

業績ノート

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

後藤 庸, 山梨 祐未

宮城県仙台家畜保健衛生所

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。

病原性大腸菌は、腸管内で病原性を有するものと、腸管外で病原性を有する腸管外病原性大腸菌 (ExPEC) の2つに大別される。牛のExPECは子牛の髄膜炎の起因菌として知られているが、人のExPECは尿路感染症の起因菌となっている。

今回、ESBL産生ExPECによる化膿性線維素性腎盂腎炎と診断した黒毛和種子牛の概要を報告する。

材料および方法

本症例は、繁殖牛80頭および肥育牛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。当該牛は、3日齢で39.9℃の発熱と水様性下痢を呈し、第一世代セファロスポリンによる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、治療薬をキノロン系に変更し加療するものの、状態は改善せず、起立困難となり8日齢で死亡した。

1 細菌学的検査

一般細菌検査は、主要臓器、大脳、延髄、脊髄及

び腸管内容を羊血液寒天培地、DHL寒天培地及び5%卵黄加変法GAM寒天培地を用いて、37℃、24~48時間、好気又は嫌気培養した。大腸菌血清型別はO-geno typing PCR及びO89免疫血清 (STatens Serum InSTITut, Denmark) の凝集試験を実施した。

大腸菌の病原性関連遺伝子である *ehx*, *eae*, *stx2*, *stx1*, *eltA*, *fasA*, *est II*, *faeG*, *fanC*, *est I*, *fedA*, *F41*, *cnf-2*, *afa*, *F17A*, *cdtB*, *fyuA*, *iutA*, *irp1*, *papC*, *irp2* は、PCR法によって検査した^{1,2)}。

大腸菌の薬剤感受性試験は、肝臓、脾臓、腎臓、大脳、脊髄及び腸管内容由来の株について、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薬剤をディスク拡散法で実施した。

ESBLについて、産生の確認はAmpC/ESBL鑑別ディスクで、遺伝子型別は、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) により実施した。CTX-M型のESBL遺伝子型は、大脳及び腸管内容由来の2株を用いて、全ゲノム解析を実施した。分子疫学解析は、臓器及び腸管内容由来の6株を用いて、制限酵素 *Xba I* によるパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 及びMultilocus sequence typing (MLST) 解析により実施した。

2 病理学的検査

病理学的検査は、剖検後、主要臓器及び腸管を10%中性緩衝ホルマリン固定し、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 (PTAH) 染色を施した。肝臓，腎臓，側頭葉及び延髄については，免疫組織化学 (IHC) 染色を一次抗体に大腸菌O89抗血清を用いて実施した。

3 ウイルス学的検査

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は，腸管内容物を検体として遺伝子検査を行った。

4 生化学的検査

血球測定はEDTA加血液を用い全自動血球計数機で実施した。血液生化学的検査は眼房水及び血清を用いドライケミストリーを実施した。血清蛋白分画はアガロースゲル電気泳動を実施した。脂溶性ビタミン濃度の測定は肝臓を用い，高速液体クロマトグラフィーを実施した。

