

10. 敗血症型牛大腸菌症由来株の分子疫学解析

玖珠家畜保健衛生所 畜産研究部¹⁾ 大分家畜保健衛生所²⁾

○ (病鑑) 滝澤亮 藤田敦己¹⁾ 病鑑 磯村美乃里²⁾

【はじめに】

2016年我々は、敗血症を呈した牛大腸菌症の特徴は、化膿性髄膜脳炎が頻発し、その分離株は毒素因子 (cnf2、cdtⅢ)、付着因子 (afa8)、鉄取込能因子 (iutA) を保有すると報告した。その後、同様の症例が数例発生したことを受け、敗血症由来大腸菌株に共通な病原因子の存在や、株間の遺伝子的相似性について、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 及び近年多くの病原細菌や食中毒菌のゲノムタイピング技術として普及しているmultilocus sequence typing (MLST) などの分子疫学手法を用いて解析を行った [1, 2, 4]。

【解析内容】

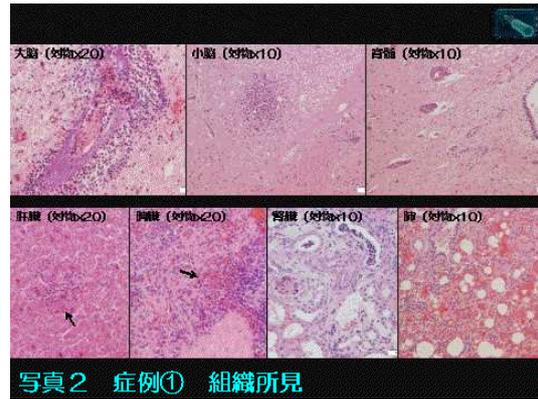
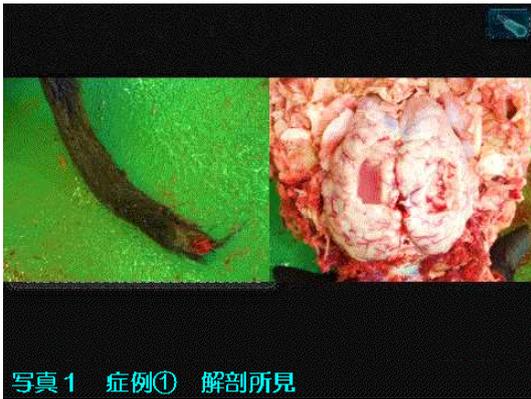
解析は、以下の項目について実施した。

1. 病原因子：PCR法を用いて、毒素 (cnf2、cdtB)、付着因子 (afa、F17、papC)、鉄取込能 (iutA、fyuA、irp1、irp2) を検索。
2. PFGE：制限酵素Xba I、電圧勾配6V、スイッチ時間5～40秒、泳動時間22時間で実施。
3. MLST：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門に依頼し、変異の少ない7つのハウスキーピング遺伝子 (adk、fumC、gyrB、icd、mdh、purA、recA) を解析。

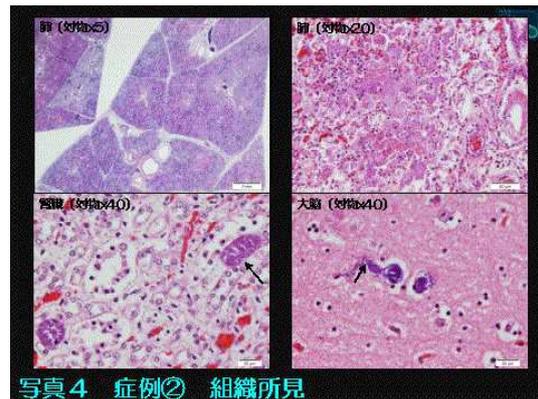
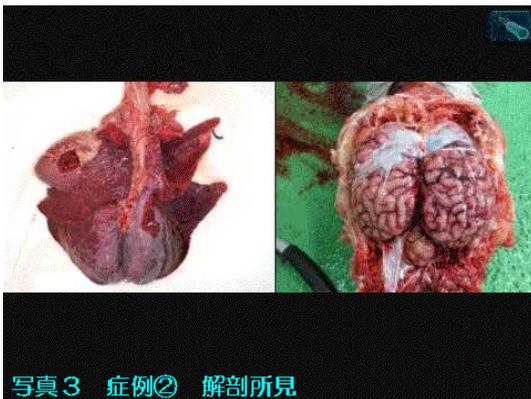
【発生概要】

