

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

古田信道[†] 大貫 淳 小嶋 暢

山形県中央家畜保健衛生所 (〒 990-2161 山形市漆山 736)

(2016 年 2 月 15 日受付・2016 年 6 月 7 日受理)

要 約

山形県において発生した子牛の腸管外病原性大腸菌 (Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC) 感染症 2 症例の詳細と、感染及び発症機序解明のため実験的に ExPEC を培養細胞に接種し、細胞反応を観察したので報告する。2 症例に共通した所見として血様胸水の貯留、心、肺、大網及び腸管の出血、各症例については大脳、肝臓、腎臓及び脾臓の出血を認め、主要臓器から ExPEC を分離した。分離された ExPEC を Hep-2 細胞に接種したところ、ExPEC の細胞内侵入能と、感染細胞の脱落・細胞質縮小に代表される細胞死を確認した。以上より、今回の症例において、ExPEC は細胞内へ侵入することで細胞に対し傷害を与え、結果として出血等の組織傷害を引き起こした可能性が示唆された。——キーワード：細胞傷害、腸管外病原性大腸菌、細胞内侵入。

-----日獣会誌 69, 524~528 (2016)

大腸菌症は、特定の病原性因子を持つ大腸菌による感染症であり、牛においては ETEC (毒素原生大腸菌) や VTEC (ベロ毒素産生大腸菌) に代表されるおもに腸管内において病原性を発揮する下痢病原性大腸菌、そして腸管外において病原性を発揮する腸管外病原性大腸菌 (ExPEC) に大別される。ExPEC は人において髄膜炎・腎盂腎炎などを引き起こすとされているが [1, 2]、牛においては子牛の ExPEC 感染症の原因菌とされているものの、病原性については未解明な部分が多く残されている。近年、重篤な感染症を引き起こす病原性細菌の多くは細胞内に侵入し、病原性を発揮することが培養細胞を用いた研究により明らかにされている [3]。本研究の目的は ExPEC 感染症により死亡した子牛 2 症例の細菌学検査及び病理学的検査の概要を報告するとともに、培養細胞を用いた感染モデルの確立を検討し、発症メカニズムを明らかにすることである。

材料及び方法

供試動物：子牛の ExPEC 感染症による死亡と診断された 60 日齢及び 2 日齢の黒毛和種子牛 (表 1) について病理学的検査、また主要臓器から分離された ExPEC について細菌学的及び培養細胞を用いた検査を行った。

細胞培養：抗生物質添加 MEM 培地 (Eagle's MEM

培地①、日水製薬(株、東京)を用いて、Hep-2、MDCK、Vero の各細胞を 37℃、5%炭酸ガス下で静置培養を行った。

細菌学的検査：血液寒天培地及び DHL 寒天培地に脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓の新鮮断面をスタンプ、37℃ 24 時間、好気、CO₂ 及び嫌気培養し、分析キット (API20E, bioMérieux, France) を用い同定した。分離された大腸菌は臓器ごとに血清型別、病原関連遺伝子検索に用いた。大腸菌血清型別は、定法に従い実施した。大腸菌病原性因子については PCR により、動物由来 ExPEC や下痢病原性大腸菌で報告がある付着因子、毒素、鉄取込能、莢膜及び侵入性に関与する計 32 遺伝子 (表 2) を検索し反応条件は既報 [4] に従った。陰性コントロールは、健康牛糞便から分離された大腸菌 (健康畜糞便株) を用いた (PCR system 9700, Applied Biosystems, U.S.A.)。

病理組織検査：全身諸臓器から採取した材料を 20%

表 1 供試動物

症例	剖検時 日 齢	初 乳	臨床症状	その他
			起立不能	15 日以上 の過期産
1	60	摂 取	+	-
2	2	未摂取	-	+

[†] 連絡責任者：古田信道 (山形県中央家畜保健衛生所)

〒 990-2161 山形市漆山 736 ☎ 023-686-4410 FAX 023-686-5715 E-mail : furutan@pref.yamagata.jp

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>	<i>cnf2</i>	<i>cdtIII</i>	<i>colV</i>	<i>astA</i>	<i>hlyA</i>
	<i>STa</i>	<i>STb</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>LT</i>	
付着因子	<i>F5</i>	<i>F41</i>	<i>afa7</i>	<i>afa8</i>	<i>CS31A</i>	
	<i>papAH</i>	<i>papC</i>	<i>papEF</i>	<i>papG</i>	<i>sfas</i>	
鉄取込能	<i>focG</i>	<i>eae</i>	<i>F17A</i>	<i>F17G</i>		
	<i>fyuA</i>	<i>irp1</i>	<i>irp2</i>	<i>iutA</i>		
莢膜	<i>kpsMTII</i>	<i>kpsMTIII</i>				
侵入性	<i>ibeA</i>					

