

国内で新たに出現した豚由来病原性大腸菌系統の解析

楠本正博

Analysis of an emerging swine pathogenic *Escherichia coli* lineage in Japan

Masahiro KUSUMOTO

背景と目的

豚の大腸菌症は出生直後から子豚期に多く発生し、死亡や発育不良の原因となり養豚農家に経済的損失を与える重要な疾病の一つである。主に原因となる大腸菌は下痢を引き起こす毒素原性大腸菌（enterotoxigenic *Escherichia coli*; ETEC）および浮腫病を引き起こす志賀毒素産生性大腸菌（Shiga toxin-producing *E. coli*; STEC）であり^{1,2)}、近年、ヒトの医療現場と同様に多剤耐性菌の出現が問題となっている。

豚から分離される病原性大腸菌の血清型は特定の O 群に限られる傾向があり、O8, O138, O139, O141, O147, O149, O157 などの分離に関する報告が世界的に多い^{2,3)}。しかし国内においては、特に近年の調査報告が少ないため、豚由来病原性大腸菌の分離状況や性状の推移について不明点が多い。本研究において我々は、国内の下痢または浮腫病の豚から分離された病原性大腸菌の血清型や薬剤感受性などについて調査を行い、新たな多剤耐性系統を見出したので紹介する。

研究の概要

1. 豚由来病原性大腸菌の O 群血清型別

1991 年から 2014 年にかけて国内の下痢または浮腫病の豚から分離された病原性大腸菌 967 株について、Statens Serum Institut 製の 大腸菌 O 抗血清（O1～O187）を用いた血清型別を行った。その結果、試験した 967 株のうち 913 株（94.4%）が 60 種類の O 群血清型に型別され、残りの 54 株（5.6%）は型別不能（OUT）であった。分離頻度の高い O 群血清型は O139（26.1%）、O149（25.3%）、O116（13.5%）、OSB9（*Shigella boydii*

9 型）（5.8%）であり、これら 4 種類の主要 O 群血清型が全体の 70.7% を占めていた（図 1）。世界的に豚から多く分離される O8, O138, O139, O141, O147, O149, O157 は国内においても分離頻度の上位を占めていた。これに対して、O116 はイギリス、スペイン、中国で数株の分離が報告されているが毒素遺伝子を保有していない例が多く^{4,6)}、また OSB9 の分離はこれまで報告されていないことから、豚からの O116 および OSB9 の分離頻度の高さが我が国の大きな特徴と考えられる。

試験した 967 株のうち最も古い株は O139 が 1991 年、O149 が 1993 年、O116 が 2005 年、OSB9 が 2003 年に分離されており、O139 および O149 の分離は年々減少する傾向にある。一方、O116 および OSB9 は最近 10 年間で分離されており、マイナーな O 群血清型（O139,

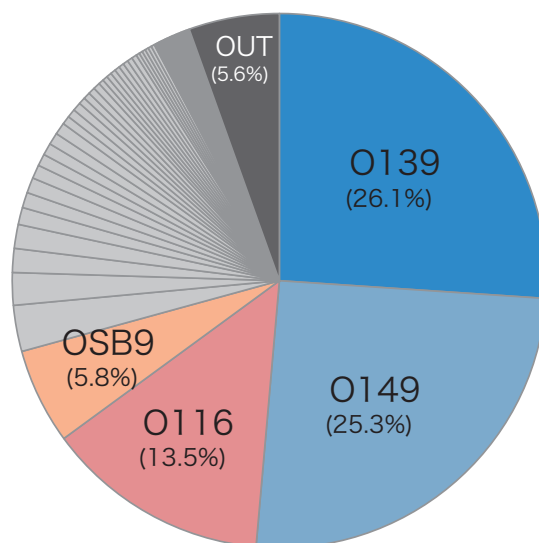


図 1. 1991 年から 2014 年にかけて国内の豚群から分離された大腸菌の O 群血清型（n=967）

O149, O116, OSB9 以外) の分離もその期間において種類および頻度ともに増加している(図2)。このことは、近年、豚由来病原性大腸菌の血清型が多様化する中で、O116 および OSB9 が 2000 年代の中頃から国内で浸潤し始め、主要 O 群血清型の一角を形成するに至ったことを示唆する。

2. 主要 O 群血清型の薬剤感受性試験

抗菌剤としてペニシリン系(アンピシリン, ピペラシリン), セファロスポリン系(セファゾリン, セフロキシム, セフォタキシム, セフェピム), セファマイシン系(セフォキシチン), オキサセフェム系(モキサラクタム), モノバクタム系(アズトレオナム), カルバペネム系(イミペネム, メロペネム), アミノグリコシド系(ゲンタマイシン, カナマイシン, ストレプトマイシン), テトラサ

