

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

菅原 克^{1), 2)†} 松本裕一³⁾ 壁谷昌彦³⁾ 大西英高³⁾ 稲見健司⁴⁾
穂積愛美³⁾ 佐藤敦子³⁾ 井戸徳子⁵⁾

- 1) 福島県会津家畜保健衛生所 (〒965-0077 会津若松市高野町上高野字村前90)
- 2) 岩手県県北家畜保健衛生所 (〒028-6222 九戸郡軽米町山内23-9-1)
- 3) 福島県県中家畜保健衛生所 (〒963-8041 郡山市富田町字満水田2)
- 4) 福島県県北家畜保健衛生所 (〒960-8132 福島市東浜町5-18)
- 5) 岩手県中央家畜保健衛生所 (〒020-0173 岩手郡滝沢村滝沢砂込390-5)

(2011年10月17日受付・2012年5月15日受理)

要 約

6症例の子牛の腸管外病原性大腸菌 (Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC) 感染症について報告し、各症例の主要臓器から分離されたExPECについて、PCRによる病原関連遺伝子を検索した。臨床症状としては、起立不能、眼球白濁、呼吸器症状が認められ、病理組織学的所見では、カタル性気管支肺炎、肝臓の多発性巣状壊死、小葉中心性肝細胞壊死、化膿性髄膜炎、播種性血管内凝固が観察された。分離されたExPECは、毒素 (*cnf2*, *cdtIII*)、付着因子 (F17A, *afa-8*)、鉄取込能 (*iutA*, *fyuA*, *irp1*, *irp2*) に関与する遺伝子を保有していた。これらの遺伝子を保有する大腸菌は、子牛ExPEC感染症に関連する可能性がある。

——キーワード：付着因子、腸管外病原性大腸菌、necrotoxicogenic *Escherichia coli*、鉄取込能、毒素。

----- 日獣会誌 65, 689～693 (2012)

牛において、大腸菌症は、さまざまな病原因子を有する大腸菌の感染により引き起こされるが、それは大きく分けて腸管内で病原性を発揮する下痢原性大腸菌によるものと腸管外病原性大腸菌 (Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC) によるものに分類される。前者は、牛の大腸菌症の中で最も代表的なものであり、毒素原性大腸菌、腸管病原性大腸菌など発症に関与する病原因子についても詳細に報告されている [1, 2]。一方、後者が引き起こす感染症は、敗血症・髄膜炎など全身症状を伴うものとして定義されている [2]。子牛由来ExPECの保有する病原因子は、F17, CS31Aなどの付着因子や*cnf2*などの毒素を保有するとの報告があるが [3, 4]、国内においては、子牛ExPEC感染症やExPECの病原因子についての報告はない。

大腸菌は、健康な動物の腸管内細菌叢の一つを構成しており、特定の病原因子を有するものが下痢症やExPEC感染症の原因菌となることから、大腸菌感染症

に特有の大腸菌病原因子を特定することは、病原診断する上で重要である [1]。本研究の目的は、子牛の主要臓器から大腸菌が分離された6症例について、細菌学的検査及び病理学的検査を行い、その概要を報告するとともに、さまざまな動物由来ExPECや下痢原性大腸菌で報告がある病原関連遺伝子について、PCRにより検索し、国内分離子牛由来ExPECの病原遺伝子保有状況を明らかにすることである。

材料及び方法

供試動物：起立不能、眼球白濁などの臨床症状を示し、主要臓器から大腸菌が分離された2～23日齢の黒毛和種子牛6頭の症例について、細菌学的・病理学的検査をした (表1)。6頭は、それぞれ異なる繁殖農場にて飼育されており、臨床症状として、3症例で眼球白濁 (症例3, 5, 6)、4症例で起立不能 (症例1～4)、1症例で発咳等の呼吸器症状 (症例5) が確認された。また、症例

† 連絡責任者：菅原 克 (岩手県県北家畜保健衛生所)

〒028-6222 九戸郡軽米町山内23-9-1 ☎0195-49-3006 FAX 0195-49-3008 E-mail: masaru@pref.iwate.jp