表3 大腸菌血清型別と臓器からの分離状況

症例	血清型	脳	心臓	肺	肝臓	腎臓	脾臓
1	O59	+	+	+	+	+	+
2	O88	+	-	+	+	+	+

表4 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		
	<i>cnf2</i>	<i>cdtIII</i>	<i>F17A</i>	<i>afa-8</i>	<i>iutA</i>	<i>fyuA</i>	<i>irp1</i>	<i>irp2</i>
1	+	+	+	-	+	-	-	-
2	+	+	+	-	+	-	-	-

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。

分離株の細胞内侵入能試験：2 症例から分離した大腸菌及び陰性コントロール (健康畜糞便株) を各細胞に接種し、コロニーを計測した。方法については既報 [5] に従い、本論文では概略のみ記す。はじめに、96 穴プレート内で抗生剤無添加 MEM 培地 (Eagle's MEM 培地③, 日本製薬(株), 東京) で培養した各細胞に 5×10^7 コロニーフォーメーションユニット (cfu)/穴になるように調整した菌を接種した。1 時間後、細胞外の菌を殺菌するため、抗生剤添加 MEM 培地に 40mg/l ゲンタマイシン (ゲンタシン注 40, MSD (株), 東京) を加えた培地で置換した。2 時間後、細胞を滅菌水を加え細胞を破碎した後、破碎液を DHL 寒天培地に播種し、37℃で 24 時間好気下培養し、コロニーを計測した。

分離株の細胞内傷害性試験：2 症例から分離した大腸菌及び陰性コントロール (健康畜糞便株) を各細胞に接種し、傷害性の有無を確認した [5]。はじめに、96 穴プレート内で抗生剤無添加 MEM 培地で培養した各細胞に各菌を接種した (5×10^7 cfu/穴)。1 時間後、細胞外の菌を殺菌するため、抗生剤添加 MEM 培地に 40mg/l ゲンタマイシンを加えた培地で置換した。菌の接種から 24 時間後に顕微鏡 (TH4-100, オリンパス(株),

