

過去9年間に分離された豚由来病原性大腸菌O116 及びO139の比較解析

江頭宏之¹⁾、高森広典²⁾、高橋幸治¹⁾

1) 宮城県仙台家畜保健衛生所

2) 宮城県畜産試験場

要 約

本県における豚大腸菌症または浮腫病から分離された大腸菌のO群血清型は、平成20～28年度では、以前に分離事例が認められていなかったO116 (9/31症例) による症例が増加し、O139 (9/31症例) と並び最も分離頻度の高い血清型であった。本県のO116による症例は、平成20年度に初めて確認され、平成28年度までに7農場9症例で確認された。そこで、本県の豚由来病原性大腸菌O116について、発生状況調査、病原因子保有状況調査、薬剤耐性状況調査及び分子疫学的解析を実施し、以前より本県で主要な血清型である豚由来病原性大腸菌O139との病原因子保有率及び薬剤耐性状況の比較を実施した。病原遺伝子検査では、O116はエンテロトキシン産生遺伝子及び志賀毒素産生遺伝子を全株が保有しており、一方O139は志賀毒素産生遺伝子を全株が保有していたが、エンテロトキシン産生遺伝子については、STaを6%が保有しているのみであり、O116と比較してエンテロトキシン産生遺伝子の保有率に顕著な差が認められた。O116はO139と比較して、下痢が多く、下痢と眼瞼浮腫のどちらも認められる症例も確認されたことから、病原性が高い可能性が考えられた。薬剤感受性試験では、20薬剤中O139は平均3.4薬剤、O116は平均12.3薬剤に耐性を示し、O139と比較してO116の多剤耐性傾向が確認された。O116におけるパルスフィールドゲル電気泳動法では、2種類の切断パターンが確認された。同様の切断パターンを示した5農場7症例では、同一由来株が侵入した可能性が考えられ、その他2症例については、由来の異なる株の侵入が示唆された。

I. はじめに

大腸菌による豚の疾病には、下痢を主徴とし、新生豚または離乳豚で多く発生が認められる豚大腸菌症や、眼瞼浮腫や急死を主徴とし、離乳豚で多く発生が認められる浮腫病などがある。近年、これらの疾病の原因となる大腸菌のO群血清型に変化がみられ、1990年代はO139及びO149が多くの割合を占めていたが、ここ10年ほどでは、O139、O149、O116及びOSB 9が日本における主要な血清型であることが報告されている⁴⁾。特に、O116は高い毒素遺伝子保有率と多剤耐性傾向を示すことが報告されているため²⁾、今後、全国的なまん延が危惧される。

本県における豚大腸菌症または浮腫病から分離された大腸菌のO群血清型は、平成11～19年度まではO139 (15/31症例) 及びO149 (7/31症例) が主要な血清型であったが、平成20～28年度では、以前に分離事例が認められていなかったO116 (9/31症例) による症例が増加し、O139 (9/31症例) と並び最も分離頻度の高い血清型であった。本県のO116による症例は、平成20年度に初めて確認され、平成28年度までに7農場 (A～G農場) 9症例で確認された。症状は、9症例中、眼瞼浮腫が3症例、下痢が8症例、死亡が全ての症例で確認された (表1)。一方、O139による症例は、平成20～28年度に7農場9症例で確認された。症状は、9症例中、眼

験浮腫が2症例、下痢が1症例、死亡が全ての症例で確認された。

表1 発生状況 (O116)

7農場9症例					症状			
管轄 家保	農場	年度	株数	経営	浮腫	下痢		死亡
						●	●	
北部	A	H20	1	繁殖		●	●	●
		H22	2	一貫	●	●	●	●
	B	H22	1	一貫		●	●	●
		H25	2	一貫	●			●
	C	H24	2	繁殖		●	●	●
東部	D	H25	2	一貫		●	●	●
	E	H26	2	一貫	●	●	●	●
	F	H27	2	一貫		●	●	●
	G	H28	2	一貫		●	●	●

※ B農場のみ3症例、その他は1症例

そこで、本県の豚由来病原性大腸菌O116について、発生状況調査、病原因子保有状況調査、薬剤耐性状況調査及び分子疫学的解析を実施し、以前より本県で主要な血清型である豚由来病原性大腸菌O139との病原因子保有率及び薬剤耐性状況の比較を実施したので、その概要を報告する。

