

短 報

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水谷恵子[†] 山本香織 井田正己

鳥取県食肉衛生検査所 (〒689-3203 西伯郡大山町小竹1291-7)

(2017年4月7日受付・2017年11月10日受理)

要 約

敗血症を呈した牛から大腸菌 O119:H28 が分離され、腸管外病原性大腸菌 (Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC) 感染症と診断した。検査結果から、泌尿生殖器感染症が全身へ波及したと考えられた。薬剤感受性は、TC, SM, KM 及び Su に耐性を示した。分離された大腸菌株は病原性関連遺伝子として、付着因子 (*afa-8*)、鉄取込能 (*iutA*, *irp1* 及び *irp2*) 及び毒素 (*cnf2*, *cdtIII* 及び *stx1*) を保有していた。これらの遺伝子産物が複合的に作用し、重度の出血を引き起こしたと推測された。また、*stx1* を保有しており、強い病原性が示唆された。

——キーワード：腸管外病原性大腸菌, *stx1*, 病原性関連遺伝子.

-----日獣会誌 71, 307~310 (2018)

大腸菌症は下痢原性大腸菌によるものと、尿路感染症、髄膜炎や敗血症などを引き起こす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 [1]。ExPEC は特殊な接着因子、鉄捕捉因子や毒素などの病原因子を保有するとの報告がある [2, 3]。鶏に全身性感染を引き起こす家禽病原性大腸菌 (Avian pathogenic *E. coli*: APEC) が ExPEC の範疇に入り、APEC により引き起こされる大腸菌症による経済的被害は大きい [4]。しかし、家畜における ExPEC による大腸菌症は、下痢原性大腸菌によるものと比べると発生が少なく [5]、病原性について不明な部分が多い。今回敗血症を呈し ExPEC 感染症と推察された牛に遭遇し、病原性関連遺伝子の検索を行ったので報告する。

材料及び方法

症例：39 カ月齢の雌の黒毛和種。平成 24 年 8 月に起立不能及び食欲不振を主訴とし、腰痠の診断名で管内と畜場に搬入された。と畜検査において、解体後検査結果に基づき、以下の検査を実施した。

血液検査：表 1 に示す血液一般検査及び血液生化学検査を実施した。

病理組織検査：心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膀胱、子宮、膀胱、第 1 胃、第 2 胃、第 3 胃、第 4 胃、小腸、結腸、盲腸及び直腸について、定法に従い 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、パラフィン切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を実施し鏡検した。

微生物検査：心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膀胱、子宮及び膀胱の新鮮断面を羊血液寒天培地にスタンプし、37°C、48 時間、好気及び嫌気培養を行い、菌分離を行った。子宮及び膀胱から分離された菌について分析キット (API20E, bioMérieux, France) を用いて同定し、病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研株, 東京) を用いて血清型別試験を実施した。また、薬剤感受性試験は Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) 法に準拠した Kirby-Bauer 法 (K-B 法) により、薬剤感受性キット (センシディスク, 日本ベクトン・ディッキンソン株, 東京) を用いて実施した。供試薬剤は、アンピシリン (ABPC 10µg), セフトキシム (CTX 30µg), セフトリアキソン (CTRX 30µg), セフトジジム (CAZ 30µg), セフボドキシム (CPDX 10µg), イミベネム (IPM 10µg), コリスチン (CL 10µg), ストレプトマイシン (SM 10µg), カナマイシン (KM 30µg), アミカシン (AMK

[†] 連絡責任者(現所属)：水谷恵子 (一社生物科学安全研究所)

〒252-0132 相模原市緑区橋本台 3-7-11

☎ 042-762-2775 FAX 042-762-7979

E-mail : k_mizutani@riasbt.or.jp

表1 血液一般検査及び血液生化学検査結果

血液一般検査			
WBC	154 × 10 ² /μl	HCT	22.4 %
RBC	441 × 10 ⁴ /μl	PLT	39.9 × 10 ⁴ /μl
HGB	8.9 g/dl		
血液生化学検査			
GOT	191 IU/l	TP	5.9 g/dl
GGT	24 IU/l	ALB	2.8 g/dl
BIL	1.0 mg/dl	A/G	0.9
CHOL	160 mg/dl	Ca	13.3 mg/dl
GLU	<20 mg/dl	P	16.6 mg/dl
BUN	24 mg/dl	CPK	>2000 IU/l
CRE	1.8 mg/dl		