表1 供試動物

症例	剖検時 日 齢	初乳	臨床症状		
			眼球白濁	起立不能	呼吸器症状
1	2	摂取	-	+	-
2	4	摂取	-	+	-
3	2	未摂取	+	+	-
4	2	摂取	-	+	-
5	23	摂取	+	-	+
6	8	未摂取	+	-	-

表2 PCRにより検索した遺伝子

病原因子	標的遺伝子
毒素	<i>cnf1</i> [5], <i>cnf2</i> [6], <i>cdtIII</i> [7], <i>col V</i> [8], STa [8], STb [8], LT [8], <i>stx1</i> [9], <i>stx2</i> [9]
付着因子	F5 [8], F41 [8], F17A [4], F17a-A [4], F17b-A [4], F17c-A [4], F17d-A [4], <i>eae</i> [9], <i>afa-7</i> [10], <i>afa-8</i> [10], CS31A [11]
鉄取込能	<i>iutA</i> [5], <i>fyuA</i> [12], <i>irp1</i> [12], <i>irp2</i> [12]
莢膜	<i>kpsMTII</i> [5], <i>kpsMTIII</i> [5]
侵入性	<i>ibeA</i> [5], <i>ipaH</i> [8]

3, 6は、初乳未摂取であった。剖検時生存していた事例は症例6のみであり、その他は、死亡確認後速やかに病性鑑定施設に搬入され、剖検された。

細菌学的検査：血液寒天培地及びマッコンキー寒天培地に肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、脳の新鮮断面をスタンプリ、37℃ 48時間、好気及び嫌気培養し、分析キット (API20E, bioMérieux, France) を用い同定した。複数臓器から大腸菌が分離された症例で臓器ごとに1株、症例5で肺から分離された4株を血清型別、病原関連遺伝子検索に用いた。大腸菌血清型別は、病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研(株), 東京) を用い、定法に従い実施した。大腸菌病原因子は、動物由来ExPECや下痢原性大腸菌で報告がある毒素、付着因子、鉄取込能、莢膜及び侵入性に関与する計28遺伝子についてPCRで検索した (表2)。PCRはサーマルサイクラー (TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient, タカラバイオ(株), 滋賀) を使用した。陰性対象は、大腸菌HB101株用い、それぞれの反応条件は既報 [4-12] に従った。なお、得られた増幅産物は、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により、標的産物を確認した。

病理組織学的検査：症例2以外の5症例について、全身諸臓器から採取した材料を20%中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施し、鏡検した。免疫組織

表3 大腸菌血清型別と臓器からの分離状況

症例	血清型別*	肝臓	脾臓	腎臓	心臓	肺	脳
1	O15:H-	+	+	+	+	+	+
2	OUT:H-	+	+	+	-	+	+
3	O15:H45	+	+	+	+	+	+
4	O119:H-	+	+	-	-	+	-
5	O55:H12	-	-	-	-	+	-
6	OUT:H-	+	+	+	-	+	-

*OUT：型別不能

化学的検査は症例3~5の肺について、ストレプトアビジン-ビオジン法で行った。一次抗体には、512倍希釈した病原大腸菌免疫血清 (O15, O55及びO119, デンカ生研(株), 東京), 2次抗体には組織検査用蛋白キット (ヒストファインシンプルステインMAX-PO®, (株)ニチレイバイオサイエンス, 東京), 発色はDAB基質キット (株)ニチレイバイオサイエンス, 東京) を用いた。なお、一次抗体の特異性については、健康な鶏の肝臓に大腸菌O15, O55, O119の培養液を注入し作製したそれぞれの陽性対照標本を用いて確認した。

分離株の毒素産生確認試験：各症例から分離された大腸菌1株、計6株を用い、Oswaldら [13] の方法に従い、培養細胞の毒性効果を確認した。

成 績

細菌分離検査成績：すべての症例で大腸菌が臓器から純培養的に分離され、症例5以外は、複数臓器から分離された (表3)。分離された複数の株は、症例ごとに同じ血清型を示し、症例1でO15:H-, 症例3でO15:H45, 症例4でO119:H-, 症例5でO55:H12と決定した。その他の3症例の分離株はO型別不能であり、運動性を有していなかった (表3)。

