

14 腸管外病原性大腸菌の関与が疑われた黒毛和種子牛の敗血症型大腸菌症について

胆振家畜保健衛生所

○三浦 明奈 平松 美裕子
矢口 弘美¹⁾ 井上 恭彰²⁾
¹⁾ 現空知家畜保健衛生所
²⁾ 現根室家畜保健衛生所

はじめに

大腸菌症の原因菌は、保有病原因子により下痢病原性大腸菌と腸管外病原性大腸菌に大別される。今般、管内で発生した牛の敗血症型大腸菌症について、分離菌の病原因子を検索し、腸管外病原性大腸菌の関与を疑ったので概要を報告する。

I 発生の概要

1 農場の概要

黒毛和種の繁殖牛 80 頭、哺育・育成牛 40 頭を飼養する肉用繁殖専門農場であり、哺育牛は初乳摂取後、人工哺乳により管理、その他の牛は放牧地を併設するフリーバーンで管理されていた。

2 発生の経緯

令和 2 年 9 月、上記農場において、哺育牛 1 頭（黒毛和種、雄、令和 2 年 9 月 12 日生）が正常分娩にて出生したものの、翌日に沈鬱、起立不能となり、その後死亡したため、当該死体について病性鑑定を実施した。

II 病性鑑定成績

1 材料と方法

(1) 病理学的検査

剖検後、脳、五大臓器、臍動脈及び膀胱について HE 標本を作製するとともに、脳について抗 O15 群大腸菌を用いた免疫組織化学的染色標本を作製した。

(2) 細菌学的検査

脳及び五大臓器について、5%羊血液寒天培地及び DHL 寒天培地を用いて、37°C 好気 5%CO₂ 及び嫌気培養を行った。また消化管内容物について、サルモネラ選択増菌・分離培地を用いて、37°C 好気培養を行った。

また、分離菌について、ディスク拡散法により薬剤感受性試験を行った。

(3) 大腸菌遺伝子検査

脳及び肺から分離した大腸菌について、PCR 法により O 抗原及び病原因子（鉄取込関連因子、付着・侵入因子、毒素産生因子、莢膜）を検索した。

(4) ウイルス学的検査

脳、肺、腎臓の 10%乳剤及び白血球について、PCR 法による牛ウイルス性下痢ウイルス、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、アカバネ病ウイルス及び牛アデノウイルス 7 型遺伝子検査を実施した。

2 結果

(1) 病理学的検査

ア 剖検所見

大脳、中脳及び延髄に出血巣がみられた。左右肺前葉及び中葉に長辺 1cm の肝変化病巣が点在していた。

イ 病理組織所見

脳、肺、腎臓及び臍動脈に出血を伴う炎症像とこれに一致してグラム陰性菌の集簇がみられた。臍動脈では重度の血栓形成（図 1）、肺では肺動脈内の血栓形成と重度の出血がみられた（図 2）。免疫組織化学的染色の結果、中脳、肺、腎臓及び臍動脈において炎症像に一致して見られた菌体は抗 O15 群大腸菌兔血清に対し陽性であった（図 3、4）。

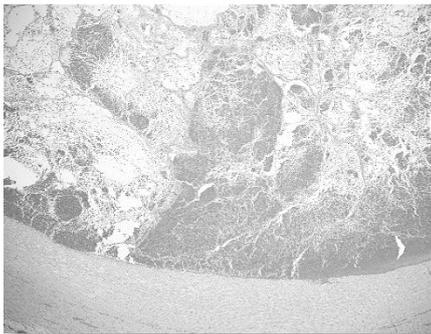


図 1 臍動脈：血栓(HE 染色)

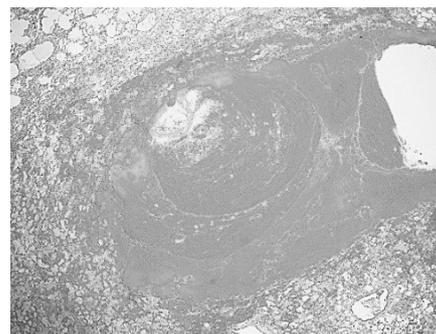


図 2 肺：血栓及び出血(HE 染色)