表2 検索した病原性関連遺伝子

病原因子	病原性関連遺伝子
付着因子	<i>fanC</i> , F41, F17A, F17a-A, F17b-A, F17c-A, F17d-A, <i>eaeA</i> , <i>afa-7</i> , <i>afa-8</i> , <i>clpG</i>
鉄取込能	<i>iutA</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp1</i> , <i>irp2</i>
毒素	<i>cnf1</i> , <i>cnf2</i> , <i>cdtIII</i> , <i>cvaC</i> , <i>estI</i> , <i>estII</i> , <i>eltA</i> , <i>stx1</i> , <i>stx2</i>
莢膜	<i>kpsMTII</i> , <i>kpsMTIII</i>
侵入性	<i>ibeA</i> , <i>ipah</i>

30μg), テトラサイクリン (TC 30μg), ナリジクス酸 (NA 30μg), オフロキサシン (OFLX 5μg), スルフィソキサゾール (Su 250μg), アズトレオナム (AZT 30 μg), クロラムフェニコール (CP 30μg), ホスホマイシン (FOM 50μg) 及びスルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST 23.75/1.25μg) の18種類を用いた。病原性関連遺伝子については、下痢原性大腸菌及び腸管外病原性大腸菌において報告がある表2に示す28の遺伝子について、既報 [3] に従いPCR法により検索を実施した。志賀毒素関連遺伝子が検出されたものは、ベロ毒素 (志賀毒素) 検出用イムノクロマトキット (NH イムノクロマト VT1/2, 日本ハム(株), 大阪) を用いて、毒素産生性の有無を確認した。

成 績

解体後検査及び行政処分：体幹脂肪組織、腸間膜、大網、脾臓、腎臓周囲脂肪組織、子宮及び膀胱に出血が認められた。また腎炎及び心筋炎が認められた。と畜場法施行規則、第16条、別表第5の「炎症」が全身に及んでいると診断し、全部廃棄処分とした。

血液検査 (表1)：血液一般検査において、WBCの上昇、RBC及びHCTの低下が認められた。血液生化学検査において、GOT、Cholesterol、BUN、Ca、P及びCPKの上昇、Glucose、TP及びAlbuminの低下が認められた。

表3 分離された大腸菌の血清型、耐性を示した薬剤及び保有した病原性関連遺伝子

血清型	耐性を示した薬剤	病原性関連遺伝子*		
		付着因子	鉄取込能	毒素
O119:H28	TC, SM, KM, Su	<i>afa-8</i>	<i>iutA</i> , <i>irp1</i> , <i>irp2</i>	<i>cnf2</i> , <i>cdtIII</i> , <i>stx1</i>

* 検出されなかった病原性関連遺伝子：

付着因子 (*fanC*, F41, F17A, F17a-A, F17b-A, F17c-A, F17d-A, *eaeA*, *afa-7*, *clpG*), 鉄取込能 (*fyuA*), 毒素 (*cnf1*, *cvaC*, *estI*, *estII*, *eltA*, *stx2*), 莢膜 (*kpsMTII*, *kpsMTIII*) 及び侵入性 (*ibeA*, *ipah*)

病理組織検査：心臓は心筋内に軽度の出血及び炎症性細胞浸潤が、肺は間質に炎症性細胞浸潤が、脾臓は間質に出血及び炎症性細胞浸潤が、腎臓は間質に炎症性細胞浸潤が認められた。また脾臓の被膜下に出血及び炎症性細胞浸潤が、子宮内膜及び筋層に高度の出血及び炎症性細胞浸潤が、膀胱の粘膜固有層及び粘膜下組織に高度の出血及び炎症性細胞浸潤が認められた。第1胃粘膜下組織に炎症性細胞浸潤が、第4胃粘膜固有層及び粘膜下組織に炎症性細胞浸潤が、盲腸粘膜固有層に出血及び炎症性細胞浸潤が認められた。