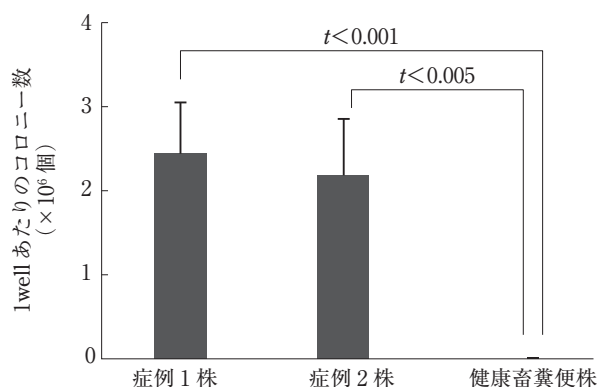


図1 Hep-2 細胞を用いた分離 ExPEC の細胞内侵入試験 症例 1, 2 株及び健康畜糞便株を接種した Hep-2 細胞破碎液から発育したコロニー数

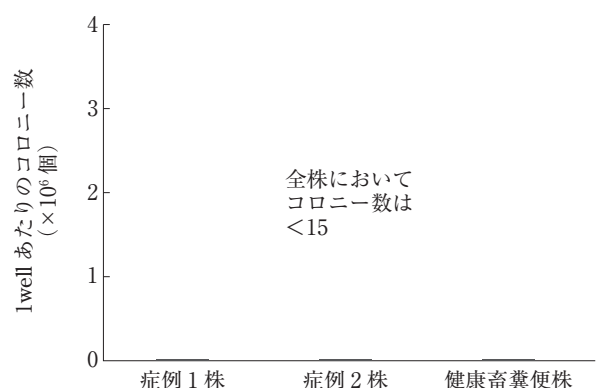


図2 MDCK 細胞を用いた分離 ExPEC の細胞内侵入試験 症例 1, 2 株及び健康畜糞便株を接種した MDCK 細胞破碎液から発育したコロニー数

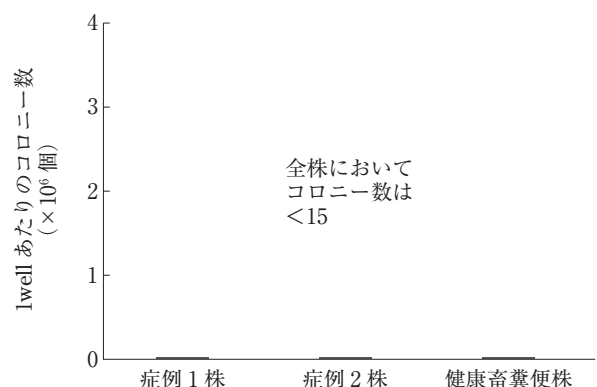


図3 Vero 細胞を用いた分離 ExPEC の細胞内侵入試験 症例 1, 2 株及び健康畜糞便株を接種した Vero 細胞破碎液から発育したコロニー数

東京) を用いて細胞を観察し、傷害性の有無を確認した。

成績

剖検所見及び病理組織学的検査：剖検所見として 2 症例ともに血様胸水の大量貯留、心臓、肺、大網及び盲結腸を主とした腸管の点状出血、その他症例 1 においては

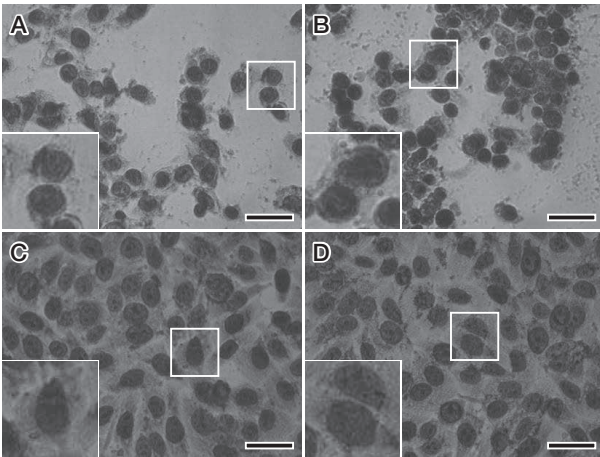


図4 Hep-2細胞を用いた分離 ExPEC の細胞傷害性試験
A: 症例1株接種 B: 症例2株接種
C: 健康畜糞便株接種 D: 未接種
(Bar=20μm)

症例1, 2株を接種した Hep-2細胞において細胞質の消失や細胞の脱落が観察された。一方で、健康畜糞便株では認められなかった。

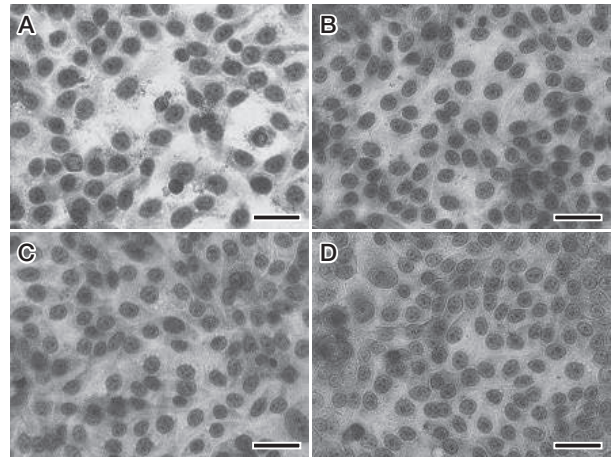


図5 MDCK細胞を用いた分離 ExPEC の細胞傷害性試験
A: 症例1株接種 B: 症例2株接種
C: 健康畜糞便株接種 D: 未接種
(Bar=20μm)

症例1, 2株を接種した MDCK細胞において、健康畜糞便株同様に細胞傷害は認められなかった。

胸部胸腺の出血、症例2では大脳皮質髄質の広範囲な点状出血と第2第3胃の出血を認めた。病理組織学的所見としては上記の剖検所見のほか、胸腺でリンパ濾胞低形成と空胞変性を、第4胃で粘膜上皮の壊死及び筋層の細菌塊、脾臓でリンパ濾胞低形成及び血管内に細菌塊を認めた。症例2では肝臓でグリソン鞘の出血、腎臓で出血、脾臓で出血とリンパ濾胞低形成、第3胃で粘膜上皮の出血、細胞浸潤及び多数の細菌塊をそれぞれ認めた。

細菌分離検査: 2症例ともに、複数臓器から純培養的に大腸菌が分離された(表3)。分離された大腸菌は、症例ごとに同じ血清型を示し、症例1で O59、症例2で O88と決定した。PCRによる、病原因子関連遺伝子の検索では、毒素として *cnf2* や *cdtIII* を、付着因子として *F17A* を、鉄取込能として *iutA* が検出された(表4)。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。