イクリン系(テトラサイクリン), クロラムフェニコール系(クロラムフェニコール), キノロン系(ナリジクス酸), フルオロキノロン系(シプロフロキサシン, レボフロキサシン, ガチフロキサシン), サルファ剤(スルファメトキサゾール)・トリメトプリム合剤より括弧内に示した合計 21 剤を選抜し、4 種類の主要 O 群血清型(全 684 株)についてディスク拡散法⁷⁾を用いた薬剤感受性試験を行った。その結果、耐性株(試験した 21 剤のうち少なくとも 1 剤に耐性の株)の割合は O139 で 79.8% (201/252), O149 で 95.5% (234/245), O116 で 100% (131/131), OSB9 で 100% (56/56) であった。また、21 剤のうち O116 は平均 9.8 剤に耐性(最多で 14 剤に耐性), OSB9 は平均 7.9 剤に耐性(最多で 15 剤に耐性)であり、O139 (平均 3.3 剤に耐性) および O149 (平均 4.4 剤に耐性) に比べて多剤耐性傾向が顕著であった(図3)。

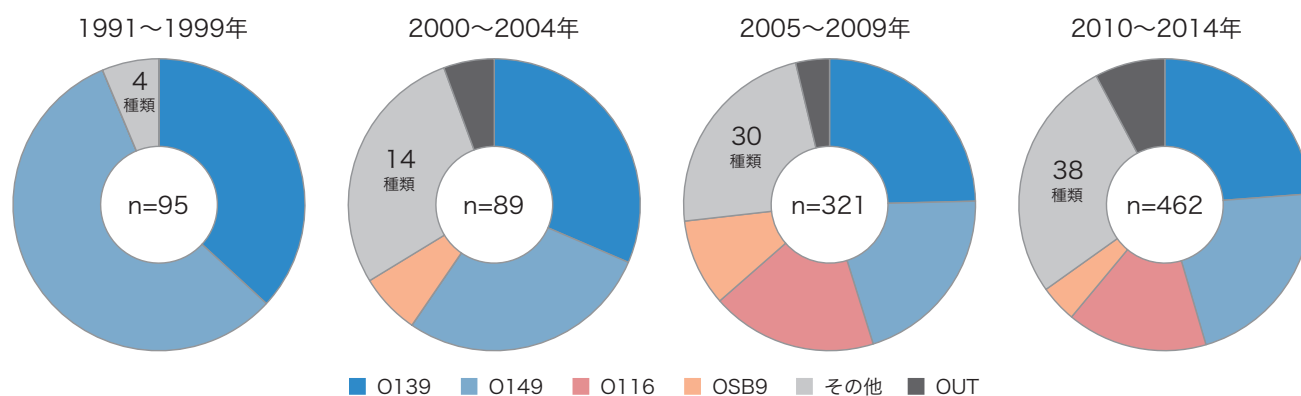


図2. O 群血清型の分離比率の推移

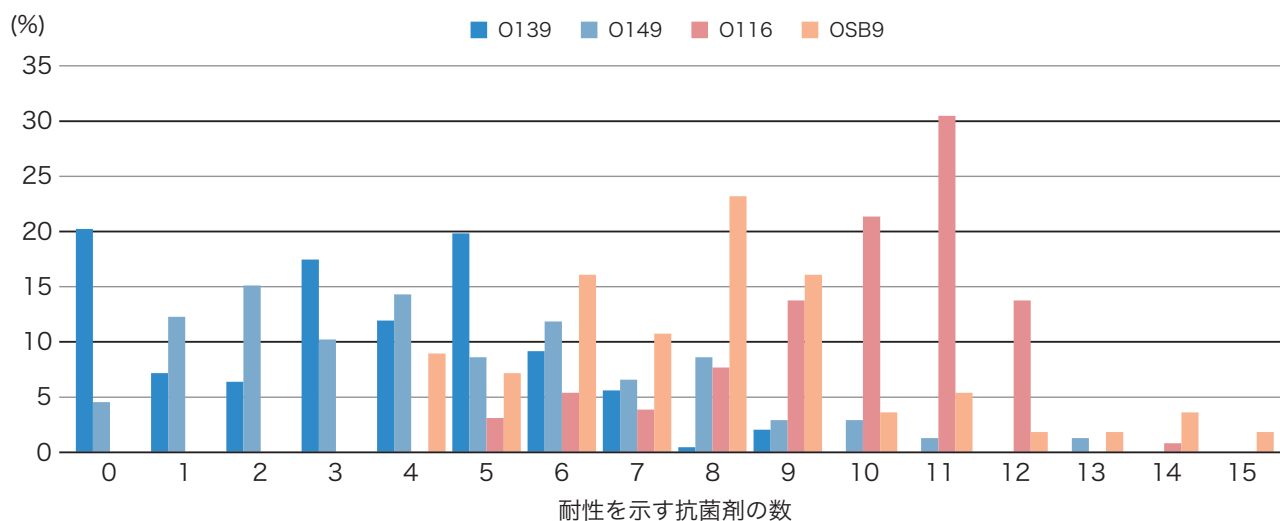


図3. 主要 O 群血清型の多剤耐性レベルの比較

これら4種類のO群血清型の各抗菌剤に対する耐性菌分布率を図4に示す。特に、キノロン耐性菌およびフルオロキノロン耐性菌の分布率はともに血清型により大きく異なり、O139の8.8%、O149の46.9%、O116の93.9%、OSB9の83.9%がナリジクス酸に耐性、またO139にフルオロキノロン耐性菌は存在せず、O149の13.7%、O116の99.2%、OSB9の67.9%がシプロフロキサシンに耐性であった。このように、キノロン系およびフルオロキノロン系抗菌剤に対する高い耐性菌分布率はO116およびOSB9の大きな特徴である。他の抗菌剤に対するO139とO149の耐性菌分布率に大きな差はみられないが、両血清型に比べ、多剤耐性傾向が顕著なO116およびOSB9ではより多くの抗菌剤で高い耐性菌分布率を示した(図4)。

