

# 2016年から2024年に分離された牛由来腸管外病原性大腸菌の性状解析と多剤耐性株の確認

仙台家畜保健衛生所  
後藤庸、山梨祐未

## 1 はじめに

腸管外病原性大腸菌(ExPEC)は腸管外感染を起こす大腸菌の総称で、その中には、尿路病原性大腸菌、新生児髄膜炎大腸菌、敗血症大腸菌及び鶏病原性大腸菌が含まれる<sup>8)</sup>。ヒトから分離されたExPECのO群血清型別の割合はO25が最も高く、次にO2、O6及びO1で半分を占める<sup>1)</sup>。一方で、牛では多様な血清型の症例が報告され、ヒトの症例にみられる血清型の偏りは報告がない。また、子牛に感染するExPECに関連する病原因子として、毒素(*cnf2*、*cdt III*)、付着因子(F17A、*afa-8*)及び鉄取込能(*iutA*、*fyuA*、*irp1*、*irp2*)が報告されている<sup>7)</sup>。病畜由来の大腸菌に関する薬剤耐性状況は、動物医薬品検査所における薬剤耐性菌のモニタリングによると、近年、第3世代セファロスポリン及びフルオロキノロン系薬剤への耐性率が上昇傾向であり公衆衛生上の問題として注目されている。

今回、2016年から2024年に当所で病性鑑定を行ったExPECが関連した8症例の比較及びその分離株10株の性状解析及び薬剤感受性試験を行い、牛のExPEC感染症の特徴について若干の知見を得たので報告する。

## 2 材料と方法

性状解析には、腸管外から分離した大腸菌10株を試験に供した。O群血清型別はOg-typing、病原因子の検索は毒素(*cnf2*、*cdt III*)、付着因子(F17A、*afa-8*、*papC*)及び鉄取込能(*iutA*、*fyuA*、*irp1*、*irp2*)をPCR法で行った。系統発生群解析はClermontらのPCR

法で行い<sup>6)</sup>、全ゲノム解析はPacbioによるシーケンシングを行った。薬剤感受性試験は、アンピシリン、セファゾリン、セフトキシム、ゲンタマイシン、カナマイシン、テトラサイクリン、ナリジクス酸、シプロフロキサシン、エンロフロキサシン、クロラムフェニコール、ST合剤について一濃度ディスク法を行った。基質特異性拡張型βラクタマーゼ(ESBL)産生試験はダブルディスク法で行い、ESBL遺伝子の検索は*blaCTX-group*、*blaSHV*、*blaGES*及び*blaTEM*についてPCR法で行った。

## 3 結果

### (1) 症例比較

症例は全て黒毛和種の子牛で、雌雄各4頭、日齢は2日齢から67日齢で中央値は9.5日であった。転帰は死亡が6症例、発熱が4症例、下痢が3症例であった。症状があった個体は神経症状が3症例、突然死が2症例であった。子牛の初乳摂取の状況は6症例が少量以下であった(表1)。

病理学的検査成績の比較では、胸腺の剖検所見で低形成や萎縮を呈していたものは6症例であった。組織所見は、好中球の浸潤が全症例、化膿性炎症が6症例、血栓形成が7症例、血管壊死が4症例で見られた。疾患名では髄膜炎が2症例、腎炎が3症例であった(表2)。

### (2) 病原因子の保有状況

病原因子の保有状況は、*cnf2*を4株、*cdt III*を5株、F17Aを4株、*afa-8*を4株、*papC*を2株、*iutA*を8株及び*fyuA*、*irp1*及び*irp2*を各

5 株保有していた (表 3)。

表 1 ExPEC 関連症例の発生病況

症例	年	品種	性別	日齢	転帰	発熱	下痢	症状	初乳摂取
1	2016	JB	オス	13	死亡	有	無	神経症状	少量
2	2019	JB	オス	10	死亡	有	有	神経症状	なし
3	2019	JB	オス	4	死亡	無	無	なし	なし
4	2019	JB	メス	2	生	無	無	なし	なし
5	2020	JB	オス	67	生	無	無	腹部腫脹	正常
6	2023	JB	メス	4	死亡	無	無	突然死	少量
7	2023	JB	メス	9	死亡	有	有	突然死	少量
8	2024	JB	メス	26	死亡	有	有	神経症状	正常
					中央値	死亡割合	発熱	下痢	なし~少量
					9.5日	75%	4症例	3症例	75%

表 2 ExPEC 関連症例の病理学的所見の比較

症例	剖検所見			組織所見			疾患名	
	胸腺異常	好中球浸潤	化膿性炎症	血栓形成	血管壊死	髄膜炎	腎炎	
1	+	+	+	+	+	+	-	
2	+	+	+	+	+	+	+	
3	+	+	+	+	-	-	-	
4	-	+	-	-	-	-	-	
5	NT	+	+	+	+	NT	+	
6	+	+	+	+	-	-	-	
7	+	+	+	+	+	-	+	
8	+	+	-	+	-	-	-	
計(例)	6	8	6	7	4	2	3	