分離株の細胞内侵入能試験: 供試した2株を処理した Hep-2細胞においては、感染後の細胞破砕液を DHL 寒天培地で培養したところ、陰性コントロールと比較して有意数のコロニー形成が確認され、供試株の Hep-2細胞に対する侵入能を認めた(図1)。一方、供試2株を処理した MDCK細胞及び Vero細胞破砕液においてコロニーはほとんど確認されず(<15コロニー)、陰性コントロールと比較した際の有意差もなかった(図2, 3)。

分離株の細胞内傷害性試験: 供試した2株は Hep-2細胞に対し、細胞質の消失及び細胞の脱落を引き起こした(図4)。一方、MDCK(図5)及び Vero細胞(図6)に対しては、細胞変性効果をほとんど示さなかった。さらに、2株の培養上清を細胞に処理したところ、各細胞

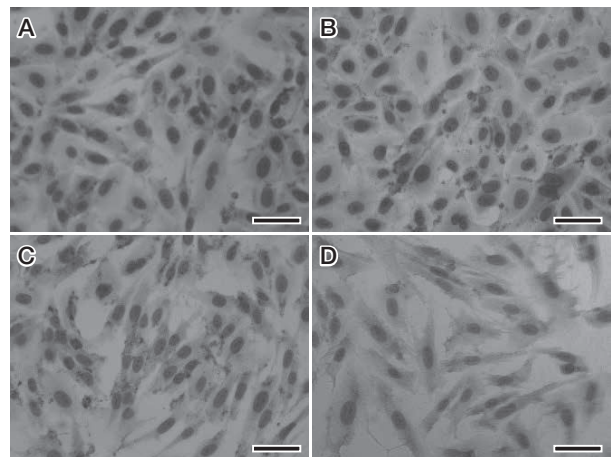


図6 Vero細胞を用いた分離 ExPEC の細胞傷害性試験
A: 症例1株接種 B: 症例2株接種
C: 健康畜糞便株接種 D: 未接種
(Bar=20μm)

症例1, 2株を接種した Vero細胞において、健康畜糞便株同様に細胞傷害は認められなかった。

において細胞変性効果はほとんど認められなかった(データ未掲載)。

考 察

細菌検査により、本2症例の複数の実質臓器から純培養的に分離された大腸菌は、血清型別から2症例とも単一な菌であることが示唆された。菅原ら[4]は、病原関連遺伝子検索結果から、毒素として *cnf2* 及び *cdtIII* を、付着因子として *F17A* もしくは *afa8* を、鉄取込能として *iutA*, *fyuA*, *irp1*, *irp2* のいずれかの産生

能を持つ大腸菌を子牛の ExPEC の原因菌として関連付けている。本 2 症例の分離菌においても、病原性遺伝子検索の結果 *cnf2*, *cdtIII*, *F17A*, *iutA* が検出され、子牛の下病原性大腸菌として代表的な毒素原性大腸菌の性状 [1] とは異なっていたことから、本 2 症例を子牛の ExPEC 感染症による死亡と診断した。また、症例 2 においては患畜母牛糞由来株と病原性因子・パルスフィールド電気泳動パターンともに同一であったことから、外因性感染が疑われた。人の腸管外病原性大腸菌である、尿路病原性大腸菌 (UPEC : Uropathogenic *E.coli*) は、膀胱炎や腎盂腎炎を引き起こす [6]。UPEC は細胞内へ侵入するとされているが、その細菌側因子は多種にわたる [7]。中でも、線毛は宿主細胞への付着と侵入をつかさどる重要因子であり、UPEC においても、*F17A* 遺伝子は報告されている [8]。宿主側の UPEC レセプターとしては laminin, fibronectin, type IV collagen, $\alpha3\beta3$ Integrin が示唆されており、中でも Integrin は UPEC が細胞に侵入する際に重要なレセプターを果たすとされている [9-12]。一方、*F17A* においては N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) レセプターとの結合が報告されている [13]。今回、分離された ExPEC を感染させた Hep-2 細胞の細胞破碎液を DHL 寒天培地に塗布したところ、コロニーの形成が認められたことにより、分離菌は Hep-2 細胞には侵入可能であることが示唆された。一方で、MDCK 細胞・Vero 細胞にはほぼ侵入不可能であることについては、Hep-2・MDCK・Vero 細胞間での GlcNAc レセプターを含めた ExPEC レセプター発現量の差を可能性の一つとして推察した。しかしながら本考察は推論の域を脱しておらず、他要因も含めた検討が必要と思われる。ExPEC の細胞内侵入が認められた Hep-2 細胞において細胞傷害性が確認され、細胞内侵入性がほとんど認められなかった MDCK や Vero 細胞においては傷害性がほぼ認められなかったことから、今回分離された ExPEC は細胞内に侵入後、傷害性を発揮することが示唆された。2 症例の剖検・組織学的検査の結果認められた全身諸臓器の重度の出血は、本症例においては ExPEC 感染に起因すると考えられる。個体に感染した ExPEC は管腔または血管を介して細胞内に侵入し、保有した病原性因子、特に *cnf2* や *cdtIII* 等の毒素を分泌、もしくは自身が増殖することで細胞に何らかの傷害を与え、結果として臓器組織傷害、本症例においては各臓器における重度の出血を引き起こした、と推察する。本研究の検索は 2 症例に限られているため、今後も各病原関連遺伝子、特に感染が成立する第 1 要因である宿主細胞への定着付着に関与する付着因子 *F17A* や *afa8* の機能

