. 子宮から回収した子宮灌流液

膿の混入により黄色(左)や、血液の混入により赤褐色(右)を呈するものが多数であった。

(3) 子宮灌流液からの細菌分離

黒毛和種繁殖牛 50 頭について、子宮内灌流液からの細菌分離結果を表 1 に示した。黒毛和種牛では、32 頭(64%)から細菌が分離され、そのうち 20 頭(63%)が *E.coli* であった。また、*Staphyrococcus spp.* が 7 頭(22%)、*Streptococcus spp.* が 2 頭(6%)、*Trueperella pyogenes* が 2 頭(6%)、*Corynebacterium renale* が 1 頭(3%)から分離され、未分離は 18 頭(36%)であった。

同様に、ホルスタイン種牛 50 頭の子宮内灌流液の細菌分離結果を表 2 に示した。ホルスタイン種牛では、28 頭(56%)から細菌が分離され、そのうち 16 頭(57%)が *E.coli* であった。また、*Staphyrococcus spp.* が 7 頭(25%)、*Streptococcus spp.* が 2 頭(7%)、*Trueperella pyogenes* が 2 頭(7%)、*Pseudomonas aeruginosa* が 1 頭(4%)から分離され、未分離は 22 頭(44%)であった。

我々の以前の調査では、黒毛和種牛において分娩 2 週後に細菌感染が認められた場合、子宮の修復が遅延するとともに発情回帰の遅延が起こり、受胎率の低下や授精回数増加など繁殖成績が低下することを報告している。今回、黒毛和種とホルスタインの乳肉両種において分娩 2 週後には 50%以上の牛で細菌が分離されており、これらの結果から半数以上の牛で繁殖成績が低下する可能性が示唆された。

表 1. 黒毛和種牛における子宮灌流液の採取頭数と分離細菌種

	2016年	2017年	2018年	2019年	合計
調査頭数	15	13	15	7	50
細菌分離頭数	13	11	5	3	32
<i>Escherichia coli</i>	8	8	2	2	20
<i>Staphyrococcus spp.</i>	2	1	3	1	7
<i>Streptococcus spp.</i>	1	1	0	0	2
<i>Trueperella pyogenes</i>	1	1	0	0	2
<i>Corynebacterium renale</i>	1	0	0	0	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0
未分離頭数	2	2	10	4	18

表 2. ホルスタイン種牛における子宮灌流液の採取頭数と分離細菌種

	2016年	2017年	2018年	2019年	合計
調査頭数	17	12	13	8	50
細菌分離頭数	12	9	4	3	28
<i>Escherichia coli</i>	8	4	2	2	16
<i>Staphyrococcus spp.</i>	2	2	2	1	7
<i>Streptococcus spp.</i>	1	1	0	0	2
<i>Trueperella pyogenes</i>	1	1	0	0	2
<i>Corynebacterium renale</i>	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	1	0	0	1
未分離頭数	5	3	9	5	22

(4) 特異的ファージの分離と溶菌性確認

子宮灌流液から回収された細菌では *E.coli* の分離が半数以上を占めたため、鹿児島県内の 5 か所の環境水を用いて溶菌性のあるファージを分離した。そのうち、溶菌性が他に比較して高かったファージについて、濁度法を用いた大腸菌増殖阻害試験を実施した。

E.coli のみで培養を行った場合、培養開始 2 時間後には吸光度が著しく上昇したのに対し、*E.coli* に対して同数のファージを混合して培養を実施すると、培養開始 7 時間後までは吸光度の上昇はみられなかった。さらに、7 時間以降は *E.coli* は増加したものの、24 時間後においても単独培養に比較して濁度の上昇は著しく抑制された。また、*E.coli* に対して 1/10 のファージを混合して培養した結果、同数の混合と同様の変化を示した。

環境水から分離されたファージを全ゲノムシーケンスにより鑑定したところ、*Myoviridae* 科、*Tequatrovirus* 属の *Escherichia virus* T4 に近縁な株であることが判明した。

以上の結果から、子宮内から分離される *E.coli* に対して、溶菌性を有するファージの存在が確認され、分娩後の牛に対する細菌性子宮内感染症の新たな治療法として利用できる可能性が示された。

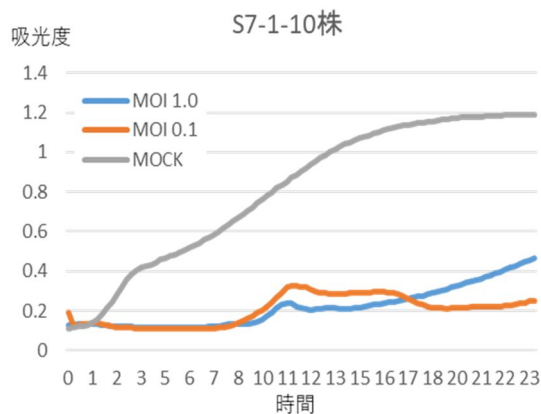


図 1 . 環境水から回収したファージを用いた増殖阻害試験

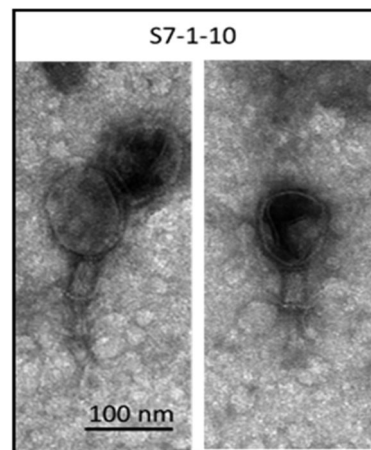


写真 5 . 環境水から回収したファージの電子顕微鏡写真

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大竹諒平、安藤貴朗、藤川拓郎、本川裕介、綿屋健太、乙丸孝之介、永野理樹、窪田 力
2. 発表標題 乳汁中P4測定を利用した搾乳牛の人工授精および胚移植タイミングの検討.
3. 学会等名 日本産業動物獣医学会（九州地区）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡寺涼太、安藤貴朗、窪田 力.
2. 発表標題 活動量計を用いた搾乳牛の繁殖および疾病管理の検討.
3. 学会等名 日本産業動物獣医学会（九州地区）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	樋口 豪紀 (Higuchi Hidetoshi) (00305905)	酪農学園大学・獣医学群・教授 (30109)	
研究分担者	岩野 英知 (Iwano Hidetomo) (60382488)	酪農学園大学・獣医学群・教授 (30109)	