表 3 分離株の ExPEC 関連病原因子の遺伝子保有状況

菌株	毒素因子		付着因子			鉄取込能			
	<i>cnf2</i>	<i>cdtIII</i>	F17A	<i>afa-8</i>	<i>papC</i>	<i>iutA</i>	<i>fyuA</i>	<i>irp1</i>	<i>irp2</i>
01	+	+	+	-	-	+	+	+	+
02	-	-	-	+	-	+	-	-	-
03	-	+	+	-	-	+	+	+	+
04	-	-	-	-	-	+	+	+	+
05	+	+	+	+	-	+	-	-	-
06	+	+	-	-	-	+	-	-	-
07	-	-	-	-	+	-	-	-	-
08	-	-	+	-	-	-	-	-	-
09	+	+	-	+	-	+	+	+	+
10	-	-	-	+	+	+	+	+	+
計(株)	4	5	4	4	2	8	5	5	5

(3) O 群血清型別及び系統発生群解析

O 群血清型別は O<sub>g</sub>9 が 2 株、O<sub>g</sub>37、O<sub>g</sub>78、O<sub>g</sub>89、O<sub>g</sub>103)、O<sub>g</sub>109、O<sub>g</sub>150 及び O<sub>g</sub>GP9 が各 1 株及び型別不明の O<sub>g</sub>UT が 1 株であった。系統発生群型は A 系統が 9 株、D 系統が 1 株 (菌株 02) であった。

(4) 薬剤感受性試験及び ESBL の調査

菌株 No.7、9 及び 10 の 3 株は第 3 世代セファロスポリン及びフルオロキノロン系薬剤へ耐性を示す多剤耐性株であり (表 4)、その 3 株は *bla*CTX-M9group の ESBL を産生していた。

表 4 分離株の薬剤感受性試験結果

菌株	ペニシリン系		セフェム系		アミノグリコシド系		テトラサイクリン系		キノロン系		クロラムフェニコール系		ST合剤
	ABPC	CEZ	CTX	GM	KM	TC	NA	CPFX	ERFX	CP	STX		
01	R	S	S	S	S	R	S	S	+++	S	S		
02	R	S	S	S	S	R	S	S	+++	S	S		
03	S	S	S	S	S	R	S	S	+++	S	S		
04	S	S	S	S	S	S	S	S	+++	S	S		
05	S	S	S	S	S	S	S	S	+++	S	S		
06	S	S	S	S	S	R	S	S	+++	S	S		
07	R	R	R	S	R	R	R	R	-	R	S		
08	I	S	S	S	S	S	S	S	+++	S	S		
09	R	R	R	R	R	R	R	R	-	R	R		
10	R	R	R	R	R	R	R	R	-	R	R		

S:感受性 I:中間 R:耐性 +++:感受性

(5) 全ゲノム解析

全ゲノム解析に供した菌株 09 は 4 つのプラスミドを保有し、染色体上に *fyuA*、*irp1*、及び *irp2* が座位していた。プラスミド上に *cnf2*、*cdtIII*、*afa-8* 及び *iutA* が座位しており、別のプラスミド上に ESBL に関する *bla*CTX-M14 が座位していた。

4 考察

本県の黒毛和種子牛による ExPEC の感染個体の特徴として、若齢、初乳摂取量の不足、胸腺の低形成や萎縮が認められる傾向があり、これらは既報と同様であった<sup>3, 4, 7)</sup>。大塚は子牛の免疫の特徴として、免疫グロブリンを持たずに出生することや、好中球の走化能・付着能が成獣に比べて低く、T 細胞や B 細胞の活性が低い状態で出生することを報告している<sup>5)</sup>。また、胸腺は T 細胞の成熟の場であり獲得免疫に重要な器官である。以上のことから、ExPEC は免疫機能が未熟な子牛に感染しやすいと推察した。また、黒毛和種は他の品種に比べてリンパ球幼若化反応が劣っており、ホルスタイン種に比べ

て末梢血リンパ球数が少ないなど、免疫機能が低い可能性があり<sup>5)</sup>、そのことも ExPEC 感染個体が黒毛和種に多いことに関係したと思われた。

7 症例で血栓形成による血管病変を呈していた。血栓はいくつかの要因で形成されるが、その要因の1つに細菌感染による血管内皮細胞の傷害がある。ExPEC が保有する鉄取込能により血中で優位に増殖し産生する毒素が血管内皮を傷害する可能性が考えられ<sup>8)</sup>、このことが血管病変を高率に引き起こしたと推察した。

