

13. 黒毛和種子牛で発生した

志賀毒素産生性大腸菌022の腸管外感染事例

大分家畜保健衛生所・¹⁾ 畜産研究部・²⁾ 宇佐家畜保健衛生所
○病鑑 磯村美乃里・児玉千尋¹⁾・安達聡²⁾
・長谷部恵理²⁾・病鑑 中出圭祐・病鑑 河上友

【緒言】

病原性大腸菌には、大きく分けて、腸管内に感染して下痢の原因となるもの（下痢原性大腸菌）と、腸管外の諸臓器に感染するもの（腸管外病原性大腸菌；ExPEC）とがある[1]。

下痢原性大腸菌には、ヒトのO157などによる食中毒でよく知られる志賀毒素（Stx）産生性大腸菌（STEC）などがあり[2]、しばしば牛の腸管内に常在しヒトへの感染源として重要視されている[3][4]。

牛のExPECについては、近年、当県でも子牛の大腸菌症が増加している。STECの保有する病原因子（毒素、付着因子）[5]と比較すると、ExPECでは複数の病原因子[6]、特に鉄取込能因子を高率に保有することが示唆されている[19]。しかしExPECは免疫機能が低下した虚弱な子牛が偶発的に感染するとも言われており、詳しい原因は明らかではない。

以上に述べたように、子牛のExPEC感染については不明な点が多いが、これまでSTECが腸管以外に感染した事例の詳細な報告はない。

ところが、本年度、県内の黒毛和種農家で、2日齢の黒毛和種子牛におけるStx産生性大腸菌022の肺及び心臓への感染という稀な事例が発生したので、その概要を報告する。

さらに、県内の過去のExPECの症例及び既報の022株との比較を行ったので併せて報告する。

【発生概要】

当該農場は、母牛・育成牛12頭規模であり、2017年より新規就農し周年放牧を実施している。当該子牛は2日齢オスで、2019年4月9日の分娩予定日に牽引で娩出されたものの起立できず、ストマックチューブで初乳製剤を給与された。翌朝、哺乳瓶でミルクを飲むも、4月11日朝に死亡が確認されたこ