II. 材料および方法

1 材料

平成20～28年度に、7農場（A～G農場）9症例から分離された豚由来病原性大腸菌O116：16株（A農場1症例1株、B農場3症例5株、C～G農場各1症例2株）を試験に供した。比較解析には、平成20～28年度に7農場9症例から分離された豚由来病原性大腸菌O139：17株を試験に供した。

2 方法

(1) 病原遺伝子検査

毒素遺伝子（*LT*、*STa*、*STb*、*Stx1*、*Stx2e*）及び付着因子（*eae*、*F4*、*F5*、*F6*、*F18*、*F41*）について、PCR法で実施した。

(2) 薬剤感受性試験

ミュラー・ヒントン寒天培地（日本ベクtonディッキンソン株式会社）を用いて、アンピシリン（ABPC）、アモキシシリン（AMPC）、

カナマイシン（KM）、ゲンタマイシン（GM）、ストレプトマイシン（SM）、テトラサイクリン（TC）、オキシテトラサイクリン（OTC）、ドキシサイクリン（DOXY）、ST合剤（ST）、クロラムフェニコール（CP）、ナリジクス酸（NA）、レボフロキサシン（LVFX）、シプロフロキサシン（CPFX）、ノルフロキサシン（NFLX）、セファゾリン（CEZ）、セフロキシム（CXM）、セフォタキシム（CTX）、セフェピム（CFPM）、メロペネム（MEPM）、イミペネム（IPM）の20薬剤について1濃度ディスク法で実施した。ディスクは、センシディスク（日本ベクton・ディッキンソン株式会社）を用いた。

(3) Multilocus Sequence Typing (MLST)

7つのハウスキーピング遺伝子（*adk*、*fumC*、*gyrB*、*icd*、*mdh*、*purA*、*recA*）について塩基配列を解析し、その配列からSequence Type (ST) を決定した。

(4) パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE)

秋庭の報告¹⁾によるプロトコールに準じて行い、制限酵素はXba I（タカラバイオ株式会社）を用いて、泳動条件6 V/cm、5-50秒、22時間で実施した。結果の解析は、Tenoverらの報告⁸⁾による評価基準に基づき切断パターンとの相違3本以内を近縁とした。

III. 結果

(1) 病原遺伝子検査 (図1)

O116全16株が、毒素遺伝子は、エンテロトキシン産生遺伝子である*LT*、*STa*及び*STb*、志賀毒素産生遺伝子である*Stx2e*を保有していた。また、付着因子は、O116全16株が*F18*を保有していた。その他の遺伝子は陰性であった。

O139では、毒素遺伝子のうち、エンテロトキシン産生遺伝子は、*STa*を6%（1/17株）が保有しており、*LT*及び*STb*は全株が陰性であった。志賀毒素産生遺伝子は、*Stx2e*を全株が保有していた。付着因子*F18*は全株が陽性であった。その他の遺伝子は陰性であった。

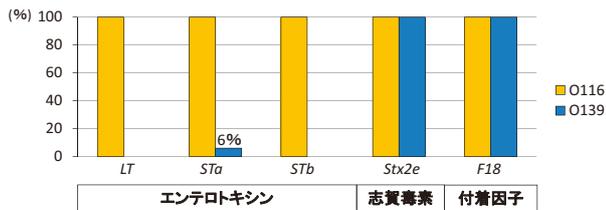


図1 病原遺伝子陽性率 (O116とO139の比較)

(2) 薬剤感受性試験

1) O116検査結果 (表2)

20薬剤中11薬剤 (ABPC、AMPC、GM、SM、TC、OTC、NA、LVFX、CPFX、NFLX、CEZ) に全株が耐性を示した。その他の薬剤の耐性率は、CXM63% (10/16株)、ST及びCP25% (4/16株)、DOXY13% (2/16株)であった。一方、5薬剤 (KM、CTX、CFPM、MEPM、IPM) については、耐性は確認されなかった。

表2 O116の薬剤感受性試験結果

	ペニシリン系		アミノグリコシド系		テトラサイクリン系		キノロン系	フルオロキノロン系		セフェム系		その他		
	ABPC	AMPC	KM	GM	TC	DOXY	NA	LVFX	CPFX	NFLX	CEZ	CXM	CTX	CP
A農場1株	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I
B農場5株	R	S~I	R	R	I	R	R	R	R	R~I	S~I	S	S	S
C農場2株	R	S~I	R	R	I	R	R	R	R	R	I	S	S	S
D農場2株	R	S	R	R	I	R	R	R	R	R	I	S	S	S
E農場2株	R	I	R	R	I	R	R	R	R	R~I	S~I	R	R	R
F農場2株	R	S	R	R	I	R	R	R	R	R	I	R	R	R
G農場2株	R	S	R	R	R~I	R	R	R	R	R~I	S	S	S	S
耐性率 (%)	100	0	100	100	13	100	100	100	63	0	25			