5症例について解析を行った。以下、主な病性と解析結果を記載する。

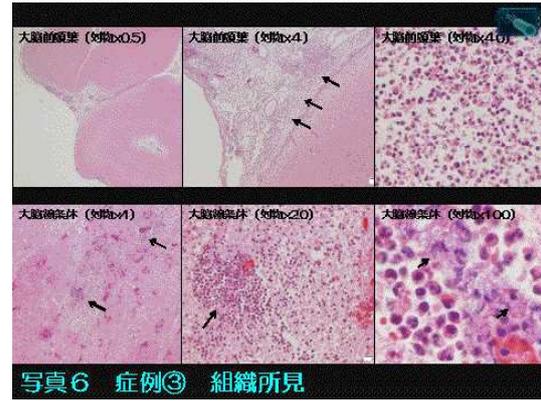
症例①：A町黒毛和種繁殖30頭規模、8ヶ月齢去勢。当該牛は突如起立不能となり、翌日神経症状を呈し、予後不良と判断し鑑別殺を実施。外貌では尾の裂傷が見られ、解剖所見では、諸臓器に著変は認められず、脳では脳溝の不明瞭化と脳脊髄液の混濁と増量が観察された (写真1)。細菌検査では、主要臓器と脳から大腸菌078が分離され、分離株は毒素因子 (cnf2、cdtB)、付着因子 (afa)、鉄取込能因子 (iutA、fyuA、irp1、irp2) を保有。病理組織所見では、大脳の血管壁に細菌塊とその周囲には好中球が浸潤し、小脳では微小膿瘍、肝臓では多発巣状壊死及び微小膿瘍 (矢印)、化膿性脾炎等、その他の組織でも化膿性炎像が観察された (写真2)。



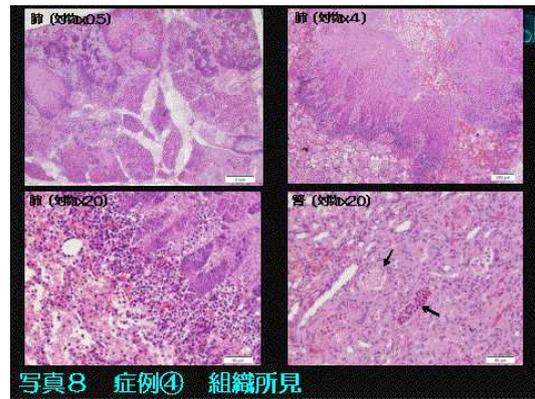
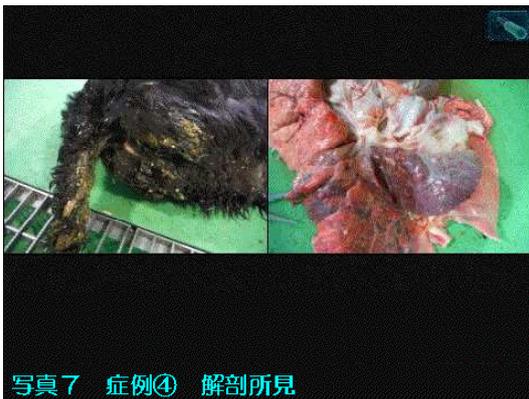
症例②：A町黒毛和種繁殖60頭規模、2日齢雄。生時より神経症状と起立不能を呈し、2日後に死亡。解剖所見では、肺の肝変化と脳血管の怒張が観察された（写真3）。細菌検査では、主要臓器、脳、胸水から大腸菌015が分離された。しかし、分離部位で検出される病原因子に一部違いがあり、主要臓器・胸水由来株では、付着因子（papC）、鉄取込能因子（fyuA、irp1、irp2）を、脳由来株では、鉄取込能因子（fyuA、irp1、irp2）を保有していた。病理組織所見では、肺胞内に細菌塊が充満し、好中球の浸潤や線維素の析出が観察され、腎臓と大脳実質内の血管内にも細菌塊（矢印）が観察されたが、その他組織に著変は認められなかった（写真4）。



症例③：A町黒毛和種繁殖100頭規模、2日齢雄。1日齢で自力哺乳停止、その後起立不能となり、翌日に鑑定殺。解剖所見では、大脳表面、脳底部の混濁が観察された（写真5）。細菌検査では、肝臓、脳及び母牛膣から大腸菌015が分離され、母牛については、3回ヨード剤にて膣洗浄した後も大腸菌015が分離された。これら分離株は、毒素因子（cnf2）、付着因子（afa、F17）、鉄取込能因子（iutA、fyuA、irp1、irp2）を保有。病理組織所見では、大脳髄膜に好中球の重度浸潤が観察され、実質でも出血や好中球による囲管性細胞浸潤や、桿状の菌塊も観察された（写真6）。