微生物検査：心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膀胱、子宮及び膀胱から多数の通性嫌気性グラム陰性桿菌を検出し、敗血症と診断された。子宮と膀胱から分離された菌については大腸菌と同定され、血清型はO119:H28であった。また、本分離株はTC, SM, KM及びSuに耐性を示した (表3)。病原性関連遺伝子検索については、付着因子に関連する *afa-8*、鉄取込能に係る *iutA*, *irp1* 及び *irp2* 並びに毒素に関連する *cnf2*, *cdtIII* 及び *stx1* が検出された。さらに、ベロ毒素 (志賀毒素) 検出用イムノクロマトキットにより、VT1 (Stx1) 産生性であることを確認した。

考 察

本症例は全身性の出血性炎症を示す敗血症を呈し、血液検査所見からも細菌感染が疑われ、子宮及び膀胱から大腸菌 O119:H28 が検出されたため、ExPEC 感染症と考えられた。感染経路については、子宮及び膀胱において高度の炎症が認められたこと、間質性腎炎が認められたことから、泌尿生殖器を介し全身へ波及したものと考えられた。

薬剤感受性については、本分離株はTC, SM, KM及びSuに耐性を示し、過去の志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*: STEC) の報告と同様の傾向であった [6]。

病原性関連遺伝子の検索では、本分離株は付着因子に関連する *afa-8*、鉄取込能に係る *iutA*, *irp1* 及び *irp2* 並びに毒素に関連する *cnf2*, *cdtIII* 及び *stx1* を保

有していた。*afa-8*は、非線毛性の付着因子であり、人の尿路感染症における感染成立への関与 [7] や、牛の下痢症や敗血症との関与 [8] が指摘されている。病原菌は増殖のために必要な鉄を宿主の体液から捕捉する必要があり、APECにおいて*iutA*及び*irp2*などの鉄捕捉に関連する遺伝子を複数保有しているとの報告がある [4]。*cnf2*は細胞壊死因子、*cdtIII*は細胞膨化致死毒に関連する遺伝子であり、敗血症の牛から分離された Necrotoxigenic *E. coli* type2 において*cnf2*と同時に*cdtIII*や*afa-8*を保有していたとの報告がある [9]。付着因子 (F17A, *afa-8*)、鉄取込能 (*iutA*, *fyuA*, *irp1*, *irp2*) 及び毒素 (*cnf2*, *cdtIII*) に関与する遺伝子を保有している大腸菌は子牛 ExPEC 感染症に関連する可能性があるとの報告 [3] や、全身諸臓器に重度の出血が認められた子牛から分離された大腸菌株は F17A, *iutA*, *cnf2* 及び *cdtIII* を保有していたという報告がある [10]。これら既報と同様に、本分離株は複数の病原性関連遺伝子を保有しており、遺伝子産物が複合的に作用し重度の出血を引き起こしたと推測された。

血清型と病原性関連遺伝子の関係については、菅ら [3] の報告にある血清型 O119 の ExPEC 症例と本症例を比較すると、起立不能が認められ、*afa-8*, *irp1*, *irp2*, *cnf2* 及び *cdtIII* を保有していた点が共通していた。また、大腸菌による敗血症を呈した新生子牛について血清型及び病原性関連因子を調査した報告 [11] では、血清型が O119 で付着因子として CS31A を保有する場合、高い死亡率と関連し、鉄取込能に関係する病原性関連因子を多くの株が保有していた。本分離株は F17, CS31A 及びインチミンをコードする遺伝子を持たないが、*afa-8* を付着因子に関係する病原性関連遺伝子として、*iutA*, *irp1* 及び *irp2* を鉄取込能に関係する病原性関連遺伝子として保有する O119 であるため重篤化した可能性が考えられた。

一方、本分離株は Stx1 を産生することから STEC でもある。Stx は牛の腸管型大腸菌症のうち、子牛の赤痢及び大腸菌性腸管毒血症の病原因子とされ、新生子牛は感染防御機構が未成熟であるため Stx が病原性を示すと考えられている [12]。本症例は病態の悪化により感染防御機構が低下していたことが考えられ、さらに本分離株は *stx1* を保有し、Stx1 産生性が確認されたことから強い病原性が示唆され、Stx1 が病態を憎悪させた可能性が考えられた。また、下痢を呈した牛から分離した STEC について、*eaeA* 陰性の株を幼若ウサギに経口感染させた場合、腸病変は不在であったが腸管内定着像は観察され、インチミン以外の付着因子の関与が疑われたという報告 [13] があり、本分離菌株は *eaeA* を保有していないが *afa-8* を保有しており、この遺伝子産物が付着に関与した可能性がある。