※ CFPM,MEPM,IPMについては、全株感受性 R: 耐性 I: 中間 S: 感受性

2) O139検査結果

耐性率は、TC及びOTC71% (12/17株)、ST47% (8/17株)、SM41% (7/17株)、KM29% (5/17株)、ABPC及びAMPC24% (4/17株)、DOXY18% (3/17株)、CP12% (2/17株)であった。一方、11薬剤 (GM、NA、LVFX、CPFX、NFLX、CEZ、CXM、CTX、CFPM、MEPM、IPM) については、耐性は確認されなかった。

3) O116とO139の比較解析 (図2)

3薬剤 (KM、DOXY、ST) については、O116と比較してO139の耐性率が高い結果となった。一方、13薬剤 (ABPC、AMPC、GM、SM、TC、OTC、CP、NA、LVFX、CPFX、NFLX、

CEZ、CXM) についてはO116の耐性率がO139を上回る結果となった。4薬剤 (CTX、CFPM、MEPM、IPM) については、どちらの血清型も耐性は確認されなかった。耐性薬剤数を比較すると、20薬剤中O139は平均3.4薬剤 (0~7薬剤)、O116は平均12.3薬剤 (11~14薬剤)であり、耐性薬剤数に顕著な差が認められた。

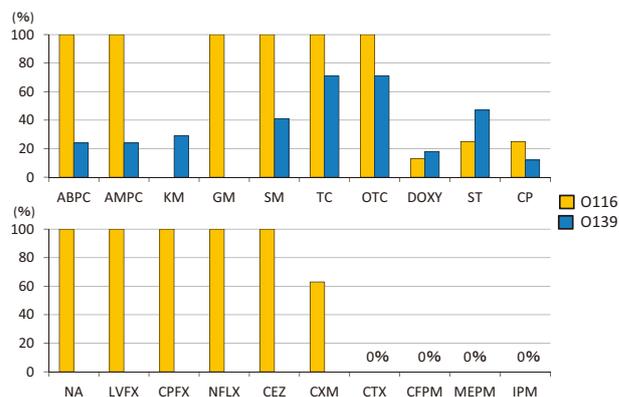


図2 薬剤耐性率 (O116とO139の比較)

(3) MLST

O116全16株は全て、ST88 (clonal complex23) に分類された。

(4) PFGE (図3)

A~D、G農場由来の12株は切断パターンの相違が3本以内であった。一方、A~D、G農場由来の12株とE、F農場由来4株では、切断パターンの相違が4本以上確認された。

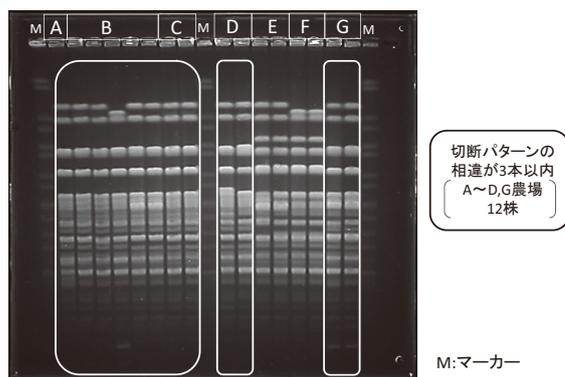


図3 PFGE結果 (O116)