図1 当該牛の外貌。

とから、原因究明のため病性鑑定を実施した。なお、死亡から剖検までの推定時間は約3時間であった。



図2 臀部～大腿部皮下の水腫と骨格筋の暗赤色化・水腫。

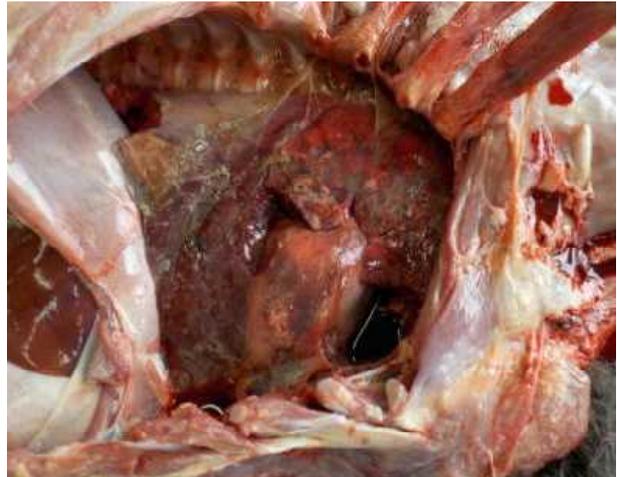


図3 胸水の貯留、線維素析出、肺と胸膜が癒着。

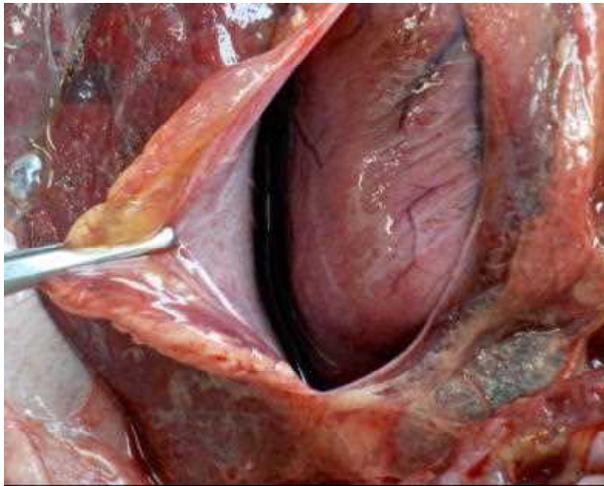


図4:心嚢水貯留

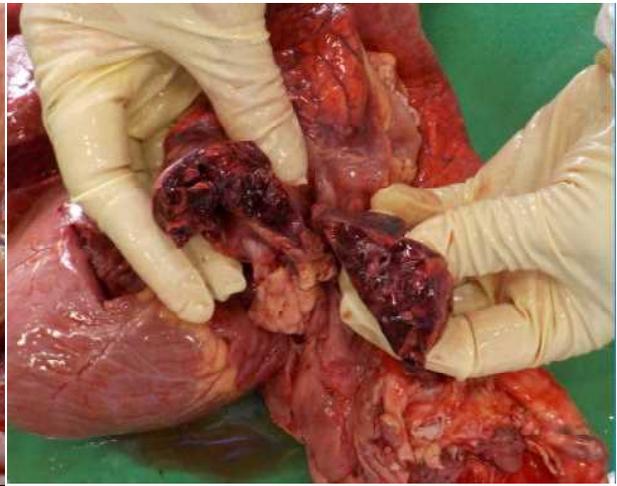


図5 肺の暗赤色化・水腫様。

【病性鑑定方法】

死亡子牛について剖検後、細菌学的検査、ウイルス学的検査及び免疫組織化学的染色を含む病理組織学的検索を定法に従い実施した。細菌学的検査は、肝・脾・腎・心・肺・脳を5%羊血液寒天培地（血寒）及びDHL寒天培地へスタンプ接種し炭酸ガス培養及び嫌気培養（血寒のみ）にて菌分離を試みた。また小腸内容からDHL寒天培地を用いて大腸菌群の定量培養も実施した。分離菌は市販同定キット（アピシリーズ、ピオメリユー社）を用いて同定を試み、詳細な遺伝子学的検索を実施

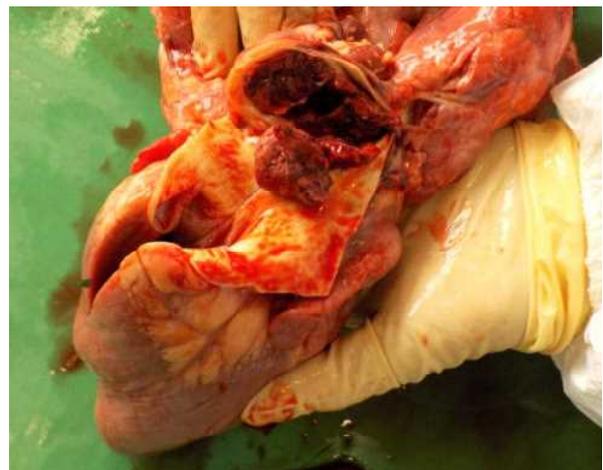


図6 大静脈に大型の血栓、右心の変形・心室拡張。

した。遺伝子学的検索は、分離された大腸菌について、抗血清（ISSC社）を用いたO型別判定及び毒素・付着因子などの病原性関連遺伝子のPCR法による検索[7][8][9][10][14][15][16][17][18]、multi-locus sequence typing (MLST) 解析を実施した。O型別判定及

びMLST解析は、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物研究部門 細菌・寄生虫領域ユニット長の楠本 正博上級研究員に依頼した。ウイルス学的検査は牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) の遺伝子検査を実施した。病理組織学的検査は、HE染色と抗*Escherichia coli* O22ウサギポリクロナル抗体を一次抗体として用いた免疫組織化学的染色(免染)を、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物研究部門 病態研究領域の芝原 友幸上級研究員に依頼した。

表1 細菌学的検査成績。菌分離検査結果。

	肺	心	腎	脾	肝	脳
<i>Escherichia coli</i>	○	○	-	-	-	-
<i>Bacillus circulans</i>	○	-	-	-	-	-

【病性鑑定成績】

剖検：大腿部～臀部～背部にかけて重度の皮下水腫、骨格筋の暗赤色化及び水腫(図1)、胸腔に赤色胸水の貯留及び線維素析出(図2)、肺と胸壁の癒着(図3)、肺の肝変化及び暗赤色化(図4)、心嚢水の貯留(図5)、大静脈における大型の血栓形成(図6)などがみられた。

表2 分離菌の遺伝子学的検査成績。ExPECでよくみられる病原因子。

株	毒素						付着						鉄取込能		
	ST	LT	stx1	stx2	catIII	cnf2	eae	afa8	papC	F5	F17	F41	iutA	fyuA	irp2
肺1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肺2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肺3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
心1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
心2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

細菌学的検査：肺及び心臓から*Escherichia coli*が有意に分離された(表1)。他に、肺より*Bacillus circulans*が有意に分離された。分離された*E. coli*のうち一部の株(肺由来1/3株、心臓由来1/2株)から、Stx遺伝子(*stx1*、*stx2*)が検出され、*stx1*、*stx2*のサブタイプは、それぞれ1c、2dであった。菌分離結果からExPECが疑われたが、ExPECに関連するとの多くの報告があり、過去に県内で分離されたExPEC株からも多く検出されている、鉄取込能因子遺伝子(*iutA*など)や非線毛性付着因子遺伝子