症例④：A町黒毛和種繁殖70頭規模、18日齢雌。長期在胎のため、やや難産で娩出されるも特に異常はなかったが、7日齢より水様下痢をはじめ、治療に反応せず予後不良と判断され、鑑定殺。解剖所見では、下痢による尻の周囲の汚れ、肺の一部で肝変化が観察された（写真7）。細菌検査では、肺、脳から大腸菌0g9（0g；血清反応は0 UT、遺伝子による血清型別）が、腎臓から大腸菌08が分離された。肺と脳由来株では、鉄取込能因子（*iutA*、*fyuA*、*irp1*、*irp2*）が、腎臓由来株では、付着因子（*afa*、*papC*）、鉄取込能因子（*fyuA*、*irp1*、*irp2*）を保有。病理組織所見では、肺で多数の細菌塊、炎症性細胞浸潤、線維素の析出が観察され、腎の尿細管腔内には好中球の浸潤と漿液の貯留（矢印）が観察された（写真8）。



症例⑤：B市黒毛和種繁殖100頭規模、7日齢（2014年発生）。難産で娩出され、2日齢から水様下痢、哺乳力低下を示し、5日齢で起立不能、7日齢で死亡。解剖所見では、左右眼房水の白濁、頸椎間に線維素の析出が観察された（写真9）。細菌検査では、主要臓器、脳、腹水から大腸菌0119が分離され、分離株は付着因子（*afa*、*papC*）、鉄取込能因子（*iutA*、*fyuA*、*irp1*、*irp2*）を保有。病理組織所見では、大脳実質で好中球による囲管性細胞浸潤、膿瘍及び出血が観察され、心臓では、心外膜に好中球の重度浸潤、微小膿瘍、線維素の析出、脾臓では、白脾髄のリンパ球数減少が観察された。大腸菌0119免疫ウサギ血清を用いた免疫染色では、病変部の菌体や好中球に陽性像が確認された。

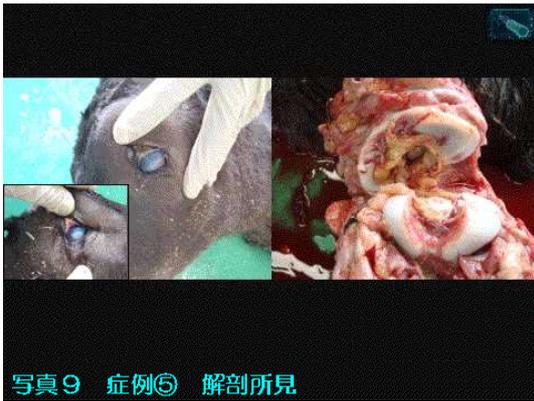


写真9 症例⑤ 解剖所見

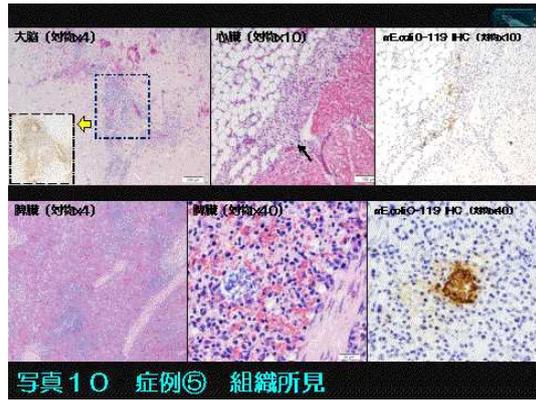


写真10 症例⑤ 組織所見

【疫学解析結果】

PFGE：同町で発生した症例①～④由来株について実施（図1）。各症例毎のPFGE型別では、分離部位で0型別が異なる症例④を除き、PFGE型は一致した。また、症例③の株No. 10とNo. 11は母牛の膻からの分離株であり、発生時も3回の膻洗浄後も同一PFGE型の株が分離されていたことがわかる。症例間を比較すると、遺伝子的同一性は認められなかった。