IV. まとめ及び考察

本県で分離されたO116は、エンテロトキシン産生遺伝子であるLT、STa及びSTbと、志賀毒素産生

遺伝子である*Stx2e*を全株が保有しており、他県で分離されたO116の病原遺伝子保有状況²⁾と同様の傾向を示した。一方、O139は*Stx2e*を全株保有していたが、エンテロトキシン産生遺伝子については、*STa*を6%が保有しているのみで、*LT*及び*STb*は全株が陰性と、O116と比較してエンテロトキシン産生遺伝子の保有率に顕著な差が認められた。エンテロトキシンは、細胞を障害せず、腸管内で水分や電解質の分泌促進及び吸収抑制を引き起こし⁵⁾、産生後すぐに下痢の症状がみられることが報告されている³⁾。一方、*Stx2e*は産生後腸管から吸収され、全身性の血管障害を引き起こし、産生されてから発症するまでに7～10日要することが報告されている³⁾。病原性大腸菌がエンテロトキシン及び志賀毒素を両方産生する場合、感染豚は下痢の後に浮腫病を発症する可能性があることが報告されている^{3,6)}。本県のO116の症例では、9症例中8症例で下痢が確認され、下痢と眼瞼浮腫どちらも確認された症例は2症例認められた。一方、O139では、9症例中、下痢が認められた症例は*STa*を保有する大腸菌が分離された1症例のみで確認され、下痢と眼瞼浮腫どちらも確認された症例は認められなかった。今回の調査では、死亡率の比較は実施できなかったが、O116はO139と比較して、下痢が多く、下痢と眼瞼浮腫のどちらも認められる症例も確認されたことから、病原性が高い可能性が考えられた。

薬剤感受性試験では、20薬剤中O139は平均3.4薬剤、O116は平均12.3薬剤に耐性を示し、O139と比較してO116の多剤耐性傾向が確認された。さらに、O116は全株がフルオロキノロン系の3薬剤(LVFX、CPFX、NFLX)に耐性を示し、第2世代セフェム系薬剤であるCXMにも63%が耐性を示した。また、第3世代セフェム系薬剤であるCTXには耐性は認められず、第4世代セフェム系薬剤であるCFPM及びカルバペネム系の2薬剤(MEPM、IPM)には、O116全株が感受性を示した。O116は有効な薬剤が少ないため、さらなる耐性獲得の防止のため、抗菌剤の慎重使用や、飼養衛生管理基準の遵守による農場への侵入の防止、生菌剤を用いての腸内細菌叢のコントロールが重要と思われる。

MLSTの解析の結果、既報^{4,7)}のとおり、本県の

O116もST88に分類された。PFGEの結果では、A～D、G農場由来の12株と、E、F農場由来4株で、大きく分けて2種類の切断パターンが確認された。これらの結果から、A～D、G農場の7症例は、同一由来株が農場内に侵入した可能性が考えられた。一方、E、F農場の2症例については、E、F農場由来4株のみST、CP耐性と、他の株と薬剤耐性パターンも異なった。このことから、A～D、G農場由来株と、E、F農場由来株では、由来が異なる可能性が示唆された。E農場では、O116による疾病の発生が報告されている県から豚の導入が確認され、E、F農場は農場間距離が直線距離で1.3kmと近隣であったため、E、F農場はA～D、G農場とは異なる感染経路で農場内にO116が侵入し伝播した可能性が考えられた。

今後も、継続して本県の豚由来病原性大腸菌O116による豚大腸菌症及び浮腫病の発生状況を注視していく。

稿を終えるにあたり、分子疫学的解析の実施、並びにご助言を賜りました、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楠本正博先生に深謝いたします。

引用文献

- 1) 秋庭正人 (2000) パルスフィールドゲル電気泳動による腸管出血性大腸菌O157:H7の分子疫学的解析法. *JVM*. 53, 14-21
- 2) 藤井勇紀、田邊ひとみ、西野弘人他 (2017) 茨城県における豚由来病原性大腸菌の比較解析. *日本獣医師会雑誌*. 70, 643-649
- 3) 小林秀樹 (2006) 豚の浮腫病. *All About Swine*. 28, 16-22
- 4) Kusumoto M., Hikoda Y., Fujii Y., et al. (2016) Emergence of a Multidrug-Resistant Shiga Toxin-Producing Enterotoxigenic *Escherichia coli* Lineage in Diseased Swine in Japan. *J Clin Microbiol*. 54, 1074-1081
- 5) 永井英貴 (2011) 豚用ワクチンの概説. *日本獣医師会雑誌*. 64, 194-202
- 6) 末吉益雄 (2006) 子豚の下痢を伴う浮腫病. *豚病会報*. 48, 7-13
- 7) 田中健介、羽入さち子、篠川有理他 (2015) 新潟県で分離された豚由来病原性大腸菌の比較解析に基づく一考察. 平成26年度新潟県家畜保健衛生業績発表会集録. 61-64
- 8) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 33, 2233-2239