PCRによる病原関連遺伝子の検索では、症例ごとの株間で同じ病原関連遺伝子が検出され、毒素、付着因子、鉄取込能に関与する遺伝子が確認された。毒素遺伝子は、すべての症例の分離株で*cnf2*, *cdtIII* が検出された。付着因子では、F17Aが症例1~3, 6分離株で、*afa-8* が症例4~6分離株で確認された。鉄取込能に関連する遺伝子は、*iutA* が症例1~3, 5, 6分離株で、*fyuA*, *irp1*, *irp2* は、症例4分離株で確認された。F17A遺伝子陽性であった分離株について、F17A亜型遺伝子を検索した結果、症例3分離株で型別不能となり、症例1でF17c, 症例2でF17b, 症例6でF17b/cに型別された。なお、その他の病原関連遺伝子については増幅産物が確認されなかった (表4)。

病理組織学的検査：検査を実施した5症例のうち、病変が複数症例に認められた臓器は、肺、胸腺及び肝臓であった (表5)。肺では、症例3~5において、肺胞腔内

表4 各症例から分離された大腸菌の病原関連遺伝子保有状況

症例	毒素		付着因子		鉄取込能				その他*
	<i>cnf2</i>	<i>cdtIII</i>	F17A(亜型)	<i>afa-8</i>	<i>iutA</i>	<i>fyuA</i>	<i>irp1</i>	<i>irp2</i>	
1	+	+	+ (F17c)	+	+	-	-	-	-
2	+	+	+ (F17b)	-	+	-	-	-	-
3	+	+	+ (-)	-	+	-	-	-	-
4	+	+	-	+	-	+	+	+	-
5	+	+	-	+	+	-	-	-	-
6	+	+	+ (17b/c)	+	+	-	-	-	-

※毒素：*cnf1*, *colV*, STa, STb, LT, *stx1*, *stx2*
 膜：*kpsMT II*, *kpsMT III*

付着因子：F5, F41, *eae*, *afa-7*, CS31A
 侵襲性：*ibeA*, *ipaH*

表5 病理組織学的所見のまとめ

症例	大腸菌血清型 ^{※1}	脳		肺		胸腺	肝臓		腎臓
		化膿性髄膜炎	カタル性肺炎	大腸菌抗原(O抗原) ^{※2}	播種性血管内凝固	萎縮	多発性巣状壊死	中心性壊死	播種性血管内凝固
1	O15:H-	-	-	NT ^{※3}	+	NT	-	+	+
2	OUT:H-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
3	O15:H45	-	+	+ (O15)	-	+	-	-	-
4	O119:H-	-	+	+ (O119)	-	-	-	-	-
5	O55:H12	-	+	+ (O55)	-	+	+	-	-
6	OUT:H-	+	-	NT	-	+	-	+	-

※1 OUT: 型別不能

※2 免疫組織化学検査による

※3 NT: 検査せず

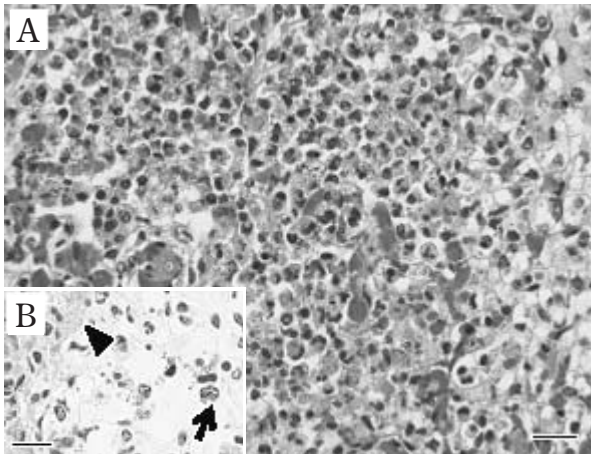


図 症例4の肺 (Bar = 10 μm).

