

黒毛和種子牛で発生した基質特異性拡張型βラクタマーゼ(ESBL)産生大腸菌の腸管外感染事例

仙台家畜保健衛生所
後藤庸、山梨祐未

I. はじめに

基質特異性拡張型βラクタマーゼ(Extended Spectrum Beta-Lactamases; 以下ESBL)産生大腸菌は、薬剤耐性菌の一種で、第三世代セファロスポリンに対する耐性を示す。動物由来のESBLは、人由来と同様にCTX-M型が主体であり、その流行が懸念されている[7]。農場の病畜由来から分離された大腸菌は、第三世代セファロスポリンに対する耐性率が低いものの、その存在が確認されており、ESBL産生が疑われている[4]。

病原性大腸菌は、腸管出血性大腸菌や腸管毒素原性大腸菌など、特定の病原因子を持ち、腸管内で病原性を有するものと、特定の病原因子及び付着因子が明らかではないが腸管外で病原性を有するもの、いわゆる腸管外病原性大腸菌(ExPEC)の2つに大別される。人におけるExPECは尿路感染症や新生児の髄膜炎などの起因菌として知られているが、牛では新生子牛の髄膜炎や敗血症が報告されているものの[2]、感染経路については未解明な点が多い。

今回、新生子牛の病性鑑定において、ESBL産生ExPECによる化膿性腎盂腎炎と診断されたので、その概要を報告する。また、当該牛におけるExPECの感染経路についても検討した。

II. 材料及び方法

症例は、繁殖牛80頭、肥育牛120頭を飼育する繁殖肥育一貫経営農場で発生した。当該牛は、黒毛和種の雌で、2023年3月9日に正常分娩で出生した。3日齢で39.9°Cの発熱と水様性下痢を呈し、セファゾリンによる3日間の治療が行われたが、症状

は改善しなかった。その後、キノロン系に変更し加療するも、当該牛の状態は改善せず、8日齢で死亡した。

1. 細菌学的検査: 肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、大脳、延髄、脊髄及び腸管内容を5%羊血液寒天培地(島津ダイアグノティクス(株)、東京)DHL寒天培地(栄研化学(株)、東京)及び5%卵黄加変法GAM寒天培地(島津ダイアグノティクス(株)、東京)を用いて、37°C、48時間、好気及び嫌気培養した。分離されたコロニーの同定は、大腸菌特異的PCR[1]を用いた。分離された大腸菌各2株についてO-genotyping PCR[1]及びO89免疫血清(STatens Serum InSTitut, Denmark)による凝集試験を実施した。

病原性関連遺伝子の検索は、下痢病原性大腸菌や動物由来ExPECで報告されている毒素、付着因子及び鉄取込能に関する計21遺伝子について実施した。

薬剤感受性試験は肝臓、脾臓、腎臓、大脳、脊髄及び腸管内容由来各1株について、アンピシリン、セファゾリン、セフォタキシム、カナマイシン、ゲンタマイシン、エリスロマイシン、テトラサイクリン、ナリジクス酸、シプロフロキサシン、クロラムフェニコール及びST合剤の計11薬剤のディスク拡散法(Becton, Dickinson and Company, USA)を実施した。

ESBL産生の確認はAmpC/ESBL鑑別ディスク(関東化学(株)、東京)を用い、シカジーニアス®ESBL遺伝子型検出キット2(関東化学(株)、東京)により、ESBLの遺伝子型、CTX-M group各種

CTX-M chimera、GES、TEM及びSHVの計9種類について実施した。

CTX-M groupは脳及び腸管内容由来の計2株について次世代シーケンサー（PacBio、USA）による全ゲノム解析を実施し、得られた配列結果をCenter for Genomic Epidemiology でCTX-M型のESBL遺伝子型を決定した。

パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）は臓器及び腸管内容由来の計6株を試験に供試し、PFGEパターン分類はTenoverら [6] の基準に従った。

Multilocus sequence typing（MLST）解析は、臓器及び腸管内容由来の計6株について、大腸菌のSequence type（ST）を決定した。

2.病理学的検査: 剖検、主要臓器及び腸管を10%中性緩衝ホルマリン固定、パラフィン包埋並びに薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色、リンタングステン酸・ヘマトキシリン染色（PTAH）及び免疫組織化学的染色（IHC）を施して鏡検した。IHCは一次抗体に大腸菌O89抗血清（STatus Serum InSTitut, Denmark）を用い、肝臓、腎臓、側頭葉及び延髄について実施した。

3.ウイルス学的検査: 主要臓器及び腸管内容についてアカバネウイルス、アインウイルス、ブルータングウイルス、イバラキウイルス、チュウザンウイルス、A群・B群・C群ロタウイルス、牛コロナウイルス、牛トロウイルス及び牛ウイルス性下痢ウイルスについて遺伝子検査を実施した。また、アカバネウイルスについて中和試験も実施した。