敗血症及び腸炎を呈した子牛について病原性関連遺伝子を調べた報告 [14] では、腸炎を呈した子牛において *stx* を持つ 2 株が *afa-8* 及び *iutA* を保有しており、STEC の病原性関連遺伝子である *stx* と ExPEC の病原性関連遺伝子を同時に保有していた。本分離株も STEC の特徴を併せ持った ExPEC であると考えられた。

今後も ExPEC 感染症の症例報告を重ね、病態の解明に寄与したい。

引用文献

- [1] Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL : Pathogenic *Escherichia coli*, Nat Rev Microbiol, 2, 123-140 (2004)
- [2] 坂崎利一 : *Escherichia* 属, 腸内細菌 (下巻), 第 3 版, 75-106, 近代出版, 東京 (1992)
- [3] 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)
- [4] 秋庭正人 : 腸管外病原性大腸菌感染症としての鶏大腸菌症, 医学のあゆみ, 235, 345-350, 医歯薬出版, 東京 (2010)
- [5] 中澤宗生 : 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)
- [6] 亀山光博, 矢端順子, 野村恭晴, 富永 潔, 富田正章 : 山口県内で飼養される子牛の口腔内における志賀毒素産生性大腸菌の保有状況, 日獣会誌, 67, 73-78 (2014)
- [7] 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)
- [8] 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)
- [9] Van Bost S, Bâbe MH, Jacquemin E, Mainil J : Characteristics of necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and 1970, Vet Microbiol, 82, 311-320 (2001)
- [10] 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, 日獣会誌, 69, 524-528 (2016)
- [11] Fecteau G, Fairbrother JM, Higgins R, Van Metre DC, Paré J, Smith BP, Holmberg CA, Jang S : Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from the blood of bacteremic neonatal calves, Vet Microbiol, 78, 241-249 (2001)
- [12] 中澤宗生 : 牛の大腸菌症と大腸菌性下痢ワクチン, 獣医畜産新報, 45, 679-687 (1992)
- [13] 中澤宗生, 伊藤健一郎 : ウシ由来ベロ毒素産生性大腸菌の幼若ウサギ感染実験, 感染症学雑誌, 69, 772-776

- (1995) operon: evidence of similarities between isolates from humans and animals with extraintestinal infections, *J Clin Microbiol*, 41, 218-226 (2003)
- [14] Girardeau JP, Lalioui L, Said AM, De Champs C, Le Bouguéne C : Extended virulence genotype of pathogenic *Escherichia coli* isolates carrying the *afa-8*

Detection of Virulence Genes in *Escherichia coli* Isolated from a Japanese Black Cow with Septicemia

Keiko MIZUTANI[†], Kaori YAMAMOTO and Masami IDA

*Meat Inspection Center, Tottori Prefecture, 1291-7 Kodake, Daisen-cho, Saihaku-gun, 689-3203, Japan

SUMMARY

We isolated *Escherichia coli* O119:H28 from a Japanese black cow with septicemia diagnosed with an extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) infection. The genitourinary infection was considered to have spread systemically. The isolate was resistant to tetracycline, streptomycin, kanamycin, and sulfonamides. It included the following virulence-associated genes: adhesion (*afa-8*), siderophore (*iutA*, *irp1*, and *irp2*), and toxin (*cnf2*, *cdtIII*, and *stx1*). The results indicate that these virulence-associated genes may have interacted and their gene products may have caused a severe systemic hemorrhage. Furthermore, the isolate carrying *stx1* implies that it may be highly virulent.

— Key words : Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, *stx1*, virulence-associated genes.

[†] Correspondence to (Present address) : Keiko MIZUTANI (Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology)

3-7-11 Hashimotodai, Midori-ku, Sagami-hara, 252-0132, Japan

TEL 042-762-2775 FAX 042-762-7979 E-mail : k_mizutani@riasbt.or.jp

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 71, 307~310 (2018)