A: 肺胞腔内に菌体及び好中球の浸潤が確認されたカタル性気管支肺炎。

B: 陽性反応が菌塊 (矢頭), 好中球の細胞質 (矢印) に認められる

に好中球, マクロファージの浸潤が確認されたカタル性気管支肺炎像を示した (図1A)。胸腺においては, 症例3, 5, 6でリンパ球減少に伴う胸腺萎縮が確認された。肝臓においては, 症例5で多発性巣状壊死, 症例1, 6で小葉中心性肝細胞壊死が認められた。その他では, 症例1で, 肺, 腎臓における播種性血管内凝固, 症例6で化膿性髄膜炎が確認された。免疫組織化学的検査では, 用いた抗血清に交差性はなく, 症例3, 4, 5から分離さ

れた大腸菌のO群血清型に特異的に反応することが確認され, 肺胞腔内の菌塊, 好中球, マクロファージやその周囲に陽性反応が確認された (表5, 図1B)。

分離株の毒素産生確認試験: 供試した6株すべてで, 培養細胞の多核化及び致死効果が確認された。

考 察

眼球白濁, 起立不能を呈していた症例1~4, 6の細菌検査では, 複数臓器から大腸菌のみが分離され, その他の菌はまったく分離されなかった。また, 分離株による血清型別, PCRによる病原関連遺伝子検索結果から, 症例ごとに単一の株が複数臓器から分離されたことが示唆された。また, 症例5では, 肺のみの分離であったが, 呼吸器症状を示しており, 分離された株はすべて同一血清型に属し, 肺の免疫組織学的検査においても病変に一致した陽性反応が認められた。以上の結果から, 今回検索した6症例は, 大腸菌感染により敗血症もしくは呼吸器症状を引き起こしたと考えられ, ExPEC感染症であると診断した。

分離株のPCRによる病原関連遺伝子の検索では, すべての株で, 毒素に関連する遺伝子である*cnf2*及び*cdtIII*を保有し, 付着因子 (F17A, *afa-8*), 鉄取込能 (*iutA*, *fyuA*, *irp1*, *irp2*) に関する遺伝子はそれぞれ一つ以上保有していた。子牛の下痢原性大腸菌として代表的な毒素原性大腸菌では, 毒素としてSTaやLT, 付着因子としてF5を保有するとされており [1], 本研究

の分離株の性状とは異なっていた。

検出された毒素関連遺伝子である *cnf2* は、Vero や HeLa などの培養細胞を多核化し、ウサギの皮膚を壊死させる作用があり [14]、この毒素を産生する大腸菌は necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) 2 と総称される。また、*cdtIII* は、細胞を膨化させて、最終的に致死させるという特性を持つ [7]。本研究の各症例から分離された大腸菌は、毒素確認試験での培養細胞の多核化及び致死効果が認められたことから、毒素産生能を有していることが確認された。Van Bostら [15] は、*cnf2*、*cdtIII* を保有する NTEC2 を用いた初乳給与制限子牛への感染実験では、敗血症を引き起こすことが確認されており、さらに、主要な病理組織所見の一つとして気管支肺炎像が認められたと報告した。症例においても、病理組織学的検査で肺病変が半数の症例に認められ、免疫組織化学的検査においても病変に一致した陽性反応が得られた。このことから、NTEC2 による子牛 ExPEC 感染症の特徴の一つとして、肺病変を形成する可能性があることが推察された。

付着因子に関する病原因子では、F17、*afa-8* のいずれか、もしくは両方の遺伝子を保有していた。細菌が宿主上皮細胞に付着、定着し、感染が成立することから、付着因子は重要な病原因子として認識されている。今回検出された F17A は F17a～d の 4 つの亜型に分類され [16]、これらの F17 線毛関連遺伝子群を保有する大腸菌は、牛や羊などの反芻獣の感染症のみならず、人の尿路感染症においても分離が報告されている [4, 17]。Bertin ら [4] によると、子牛敗血症もしくは下痢症由来 NTEC2 で PCR による F17 関連遺伝子を検索した結果、F17b が最も多く、次いで F17c であったことを報告した。また、PCR による牛由来 NTEC2 の F17 関連遺伝子を検索した報告では、F17b 及び F17c の 2 つの亜型が検出された株や F17A 遺伝子の陽性であっても、亜型の型別不能であった株が多く分離されている [17]。よって、本研究で検出された F17 亜型は、過去に報告されている牛由来 NTEC2 と一致する結果であった。