本調査では、ExPEC の病原因子の保有状況は多様であった。調査した 10 株で最も多くの株が保有していた *iutA* は細菌が増殖する上で重要となる鉄を獲得するのに役立つ因子であり、菅原らが調査した ExPEC においても保有している株が多かった<sup>7)</sup>。以上から、牛の ExPEC では鉄取込能として *iutA* が強く関与している可能性が考えられた。

髄膜炎を呈した子牛から分離された 2 株は *iutA* の他に *fyuA*、*irp1* 及び *irp2* を保有し、*cdtIII* 及び F17A も保有していたことから、これらの病原因子が相互に作用することで髄膜炎を引き起こす可能性が示唆された。

腎炎を呈した子牛から分離された 3 株は *iutA* 及び *cdtIII* を保有し、*afa-8* 及び *papC* のいずれかを保有していた。ヒトの分野において、この 2 つの付着因子は尿路病原性大腸菌における保有率が高いことが報告されており<sup>2)</sup>、牛の ExPEC 感染症でも同様であった。

0 群血清型別の分布は、偏りはなく多様でありヒトで多いとされる血清型も確認されなかった。系統発生群は A、B1、D 及び B2 系統からなり、ヒトの ExPEC は B2 系統が多いとされるが<sup>6)</sup>本調査の 10 株中 9 株が A 系統であった。A 系統の大腸菌は家畜の腸管内を含む自然環境に病原性は低いとされていることから<sup>6)</sup>、系統発生

群として牛の ExPEC の病原性の判断は困難であり、環境中に存在する多様な大腸菌が抵抗力の低下等の感染要因がそろった牛に ExPEC として感染していると思われた。

耐性菌の発現状況として 3 株が第三世代セファロスポリンやフルオロキノロン系薬剤へ耐性の多剤耐性株であり、全て *blaCTX-M9group* を保有する ESBL 産生株であった。*blaCTX-M9group* は国内の人医療分野において検出率が高い<sup>9)</sup>ことから公衆衛生上問題となり得る可能性が示唆された。近年、ヒトの分野において ESBL 産生大腸菌は他の大腸菌と比べてキノロン耐性決定領域の変異が多く、フルオロキノロン系への耐性が増加しているとの報告<sup>9)</sup>があり、当該 3 株についても同様の結果であった。

全ゲノム解析を実施した ExPEC はプラスミドを保有し、そのプラスミド上には *cnf2*、*cdtIII*、*afa-8* 及び *iutA* が座位しており、既報の通りであった<sup>2)</sup>。プラスミド上にあるこれらの病原因子は水平伝播により他の大腸菌に拡散し、非病原性株の病原性獲得に関与している可能性が考えられた。

本調査により、腸管内を含めた環境中に多く存在する A 系統の大腸菌が、その中でプラスミドによる水平伝播により ExPEC の病原因子を多様なバリエーションで獲得し、免疫が未熟な子牛に感染する感染経路が推察された (図 1)。

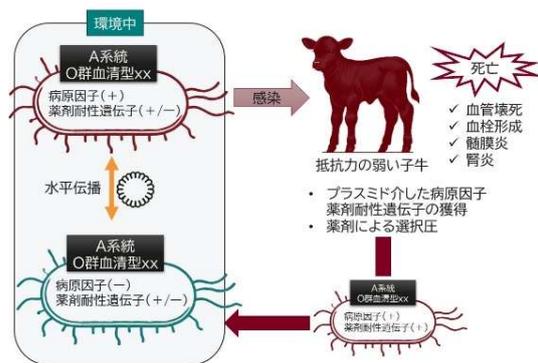


図1 ExPECの病原性の獲得と感染経路

## 5 謝辞

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。

## 6 参考文献

1) Eveline Weerdenburg, et al. (2023) Global Distribution of O Serotypes and Antibiotic Resistance in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Collected From the Blood of Patients With Bacteremia Across Multiple Surveillance Studies. *Clinical Infectious Diseases*® 2023 ; 76(3) : e1236-e43

2) Jolanta Sarowska 1 et al , (2019) Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports Sarowska et al. *Gut Pathog* 11:10

3) 浦川了ら、(2019) 腹膜炎と胸膜炎を併発した子牛の腸管外病原性大腸菌感染症を疑う2症例 長崎県家畜保健衛生業績発表会

4) 水上智秋、(2016) 子牛における腸管外病原性大腸菌 (ExPEC : 0121) による化膿性髄膜脳炎 農研機構家畜衛生研学会

5) 大塚浩通、(2008) 子牛の免疫の特徴と感染症 日本家畜臨床感染症研究会誌 3巻3号 111-118

6) OLIVIER CLERMONT et al (2000) Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 66 p4555-4558

7) 菅原くら、(2011) 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

8) Valerio M. Sora et al. (2021) Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. *Pathogens* 10, 1355

9) Yasufumi Matsumura et al (2017) Population structure of Japanese extra intestinal pathogenic *Escherichia coli* and its relationship with antimicrobial resistance *J Antimicrob Chemother* 1040-1049