4.生化学的検査: EDTA加血液、血清、眼房水及び肝臓を各試験に供した。試験項目は、血球計数、血液塗抹、血液生化学、血清蛋白分画、脂溶性ビタミン濃度及びセレン濃度の測定をした。

III. 結果

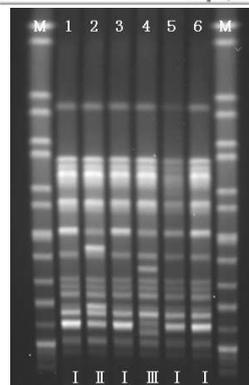
1.細菌学的検査: 肝臓、脾臓、腎臓、脳及び脊髄から大腸菌O89が分離された。腸管内容から大腸菌O89が 10^9 個/g以上分離された。病原性大腸菌の遺伝子検索は表1に示す。薬剤感受性試験では、全株に共通し、11薬剤に耐性を確認した。

ESBL産生を全株で認め、遺伝子型はCTX-M9 groupであった。全ゲノム解析の結果、CTX-M14と同定した。CTX-M14遺伝子は脳由来株では、46kbのIncNプラスミドに、腸管内容由来株では、59kbのIncN及びIncY両方を保有するプラスミド上に認めた。また、キノロン耐性決定領域における点変異も認められ、GyrAに2か所（83番目のセリンがロイシン、87番目のアスパラギン酸がアスパラギン）及びParCに1か所（80番目のセリンがイソロイシン）の変異であった。

PFGEパターンはバンドの相違が3本以内でパターンIからIIIに識別された（図1）。また、MLST解析は全株ST10に型別された。

表 1 病原性大腸菌の遺伝子検索

		臓器	腸管内容
下痢原性	毒素	-	-
	<i>Stx1/2</i>	-	-
	<i>LTA</i>	-	-
	<i>Stx/b</i>	-	-
	<i>eae</i>	-	-
付着因子	-	-	
<i>F4/5/6/1</i>	-	-	
<i>8/41</i>	-	-	
EPEC	毒素	+	+
	<i>cnf2</i>	+	+
	<i>cdt III</i>	+	+
	<i>afa8</i>	+	+
	付着因子	-	-
<i>papC</i>	-	-	
<i>F17</i>	-	-	
<i>iutA</i>	+	+	
鉄取込能	+	+	
<i>fyuA</i>	+	+	
<i>irp1/2</i>	+	+	



1:肝臓、2:脾臓、3:腎臓、
4:脳、5:延髄、
6:腸管、M: マーカー

図 1 大腸菌血清型O89株のPFGE泳動像

2.病理学的検査: 当該牛の肛門付近に泥状便の附着を認めた。剖検では、両側腎臓の髄質に充うっ血（図2A）、肺に全体的にモザイク状の充うっ血及び胸腺の低形成を認めた。組織所見は、肝臓実質に凝固壊死巣の散発を認めた。腎臓は尿細管上皮細胞の変性、腎乳頭における集合管に好中球の浸潤（図2B）を認めた。PTAH染色では、左側腎臓の腎乳頭における集合管内に線維素の析出（図2C）を認めた。大腸菌O89抗血清を用いたIHCでは、肝臓実質に孤立性に陽性像が散見され、また、中型血管にもまれに少数の陽性像を認めた。腎臓では、腎乳頭集合管における上皮細胞内に、まれに複数の陽性像を認めた（図2D）。延髄では、腹正中裂近傍の小型血管にて、ごくまれに陽性像を認めた。

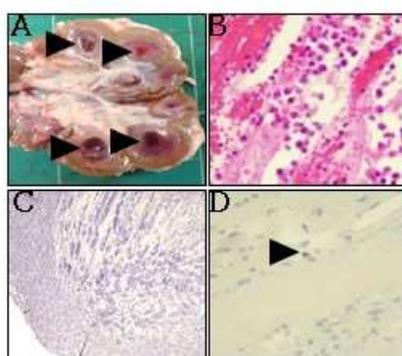


図 2-A：腎臓髄質の充うっ血(矢頭)
 図 2-B：腎乳頭集合管への好中球の浸潤
 図 2-C：腎乳頭集合管の繊維素の析出
 図 2-D：腎乳頭集合管上皮細胞内の大腸菌 O89陽性像(矢頭)

3.ウイルス学的検査: 腸管内容からコロナウイルスの遺伝子が検出された。その他の遺伝子は検出されなかった。また、アカバネウイルスの抗体は陰性であった。

4.生化学的検査: 血球計数は白血球数の増加を認めた。血液生化学検査は眼房水でBUN及びCreの上昇を認め、血清のA/G比の高値を確認した。血清蛋白分画は γ -Glb分画の低下を認めた。脂