結果

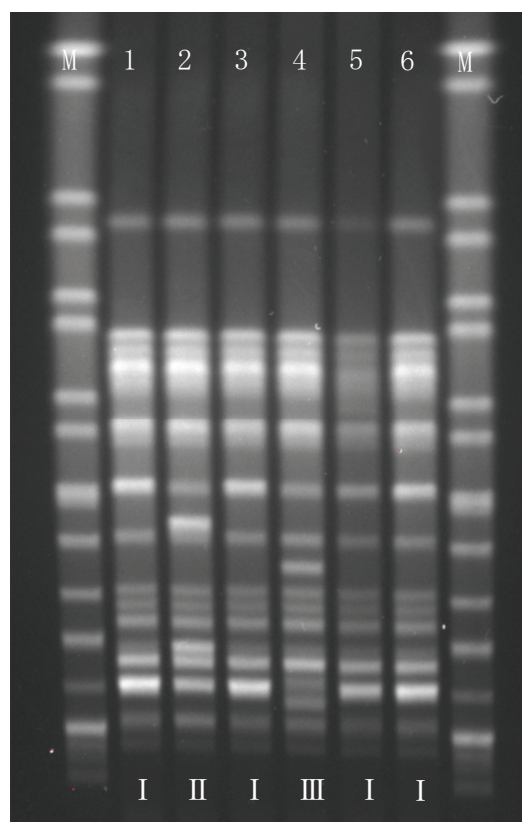
1 細菌学的検査

大腸菌O89が肝臓，脾臓，腎臓，大脳及び脊髄から分離された。また，腸管内容物から大腸菌O89が 1×10^9 個/g以上分離された。病原性大腸菌の遺伝子検索は下痢原性に関するものは非検出であった。ExPECに関する遺伝子は，毒素，付着因子及び鉄取込能が検出された (表1)。薬剤感受性試験は，全株で検査した11薬剤に耐性であった。

ESBLの産生は全株で認められ，ESBL遺伝子型はCTX-M14であった。CTX-M14遺伝子は大脳由来株では，46kbのIncNプラスミド上に，腸管内容物由来株では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，全ゲノム解析では，DNAジャイレース及びDNAトポイソメラーゼIVの変異が，GyrAには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は1か所 (80番目のセリンがイソロイシン) で認められた。PFGEパターンはIからIIIに識別された (図1)。また，MLST解析は全株がST10に型別された。

表1 病原性大腸菌の遺伝子検索

		臓器	腸管内容物	
下痢原性	毒素	Stx1/2	—	—
		LTA	—	—
		Stx/b	—	—
	付着因子	eae	—	—
		F4/5/6/18/41	—	—
EXPEC	毒素	cnf2	+	+
		cdtIII	+	+
		afa8	+	+
	付着因子	papC	—	—
		F17	—	—
	鉄取込能	iutA	+	+
		fyuA	+	+
	irp1/2	+	+	



M: マーカー 1: 肝臓 2: 脾臓 3: 腎臓 4: 大脳
5: 延髄 6: 腸管内容

図1 大腸菌O89株のPFGE泳動像

2 病理学的検査

外貌では、当該牛の肛門付近には泥状便の付着が認められた。剖検では、両側腎臓の髓質に充うっ血（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が確認された。組織所見では、肝臓実質に散発的な凝固壊死巣が確認された。腎臓では、尿管上皮細胞の変性及び腎乳頭における集合管への好中球の浸潤が認められた（図2B）。PTAH染色では、左側腎臓の腎乳頭集合管内に線維素の析出が確認された（図2C）。大腸菌O89のIHC染色では、肝臓実質に孤在性の陽性像が散見され、中型血管にもまれに少数の陽性像が確認された。腎臓では、腎乳頭集合管内の上皮細胞内にまれに複数の陽性像が認められた（図2D）。延髄では、腹正中裂近傍の小型血管にて、ごくまれに陽性像が確認された。