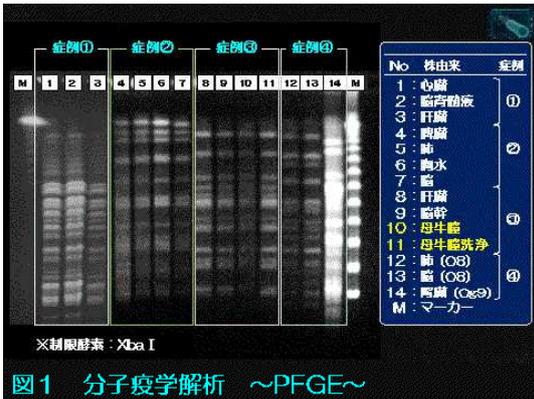


図1 分子疫学解析 ~PFGE~

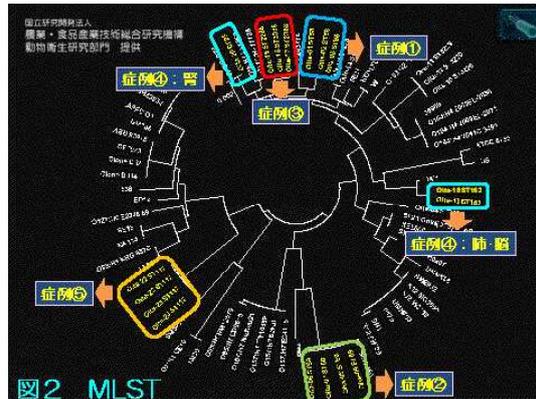


図2 MLST

MLST：各症例毎で比較すると、株のST番号は一致し、すなわち同一由来株での敗血症であったことが判明したが、症例④のように分離部位で全く異なるST番号になる株も確認された。各症例間を比較すると、系統樹の様々な箇所位置することから、MLST解析でも、症例間に遺伝子的同一性は認められなかった（図2）。

【まとめ及び考察】

各症例由来の分離株について、菌性状結果を表1にまとめた。全株、鉄取込能の3因子（fyuA、irp1、irp2）が共通して検出されているものの、PFGE型並びにMLST型に症例間で相関性はなく、各症例は単独で発生していることが示唆された。

病態をみると、症例①、③、⑤については脳炎が顕著で各組織で化膿性炎像が見られるのに対して、症例②、④

症例	株由来	O型	病原因子									MLST		PFGE
			毒素			付着因子			鉄取込能			ST	CC*	
			ent2	eddB	afa	F17	bapC	NFA	fyuA	irp1	irp2			
①	心肝 脳脊髄液	78	+	+	+	-	-	-	+	+	+	58	155	A
②	脳肺 脾臓	15	-	-	-	-	+	-	-	+	+	69	69	B
③	脳幹 肝 母牛膻	15	+	+	+	+	-	-	+	+	+	2388	-	C
④	脳肺	9	-	-	-	-	-	-	+	+	+	162	469	D
	腎	8	-	-	+	-	+	-	+	+	+	23	23	E
⑤	脳肺脾	119	-	-	+	-	+	+	+	+	+	117	-	NT
	腹水	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-

表1 菌性状検査

*CC (clonal complex) : 最大多数のSTを近似的STことにまとめたもの

は肺炎が顕著で、脳には血管内に菌塊が見られるものの、細胞反応が見られないことは、敗血症型の牛大腸菌症では、化膿性髄膜炎は頻発するものの、肺病変が主体となる症例もあることが判明した。そして、今回の菌性状結果からは、脳脊髄炎の発症には非線毛性付着因子afaの存在が重要であると考えられた [3]。

敗血症の病原因子としては、鉄取込能因子のfyuA、irp1、irp2の3因子が必須の存在と考えられ、これら3因子は、腸内細菌群が産生するエルシニアバクチンの合成に関与する因子である。エルシニアバクチンとは、高親和性の鉄キレート剤であり、病原菌の宿主内での増殖を促し、全身病原性を与える作用を持つとされる [5]。よって、今回報告の症例由来株はエルシニアバクチンを産生することで、鉄イオンの豊富な血中に移行しやすい株であったと考えられ、細胞反応の有無に関わらず、あらゆる組織から分離されたものと考えられる。また、母牛の膣から、症例発生後すぐでも、膣洗浄を3回実施したあとでも同一由来株が分離されたことは、産道に病原菌が常在化し、その排除が困難であることが示唆された。

以上のことから、敗血症型牛大腸菌症は、(1) 菌株が腸内細菌群であること、(2) 決まった血清型がないこと、(3) 菌株間にも遺伝子的関連性がないことからどの生産農場でも発生の可能性があると考えられる。加えて、宿主に全身病原性を与えやすく、産道での常在化も疑われることから、日常の環境消毒等の予防策も重要であるが、発生時の対症療法がより重要であると考えられる。

【謝辞】

稿を終えるにあたり、MLST解析や遺伝子検査にご尽力いただいた、国立研究開発法人 農研機構 動物衛生研究部門 越境性感染症研究領域 暖地疾病防除ユニット 楠本正博上級研究員に深謝する。

【参考文献】

1. 菅原克ら、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、2013.
2. 古田信道ら、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、日獣会誌、69、524-528、2016.
3. 宮崎修一、髄膜炎発症機序の解析、東邦医学会誌、60(3)、168--173、2013.
4. 木村凡、これからの細菌のゲノムタイピングとしてのMLST法、モダンメディア、52(7)、209-216、2006.
5. 山本重雄ら、病原菌の鉄獲得機構、日本細菌学雑誌、51(2)、523-547、1996.