検出されたもう一つの付着因子である *afa-8* は、F17 と異なり、非線毛性の付着因子である。Afa 関連遺伝子はさまざまな亜型が存在し、牛における *afa-8* 保有大腸菌は下痢症や敗血症由来から分離され、これらの疾病への関与が指摘されている [18]。

鉄取込能に関与する遺伝子の検索では、4 つの異なる遺伝子が確認された。鉄は細菌が増殖するために必要不可欠な元素であり、宿主組織内に侵入した細菌は宿主内に存在する結合鉄から鉄を奪い取ることが必要である [19]。本研究で最も多く確認された *iutA* は aerobactin の受容体を構成する遺伝子である。Aerobactin は、ExPEC の一つである鶏病原性大腸菌で最も多く認めら

れる鉄取込能であり [20]、阻害作用がある血清アルブミン存在下でも効率的に鉄を獲得することができる [21]。*fyuA*、*irp1* 及び *irp2* は、*Yersinia* 属に規定されている High-pathogenicity-island と呼ばれる *yersinia-bactin* に関連する遺伝子であり、これを保有する大腸菌は、ExPEC での報告が多く、病原性との関連性が指摘されている [12]。

以上のことから、*cnf2*、*cdtIII* の 2 つの毒素産生能を持ち、F17A もしくは *afa-8* による付着因子と鉄取込能を保有する大腸菌は、子牛 ExPEC 感染症に関連する可能性が考えられた。細菌が宿主細胞に定着、付着することは、感染が成立する第一要因である。この付着因子により上皮細胞に定着、増殖した大腸菌は、血流に侵入し、鉄取込能により宿主から鉄を奪うことにより、宿主内で増殖し、敗血症に至ると思われる。血行性により宿主体内に広がった大腸菌は、各臓器にたどり着き、毒素により肺、肝臓などの組織に何らかの損傷をあたえるものと推察された。本研究で検索した症例は少ないため、今後、検出された各病原関連遺伝子や子牛 ExPEC 感染症について、さらなる研究・検討が必要であると考えられた。

稿を終えるにあたり、菌株分与に御協力いただいた山形県中央家畜保健衛生所 木口陽介先生、長野県松本家畜保健衛生所 中島博美先生に深謝する。

引用文献

- [1] 中沢宗生：大腸菌症，牛病学，清水高正他編，第2版，304-307，近代出版，東京（1988）
- [2] Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL : Pathogenic *Escherichia coli*, Nat Rev Microbiol, 2, 123-140 (2004)
- [3] Bertin Y, Girardeau JP, Darfeuille-Michaud A, Contrepois M : Characterization of 20K fimbria, a new adhesin of septicemic and diarrhea-associated *Escherichia coli* strains, that belongs to a family of adhesins with N-acetyl-D-glucosamine recognition, Infect Immun, 64, 332-342 (1996)
- [4] Bertin Y, Martin C, Oswald E, Girardeau JP : Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR, J Clin Microbiol, 34, 2921-2928 (1996)
- [5] Johnson JR, Stell AL : Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny, and host compromise, J Infect Dis, 181, 261-272 (2000)
- [6] Van Bost S, Bâbe MH, Jacquemin E, Mainil J : Characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and 1970, Vet Microbiol, 82, 311-320 (2001)
- [7] da Silva AS, da Silva Leite D : Investigation of putative CDT gene in *Escherichia coli* isolates from pigs with diarrhea, Vet Microbiol, 89, 195-199 (2002)