解析や、宿主側の ExPEC レセプターの同定、ExPEC の細胞内動態等、子牛 ExPEC 感染症の発症機序について、さらなる研究・検討が必要であると考えられる。

引用文献

- [1] 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)
- [2] Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL : Pathogenic *Escherichia coli*, Nat Rev Microbiol, 2, 123-140 (2004)
- [3] Pizarro-Cerdá J, Cossart P : Bacterial adhesion and entry into host cells, Cell, 24, 715-727 (2006)
- [4] 菅原 克, 松本裕一, 壁谷昌彦, 大西英高 : 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)
- [5] Nakagawa I, Inaba H, Yamamura T, Kato T, Kawai S, Ooshima T, Amano A : Invasion of epithelial cells and proteolysis of cellular focal adhesion components by distinct types of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae, Infect Immun, 74, 3773-3782 (2006)
- [6] Foxman B, Brown P : Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs, Infect Dis Clin North Am, 17, 227-241 (2003)
- [7] Bower JM, Eto DS, Mulvey MA : Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract, Traffic, 6, 18-31 (2005)
- [8] Mainil JG, Gérardin J, Jacquemin E : Identification of the F17 fimbrial subunit- and adhesin-encoding (*f17A* and *f17G*) gene variants in necrotogenic *Escherichia coli* from cattle, pigs and humans, Vet Microbiol, 73, 327-335 (2000)
- [9] Sokurenko EV, Courtney HS, Abraham SN, Klemm P, Hasty DL : Functional heterogeneity of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*, Infect Immun, 60, 4709-4719 (1992)
- [10] Pouttu R, Puustinen T, Virkola R, Hacker J, Klemm P, Korhonen TK : Amino acid residue Ala-62 in the FimH fimbrial adhesin is critical for the adhesiveness of meningitis-associated *Escherichia coli* to collagens, Mol Microbiology, 31, 1747-1757 (1999)
- [11] Kukkonen M, Raunio T, Virkola R, Lahteenmaki K, Makela PH, Klemm P, Clegg S, Korhonen TK : Basement membrane carbohydrate as a target for bacterial adhesion: binding of type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* to laminin, Mol Microbiology, 7, 229-237 (1993)
- [12] Eto DS, Jones TA, Sundsbak JL, Mulvey MA : Integrin-Mediated Host Cell Invasion by Type 1-Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*, PLoS Pathog, 3, e100 (2007)
- [13] Le Bouguéne C, Bertin Y : AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals, Vet Res, 30, 317 (1999)

Extra-intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Infection in Calves
and the Cellular Impairment of Isolates

Nobumichi FURUTA[†], Atsushi OONUKEI and Toru OJIMA

**Yamagata Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center, 736 Urushiyama, Yamagata, 990-2161, Japan*

SUMMARY

In this study, we reported that two cases of ExPEC (extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*) infection in calves occurred in Yamagata Prefecture, and analyzed the cellular impairment of the isolates using cultured cells. The autopsy similarities between the two cases included hemoid hydrothorax and bleeding from the heart, lungs, omentum, and intestines. Each case included bleeding from the cerebrum, liver, kidney, and spleen. ExPEC was isolated from each organ in both cases. In the Hep-2 cells inoculated with ExPEC, which entered the cells and caused cell death through desquamation and cytoplasmic damage. These results suggest that ExPEC impair cells by invasion, and cause tissue damage through bleeding.

— Key words : Cell damage, extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*, invasion.

[†] *Correspondence to : Nobumichi FURUTA (Yamagata Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center)*

736 Urushiyama, Yamagata, 990-2161, Japan

TEL 023-686-4410 FAX 023-686-5715 E-mail : furutan@pref.yamagata.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 69, 524 ~ 528 (2016)