今後の課題と展望

本研究で試験したO116およびOSB9の全187株は、Warwick大学の大腸菌データベースを用いたmultilocus sequence typing (MLST)⁹⁾により同一の系統(ST88)に分類される¹⁰⁾。本研究により、豚から分離されるST88が高レベルの多剤耐性および高いフルオロキノロン耐性菌分布率(約90%)を特徴とする系統であることが明らかになったが、それは本系統の養豚産業に及ぼすリスクが高いことを示唆する。また、本系統が2000

年代の中頃より分離されはじめた新しい系統であるにも関わらず、その分離頻度はすでに従来型の病原性大腸菌(O139およびO149)に次ぐレベルであり、今後も浸潤状況を注視する必要がある。

近年、薬剤耐性菌の拡大が世界的な問題となっており、世界保健機関(WHO)総会において2015年に採択された薬剤耐性に関する国際行動計画(グローバルアクションプラン)を踏まえ、国内でもワンヘルスの観点から関係省庁や関係機関による専門領域を超えた取り組みが行われている。フルオロキノロン系抗菌剤は広い抗菌スペクトルおよび強い抗菌力を持ち、動物の細菌感染症に対する治療だけでなくヒト用医薬品としても重要性が高いことから、食用動物への使用は第二次選択薬かつ要指示薬とされ、投与期間も制限されている。家畜についてはJapanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System(JVARM)による薬剤耐性菌のサーベイランスが行われており、2000～2005年の調査においてフルオロキノロン系抗菌剤の国内での使用量は少なく、また2007年の調査において国内の健康豚からフルオロキノロン耐性大腸菌は分離されなかったことがそれぞれ報告されている⁸⁾。したがって、フルオロキノロン耐性菌の選択圧としては、治療時のフルオロキノロン系抗菌剤の使用に注目することが多い。しかし、病原性大腸菌O116はフルオロキノロン系抗菌剤の使用経験がな