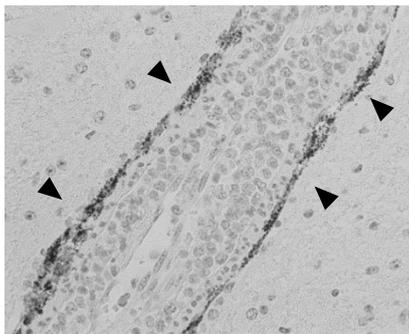


図 3 中脳：血管周囲の大腸菌 O15 群陽性抗原（矢頭）
（免疫組織化学染色）

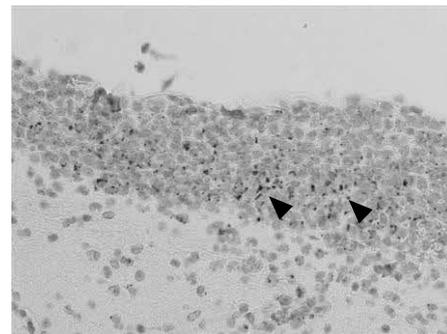


図 4 中脳：髄膜炎に一致した大腸菌 O15 群陽性抗原（矢頭）
（免疫組織化学染色）

(2) 細菌学的検査

供試材料（脳及び五大臓器）全てから、大腸菌が有意に分離された。サルモネラは陰性であった。薬剤感受性試験成績は図 5 のとおりであった。

ペニシリン系	ペニシリン	耐性
	アンピシリン	耐性
セフェム系(第1世代)	セファゾリン	耐性
	セファロチン	耐性
セフェム系(第3世代)	セフトオフル	感受性
アミノグリコシド系	ストレプトマイシン	耐性
	カナマイシン	感受性
	ゲンタマイシン	耐性
マクロライド系	エリスロマイシン	耐性
テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	耐性
クロラムフェニコール系	クロラムフェニコール	感受性
キノロン系	ナリジクス酸	感受性
	オキシリン酸	感受性
ニューキノロン系	エンロフロキサシン	感受性
	オルビフロキサシン	感受性
	マルボフロキサシン	感受性

図 5 分離菌の薬剤感受性試験結果

(3) 大腸菌遺伝子検査

O15 群及び鉄取込関連因子 *iutA* において標的配列と同サイズの断片が得られた (図 6)。

	腸管外病原性関連遺伝子						下痢病原性関連遺伝子								
	<i>Og15</i>	<i>iutA</i>	<i>cnf2</i>	<i>cdtIII</i>	F17	<i>afa8</i>	Stx1	Stx2	<i>eae</i>	STa	STb	LT	F4	F5	F41
脳	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肺	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

図 6 大腸菌遺伝子検査結果

(4) ウイルス学的検査

試験した 4 項目全てにおいてウイルス遺伝子陰性であった。

3 疾病診断

検査成績から敗血症型大腸菌症と診断した。

III 分離菌の検証

1 病原因子を標的とした PCR

(1) 材料

脳及び肺より分離された O15 群大腸菌を供試した。

(2) 方法

腸管外病原性大腸菌に特徴的とされる病原因子である血液内生存能を裏付ける鉄取込能、組織傷害に関与する付着・侵入因子、毒素産生、その他宿主免疫回避能等、計 26 種類について、当該遺伝子配列を標的とした PCR を実施した [1-19]。

(3) 結果

遺伝子検査の結果、鉄取込関連因子 *iutA*、*irp1*、*irp2*、*fyuA*、*iroN*、付着・侵入因子 *afaC*、CS31A、*iha*、*fimH*、莢膜 *kpsMTII* において標的配列と同サイズの断片が得られた。なお、下痢病原性大腸菌が有する主要な病原因子の保有は認められなかった。

(4) 病原因子保有パターンの比較 (図 7)

本事例においては、鉄取込能、付着・侵入因子において複数の因子を保有していたものの、既報の毒素産生能は確認されなかった [1-9]。国内報告事例において病原因子は様々なパターンがあり、また、本事例と同じパターンは見られなかった。

本事例		国内報告（2012～2019年に国内で報告された哺育・育成牛22例）																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
鉄 取 込 能	iutA																						
	irp1																						
	irp2																						
	fyuA																						
	aer																						
	iroN																						
付 着 ・ 侵 入	F17																						
	afa8																						
	afaBC																						
	afaC																						
	papA																						
	papC																						
	ibeA																						
	ipaH																						
	CS31A																						
	iha																						
	fimH																						
	毒 素 産 生	cnf2																					
cnf1																							
cdtIII																							
cdtIV																							
hly																							
そ の 他	kpsMTII																						
	kpsMTIII																						
	colV																						
	usp																						

図 7 本事例と国内報告事例における病原因子保有パターンの比較
（陽性：黒、陰性：灰、未実施：白）

IV 対策

病理組織学的検査の結果、臍帯を介した感染が強く疑われたことから、分娩場所の消毒の実施と、出生直後の子牛の衛生管理の再徹底を指導した。対策実施後、同様の事例は発生していない。

V まとめ及び考察

分離菌において保有が示唆された病原因子は、国内外で過去に報告された牛の敗血症型大腸菌由来株の病原因子と概ね一致し、本菌は牛由来の腸管外病原性大腸菌であると強く疑われた。一方で、分離菌の病原因子の保有パターンは各報告とは異なっていたことから、敗血症型大腸菌症において分離菌を分類する際は、複数の因子の保有状況を確認する必要があり、引き続き、国内外の事例と比較するとともに保有が示唆された因子の作用を検討し、本菌の分類を試みることで類似症例の病性鑑定上必要と考えられた。

また、本事例は既報と同様に継続発生はなく、日和見的な病態と考えられたが、引き続き症例数を揃え、病態を明らかにすることが、哺育牛の飼養衛生管理において有用であり、生産性向上に資するものと思われる。