表3 分離菌の遺伝子学的検査成績。STECでよくみられる病原因子。

株	溶血		鉄	付着							抵抗性			
	hlyA	ehxA	ironN	int	iha	lpfA	saa	espP	eibG	toxB	ehaA	iss	clbA	clbQ
肺1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
肺2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肺3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
心1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

(*afa8*など)は検出されず(表2)、STECでの保有が報告されている鉄調節遺伝子A同族付着因子遺伝子(*iha*)や長極線毛遺伝子(*lpfA*)が検出された(表3)。

*stx*保有大腸菌2株の血清型はO22、*stx*を保有していない株(肺由来2株)は型別不能(0-genotyping PCRではOg9)であった(表4)。MLST解析の結果、*stx*を保有するO22株はST446・CC446、保有していない株はST540であった。

表4 分離菌の遺伝子学的検査成績。

株	<i>stx</i>	O型	MLST	
			ST	CC
肺1	<i>stx1</i> , <i>stx2</i>	O22	446	446
肺2	-	OUT(Og9)	540	-
肺3	-	OUT(Og9)	540	-
心1	<i>stx1</i> , <i>stx2</i>	O22	446	446

【結 語】

2日齢子牛で、STEC 022による肺への感染という稀な症例が発生した。本症例において分離された株は遺伝子学的に既知の株とは異なっており、*stx1c*、*stx2d*、*iha*、*lpfA*を保有することが確認された。

腸管外への感染が成立した要因としては、*iha*、*lpfA*といった因子が考えられ、この発現には宿主の鉄欠乏状態が関連する可能性がある。

子牛のStx産生性022によるExPEC様症例の発生頻度は不明だが、経済的損失防止のためにも、野外株の精査や、病原因子を標的としたワクチン開発などが必要である。

【参考文献】

- [1]林 哲也ほか. ゲノムから読み解くヒト病原微生物-6 病原性大腸菌. 化学と生物 42, 11, 2004
- [2]山崎 伸二ほか. 腸管出血性大腸菌感染症とVero (志賀) 毒素. 日獣会誌 67, 433-441, 2014
- [3]塚本 定三ほか. ヒトおよび動物由来の志賀毒素産生性大腸菌の血清型と毒素型. 感染症誌 76, 167-173, 2002
- [4]中澤 宗生ほか. 日本のウシ由来ベロ毒素産生性大腸菌の性状. 感染症誌 68, 11, 1437-1439, 1994
- [5]Yumi Akiyama et al. Comprehensive study of pathogenic genes distributed in *Escherichia coli* isolated from cattle. Food Hyg. Saf. Sci. 56, 3, 118-122, 2015
- [6]菅原 克ほか. 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
- [7]Vu-Khac H. et al. Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. Vet. J. 174: 176-187, 2007
- [8]Hideki Kobayashi et al. Prevalence and characteristics of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* from Healthy Cattle in Japan. Applied and Environmental Microbiology, 484-489, 2001
- [9]Rebecca A. Rashid et al. Expression of the *Escherichia coli* IrgA homologue adhesin is regulated by the ferric uptake regulation protein. Microb Pathog. 41, 6, 207-217, 2006
- [10]Flemming Scheutz et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing stx nomenclature. Journal of Clinical Microbiology 50, 9, 2951-2963, 2012
- [11]Martorelli L et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) 022:H8 isolated from cattle reduces *E. coli* 0157:H7 adherence in vitro and in vivo. Vet Microbiol. 208, 8-17, 2017

- [12] Yumi Akiyama et al. Shiga toxin subtypes and virulence genes in *Escherichia coli* isolated from cattle. *Jpn. J. Infect.* 70, 181-185, 2017
- [13] K. LEE et al. Nationwide investigation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among cattle in Japan revealed the risk factors and potentially virulent subgroups. *Epidemiol. Infect.* 145, 1557-1566, 2017
- [14] Yuluo Wu et al. Distribution of virulence genes related to adhesins and toxins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle and diarrheal patients in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science (J-STAGE Advance Published Date)* 26, 2010
- [15] Aine Monaghan et al. Serotypes and virulence profiles of Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from bovine farms. *Applied and environmental microbiology* 8662-8668, 2011
- [16] J. Osek. Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. *Journal of Applied Microbiology* 95, 1217-1225, 2003
- [17] Yan Lu, et al. A New immunoglobulin-binding protein, EibG, is responsible for the chain-like adhesion phenotype of locus of enterocyte effacement-negative, Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*. *Infection and immunity* 5747-5755, 74, 10, 2006
- [18] Radwa N. Morgan et al. Prevalence and pathologic effects of colibactin and cytotoxic necrotizing factor-1 (Cnf 1) in *Escherichia coli*: experimental and bioinformatics analyses. *Gut Pathog* 11, 22, 2019
- [19] 滝澤 亮ら. 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所並びに畜産関係業績発表会集録 2018
- [20] 久米 新一. 新生子牛と免疫 (特集 新生黒毛子牛の管理). *臨床獣医* 12月号 2019