溶性ビタミン濃度及びセレン濃度はビタミンAの低値及び β カロテンの低値並びにセレンの低値を認めた。

IV.考察

死亡子牛から大腸菌O89が分離され、11薬剤に耐性の多剤耐性であった。病理学的検査では、化膿性線維索性腎盂腎炎を認め、腎臓のIHCではO89抗原を認めた。以上から、本症例を大腸菌O89によるExPEC感染症と診断した。

分離された大腸菌は第三世代セファロスポリン系のセフォタキシムに耐性を示し、ESBL産生株であり、ESBL遺伝子型は*bla* CTX-M14であった。国内の家畜におけるESBL産生大腸菌の最初の報告は、Shirakiらが2002年にと畜場へ出荷した牛から分離したCTX-M2型で、その後、豚及び肉用鶏からCTX-M14、CTX-M15、CTX-M44及びCTX-M55等が検出されている[4]。家畜にはCTX-M型ESBLを保有する大腸菌が分布しており、当該牛から分離された大腸菌も同様の結果であった。

ESBL遺伝子はIncプラスミドで細菌間を安定的に伝達される。分離した大腸菌でも、IncN及びIncYの両方にESBL遺伝子が座位しており、菌種を超えて伝播する可能性が示唆された。近年、CTX-M型ESBL産生大腸菌の中にはフルオロキノロン耐性も獲得している株が報告され[3]、人医療で問題となっている。当該分離株も、キノロン耐性変異の特定箇所である、GyrAの83番目のセリン及び87番目のアスパラギン酸並びにParCの80番目のセリンの点変異が認められた。GyrAとParCの2重変異はキノロンに高度耐性を示すことが知られていることから、当該菌のフルオロキノロン耐性への影響が示唆された。

牛のExPEC感染症の感染経路は、臍帯から侵入し敗血症となり、全身症状を呈することが知られているが[2] 当該牛は、臍帯炎はなく、臍帯周囲

の外貌も正常であった。今回、臓器由来と腸管内容由来のPFGEパターンが3本以内の相違であり、Tenoverら [6] の基準に従うと、これらは遺伝的に極めて近い株と考えられた。また、セファゾリン及びフルオロキノロンの治療により、腸管内で原因菌であったESBL産生ExPECが有意に増加し、糞便とともに肛門周囲に付着し、会陰部にコロニーが形成され、上行性に腎臓に感染したと推察した。また、腎臓におけるIHCでは、膀胱側に位置する腎乳頭における集合管上皮細胞内に陽性像を確認し、この感染経路を示唆する結果であった。

原因菌はMLSTでST10に型別された。Mangesは人由来ExPECのMLSTでは、ST10、12、38、69、73、95、117、127、131、394、405及び1193が多く分離されることを報告している [8]。今回、牛からST10のExPECが分離されたことは、人と牛の間で同じ型が共有されている可能性が示唆され、公衆衛生上のリスクがあると考えられた。

子牛の下痢の原因は感染性及び非感染性と多様であり、本当に抗菌剤が必要な症例か、再検討する必要があると思われた。今後も抗菌剤の慎重使用の徹底を継続指導していく。

V. 謝辞

本症例のPFGE、MLST解析及び全ゲノム解析を実施していただいた、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の玉村雪乃先生に深謝いたします。

VI. 引用文献

- [1] Atsushi I, Sunao I, Kazuko S, Tomoko M I, Flemming S, Makoto O (2015), *Escherichia coli* O-Genotyping PCR: a Comprehensive and Practical Platform for Molecular O Serogrouping, *J Clin Microbiol*, 2427-2432
- [2] 井上恭彰、矢口弘美、平松美裕子、和田好洋 (2022), 臍帯炎を伴った新生子牛の腸管外病原性大腸菌による化膿性髄膜炎, *日獣会誌*, e51-55
- [3] 佐藤豊孝 (2021), 治療上重要となる抗菌薬耐性に関する細菌学的解析, *日本細菌学雑誌*, 161-174
- [4] 白川崇大 (2017), 一動物用抗菌性物質を取り巻く現状 (XIII) —動物用抗菌剤の各論(その2)セファロスポリン系抗生物質, *日獣会誌*, 562-565
- [5] Shiraki Y, Shibata N, Doi Y, Arakawa Y (2004), *Escherichia coli* producing CTX-M-2 β -lactamase in cattle, Japan. *Emerg Infect Dis*, 69-75
- [6] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995), Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing, *J Clin Microbiol*, 2233-2239
- [7] 原田和記、浅井鉄夫 (2015), 動物に由来するCTX-M型基質拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌, *日本化学療法学会雑誌*, 181-186
- [8] Manges (2015), *Escherichia coli* and urinary tract infection: The role of poultry-meat, *Clinical Microbiology and Infection*, 122-129