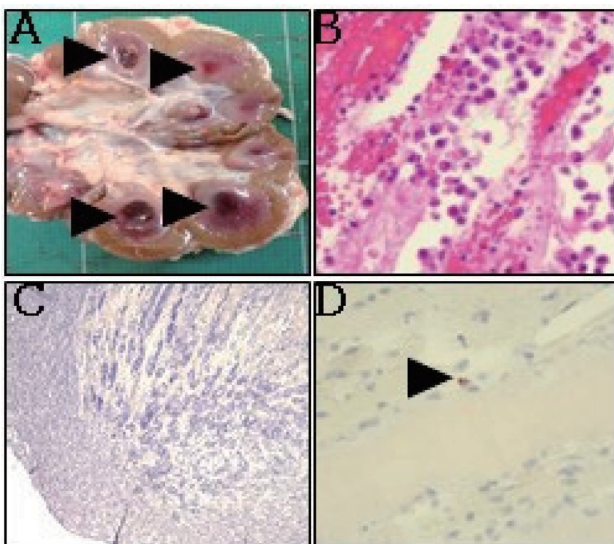


図2-A 腎臓髓質の充うっ血（矢頭）
 図2-B 腎乳頭集合管への好中球の浸潤
 図2-C 腎乳頭集合管の繊維素の析出
 図2-D 腎乳頭集合管上皮細胞内の大腸菌O89陽性像（矢頭）

3 ウイルス学的検査

遺伝子検査でコロナウイルス遺伝子が検出された。

4 生化学的検査

血球測定では白血球数の増加（22,300/μL）が認められた。血液生化学検査では、BUN及びCreの上昇及び血清のA/G比の高値を確認した。血清蛋白分画ではγ-Glb分画の低下を確認した。また、ビ

タミンA、βカロテン及びセレンの低値が認められた。

考 察

これらの検査結果から当該牛は、大腸菌O89による化膿性線維素性腎盂腎炎及び牛コロナウイルス病と診断した。また、分離されたExPECはESBLを保有していた。

国内の家畜におけるESBL産生大腸菌の初報告はと畜場に出荷された牛からCTX-M2型が分離された事例である³⁾。その後、豚及び肉用鶏からCTX-M14、CTX-M15、CTX-M44及びCTX-M55等の検出が報告されている。これらのことから、家畜にはCTX-M型ESBLを保有する大腸菌が広く分布していると考えられ、分離菌も同様の結果であった。

CTX-M型ESBL産生大腸菌の中にはフルオロキノロン耐性の株が報告されており⁴⁾、人医療で問題となっている。当該菌は、キノロン耐性に関与するキノロン耐性決定領域であるGyrA及びParCに二重変異が認められた。分離菌におけるフルオロキノロン耐性は、この変異によるものと考えられた。

臓器及び腸管内容物から分離された大腸菌は、PFGEでバンドの相違が3本以内で、Tenoverらの基準によると⁵⁾、これらの株が遺伝的に極めて近いものであった。また、腎臓におけるIHC染色では、膀胱側に位置する腎乳頭の集合管上皮細胞内に陽性像が確認された。これらのことから、当該牛へのExPECの感染は、セファゾリン及びフルオロキノロンの治療により、腸管内で耐性菌である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、尿道を介して上行性に腎臓へ感染したと推察された。

Mangesは人由来ExPECのMLSTにおいて、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⁶⁾。今回、牛からST10のExPECが分離されたことにより、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。

謝 辞

検査にご協力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。

引用文献

- 1) 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)
- 2) 菅原克ら, 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)
- 3) Shiraki Y, Shibata N, Doi Y, Arakawa Y: *Escherichia coli* producing CTX-M-2 β -lactamase in cattle, Japan. *Emerg Infect Dis* 10, 69-75 (2004)
- 4) 佐藤豊孝, 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, 76, 161-174 (2017)
- 5) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH Swaminathani B Interpreting chromosomal DNA reSTriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacteria STrain typing, *J Clin Microbiol*, 2233-2239 (1995)
- 6) Manges AR, *Escherichia coli* and urinary tract infection The role of poultry meat, *Clinical Microbiology and Infection*, 22, 122-129 (2015)

令和6年度畜産・家畜共済・公衆衛生講習会

日 時：令和7年1月31日(金) 14:15~15:15

場 所：宮城県庁舎1階101会議室（旧みやぎ広報室）
（仙台市青葉区本町三丁目8番1号）

演 題：動物検疫所の概要

講 師：動物検疫所北海道・東北支所仙台空港出張所
仙台空港出張所長 横山 理恵子 氏

* 本講習会は第69回宮城県家畜保健衛生業績発表会（9:30~16:30）の特別講演として開催致します。