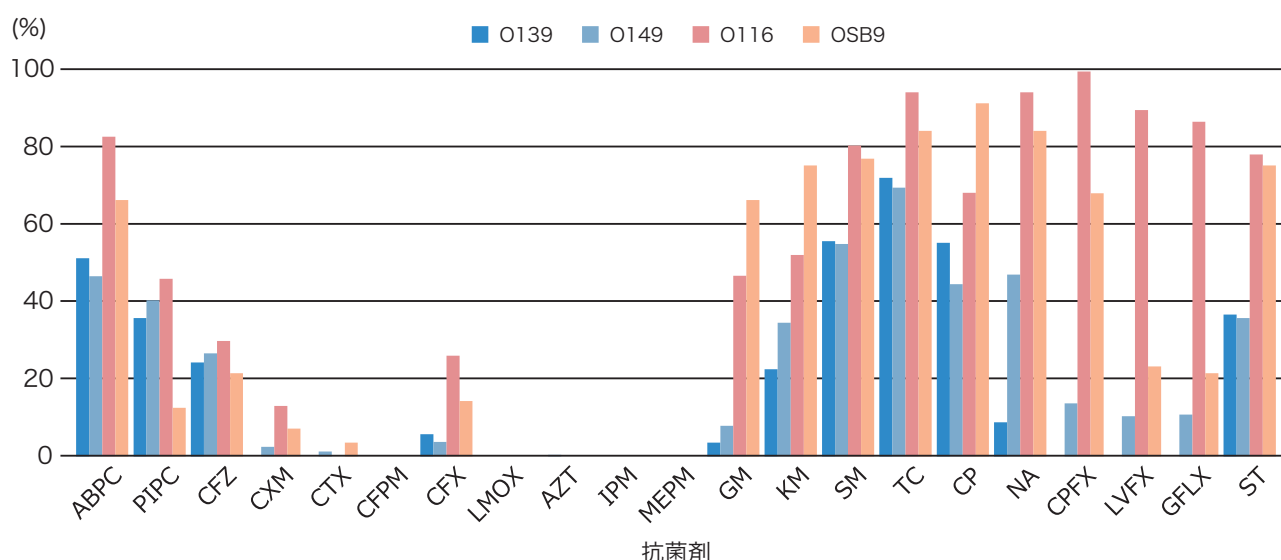


図4. 主要O群血清型の各抗菌剤に対する耐性菌分布率の比較

ABPC, アンピシリン; PIPC, ピペラシリン; CFZ, セファゾリン; CXM, セフロキシム; CTX, セフトキシム; CFPM, セフェピム; CFX, セフォキシチン; LMOX, モキサラクタム; AZT, アズトレオナム; IPM, イミペネム; MEPM, メロペネム; GM, ゲンタマイシン; KM, カナマイシン; SM, ストレプトマイシン; TC, テトラサイクリン; CP, クロラムフェニコール; NA, ナリジクス酸; CPFX, シプロフロキサシン; LVFX, レボフロキサシン; GFLX, ガチフロキサシン; ST, スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤

い、すなわちフルオロキノロン選択圧がない農場の豚からも分離されており¹¹⁾、単にフルオロキノロン系抗菌剤の慎重使用を促すだけでは本菌を排除できない可能性が高い。O116 および OSB9 はフルオロキノロン系の他にも多くの抗菌剤に耐性である（すなわち、選択圧が必ずしもフルオロキノロン系抗菌剤とは限らない）ことから、本系統が分離された農場での抗菌剤使用状況の調査と並行して、さらに詳細な系統解析によって多剤耐性獲得メカニズムを明らかにする必要があると考えられる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、大腸菌分離株および菌株情報を提供していただいた全国の家畜保健衛生所の皆様に深謝いたします。

引用文献

- 1) Holland, R.E.: Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. Clin. Microbiol. Rev. 3, 345-375 (1990).
- 2) Frydendahl, K.: Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. Vet. Microbiol. 85, 169-182 (2002).
- 3) Fairbrother, J.M., Nadeau, E., Gyles, C.L.: *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. Anim. Health. Res. Rev. 6, 17-39 (2005).
- 4) Neef, N.A., McOrist, S., Lysons, R.J., Bland, A.P., Miller, B.G.: Development of large intestinal attaching and effacing lesions in pigs in association with the feeding of a particular diet. Infect. Immun. 62, 4325-4332 (1994).
- 5) Garabal, J.I., Gonzalez, E.A., Vazquez, F., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E.: Serogroups of *Escherichia coli* isolated from piglets in Spain. Vet. Microbiol. 48:113-123 (1996).
- 6) Chen, X., Gao, S., Jiao, X., Liu, X.F.: Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea in eastern China. Vet. Microbiol. 103, 13-20 (2004).
- 7) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement, Document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania (2014).
- 8) Harada, K., Asai, T.: Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan. J. Biomed. Biotechnol. 2010, 180682 (2010).
- 9) Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C., Ochman, H., Achtman, M.: Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Mol. Microbiol. 60, 1136-1151 (2006).
- 10) Kusumoto, M., Hikoda, Y., Fujii, Y., Murata, M., Miyoshi, H., Ogura, Y., Gotoh, Y., Iwata, T., Hayashi, T., Akiba, M.: Emergence of a multidrug-resistant Shiga toxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* lineage in diseased swine in Japan. J. Clin. Microbiol. 54, 1074-81 (2016).
- 11) 藤井勇紀, 田邊ひとみ, 西野弘人, 大谷芳子, 都筑智子, 大内義尚, 秋庭正人, 楠本正博: 茨城県における豚由来病原性大腸菌の比較解析: 主要血清型 O116 の解析. 日本獣医師会雑誌 70, 643-649 (2017).