引用文献

- [1] 菅原克、松本裕一、壁谷昌彦、大西英高、稲見健司、穂積愛美、佐藤敦子、井戸徳子：子牛の腸管外病原性大腸菌感染症と PCR による分離株の病原関連遺伝子の検索についての報告、日獣会誌、65、689-693(2012)
- [2] 古田信道、大貫淳、小嶋暢：子牛の腸管外病原性大腸菌感染症 2 例と培養細胞を用いた病原性の検討、日獣雑誌、69、524-528(2016)
- [3] 水谷恵子、山本香織、井田正己：敗血症を呈した牛から分離された大腸菌の病原性関連遺伝子の検索、日獣雑誌、71、307-310(2018)
- [4] 矢島りさ：虚弱子牛にみられた腸管外病原性大腸菌による化膿性脳髄膜炎、家畜衛生研修会抄録集、第 35 号、36(2011)
- [5] 曾地雄一郎、矢島りさ、千葉直幸、竹田百合子、小寺文、西清志：黒毛和種子牛にみ

- られた牛アデノウイルス 4 型感染を伴う腸管外病原性大腸菌感染症、平成 26 年度宮城県家畜保健衛生業績発表会集録、41-43(2014)
- [6] 滝澤亮、藤田敦巳、磯村美乃里：敗血症型牛大腸菌症由来株の分子疫学解析、平成 29 年度大分県家畜保健衛生業績発表会集録
- [7] 北原尚英、三角和華子、是枝輝紀、千歳健一：血清型 O55 及び O88 による子牛の腸管外病原性大腸菌感染症、令和元年度鹿児島県家畜保健衛生業績発表会抄録、14(2017)
- [8] 浦川了、鈴木史子：腹膜炎と胸膜炎を併発した子牛の腸管外病原性大腸菌感染症を疑う 2 症例、令和元年度長崎県家畜保健衛生業績発表会集録、39-41(2019)
- [9] 滝澤亮、河上友：黒毛和種子牛に発生した大腸菌 O-119 による敗血症事例、平成 27 年度大分県家畜保健衛生業績発表会集録
- [10] Yolande Bertin, Christine Martin, Jean-Pierre Girardeau, Pierre Pohl, Michel Contrepois : Association of genes encoding P fimbriae CS31A antigen and EAST1 toxin among CNF1-producing Escherichia coli strains from cattle with septicemia and diarrhea, FEMS Microbiology Letters ,162,235-239(1998)
- [11] H.Karch, S.Schubert, D.Zhang, W.Zhang, H.Schmidt, T.Olschlager, J.Hacker : A Genomic Island, Termed High-Pathogenicity Island, Is Present in Certain Non-O157 Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Clonal Lineages, INFECTION AND IMMUNITY, Nov, 5994-6001(1999)
- [12] James R.Johnson, Adam L.Stell : Extended Virulence Genotypes of Escherichia coli Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise, The Journal of Infectious Diseases, 181:261-72(2000)
- [13] Chantal le Bouguenec, Lila lalioui, Laurence du Merle, Mabel Jouve, Pascale Courcoux, Saeid Bouzari, Rangaraj Selvarangan, Bogdan J.Nowicki, Yves Germani, Antoine Andreumont, Pierre Gounon, Marie-Isabelle Garcia : Characterization of AfaE Adhesins Produced by Extraintestinal and Intestinal Human Escherichia coli Isolates : PCR assays for Detection of Afa Adhesins That Do or Do Not Recognize Dr Blood Group Antigens, Journal of Clinical Microbiology, May, 1738-1745(2001)
- [14] Toni A.Chapman, Xi-Yang Wu, Idris Barchia, Karl A. Bettelheim, Steven Driesen, Darren Trott, Mark Wilson, James J.-C. Chin : Comparison of Virulence Gene Profiles of Escherichia coli Strains Isolated from Healthy and Diarrheic Swine, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, July, 4782-4795(2006)
- [15] Morgan Bihannic, Reza Ghanbarpour, Frederic Auvray, Laurent Cavalie, Pierre Chatre, Michele Boury, Hubert Brugere, Jean-Yves Madec and Eric Oswald : Identification and detection of three new F17 fimbrial variants in Escherichia coli strains isolated from cattle, Veterinary Research, 45:76(2014)
- [16] Chahinez Messaili, Yamina Messai, Rabah Bakour : Virulence gene profiles, antimicrobial resistance and phylogenetic groups of fecal Escherichia coli strains isolated from broiler chickens in Algeria, Veterinaria Italiana, 55(1), 35-46(2019)
- [17] Shivanthi Samarasinghe, Ruth Reid, Majid AL-Bayati : The anti-virulence effect of cranberry active compound proanthocyanins (PACs) on expression of genes in the third-generation cephalosporin-resistant Escherichia coli CTXM-15 associated with urinary tract infection, Antimicrobial Resistance and Infection Control, 8:181(2019)
- [18] Rocio Colello, Alejandra Kruger, Maria Victoria Velez, Felipe Del Canto, Analia Ines Etchevarria, Roberto Vidal, Nora Lia Padola : Identification and detection of iha

subtypes in LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from humans, cattle and food, *Heliyon* 5, e03015 (2019)

- [19] Maryam Raeispour, Reza Ranjbar : Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic *Escherichia coli* strains, *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7:118 (2018)