- [8] Chapman TA, Wu XY, Barchia I, Bettelheim KA, Driesen S, Trott D, Wilson M, Chin JJ : Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine, *Appl Environ Microbiol*, 72, 4782-4795 (2006)
- [9] Paton AW, Paton JC : Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157, *J Clin Microbiol* 36, 598-602 (1998)
- [10] Le Bouguéne C, Lalioui L, du Merle L, Jouve M, Courcoux P, Bouzari S, Selvarangan R, Nowicki BJ, Germani Y, Andremont A, Gounon P, Garcia MI : 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, *J Clin Microbiol*, 39, 1738-1745 (2001)
- [11] Bertin Y, Martin C, Girardeau JP, Pohl P, Contrepoint M : Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF1-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea, *FEMS Microbiol Lett*, 162, 235-239 (1998)
- [12] Karch H, Schubert S, Zhang D, Zhang W, Schmidt H, Olschläger T, Hacker J : A genomic island, termed high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages, *Infect Immun*, 67, 5994-6001 (1999)
- [13] Oswald E, De Rycke J, Guillot JF, Boivin R : Cytotoxic effect of multinucleation in HeLa cell cultures associated with the presence of Vir plasmid in *Escherichia coli* strains, *FEMS Microbiol Lett*, 49, 95-99 (1989)
- [14] De Rycke J, Gonzales EA, Blanco J, Oswald E, Blanco M, Boivin R : Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*, *J Clin Microbiol*, 28, 694-699 (1990)
- [15] Van Bost S, Roels S, Mainil J : Necrotoxicogenic *Escherichia coli* type-2 invade and cause diarrhoea during experimental infection in colostrum-restricted newborn calves, *Vet Microbiol*, 81, 315-329 (2001)
- [16] Le Bouguéne C, Bertin Y : AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals, *Vet Res*, 30, 317-342 (1999)
- [17] Mainil JG, Gérardin J, Jacquemin E : Identification of the F17 fimbrial subunit- and adhesin-encoding (f17A and f17G) gene variants in necrotoxicogenic *Escherichia coli* from cattle, pigs and humans. *Vet Microbiol*, 73, 327-335 (2000)
- [18] Lalioui L, Jouve M, Gounon P, Le Bouguéne C : Molecular cloning and characterization of the afa-7 and afa-8 gene clusters encoding afimbrial adhesins in *Escherichia coli* strains associated with diarrhea or septicemia in calves, *Infect Immun*, 67, 5048-5059 (1999)
- [19] Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA : Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*, *Exp Mol Pathol*, 85, 11-19 (2008)
- [20] Dho-Moulin M, Fairbrother JM : Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), *Vet Res*, 30, 299-316 (1999)
- [21] Konopka K, Neilands JB : Effect of serum albumin on siderophore-mediated utilization of transferrin iron, *Biochemistry*, 23, 2122-2127 (1984)

Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Infection in Calves and PCR Detection of the Virulence-Associated Genes of the Isolates

Masaru SUGAWARA^{*†}, Yuichi MATSUMOTO, Masahiko KABEYA, Hidetaka ONISHI, Kenji INAMI, Manami HOZUMI, Atsuko SATO and Noriko IDO

^{*} *Fukushima Prefecture Aizu Livestock Hygiene Service Center, 90 Muramae, Kamikoya, Koyamachi, Aizuwakamatsu, 965-0077, Japan*

SUMMARY

In this study, we assessed six cases of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) infection in Japanese black calves and used PCR analysis to detect the virulence-associated genes of the ExPEC isolates obtained from the internal organs of each calf. The clinical signs in the calves included anastasia, opacity eyes, and respiratory disorder. Histological analysis confirmed the presence of bronchopneumonia, multifocal necrosis, and centrilobular necrosis in the liver, purulent meningitis, and disseminated intravascular coagulation. The virulence-associated genes of the ExPEC isolates encoded toxins (*cnf2* and *cdtIII*), adhesins (F17A and *afa8*), and siderophores (*iutA*, *fyuA*, *irp1*, and *irp2*). These results indicated that the virulence-associated genes of these *E. coli* strains may cause ExPEC infection in calves.

— Key words : adhesin, extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, necrotoxicogenic *Escherichia coli*, siderophore, toxin.

† *Correspondence to : Masaru SUGAWARA (Iwate Prefecture Northern Regional Livestock Hygiene Service Center) 23-9-1 Sannai, Karumai-machi, Kunohe-gun, 028-6222, Japan*
 TEL 0195-49-3006 FAX 0195-49-3008 E-mail : masaru@pref.iwate.jp

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 65, 689 ~ 693 (2012)