

## 10 県内で分離された豚由来病原性大腸菌の細菌学的解析

中央家畜保健衛生所

○山本 栄子

### I はじめに

豚で経済的損害の大きい大腸菌性疾病として豚大腸菌症と浮腫病が挙げられる。国内で確認されている豚由来病原性大腸菌の代表的な O 群遺伝子型は、分離率の高い順に O<sub>g</sub>139、O<sub>g</sub>149、多剤耐性傾向を示す O<sub>g</sub>116 及び O<sub>g</sub>SB9 と報告されている<sup>1)</sup>。県内で発生した豚の大腸菌性疾病を、2003～2012 年(1 期)と 2013～2019 年(2 期)で比較したところ、豚大腸菌症の発生割合が 86.6% (58/67) から 43.6% (24/55) に減少していた。そこで、県内で分離された豚由来病原性大腸菌の特徴を把握するため、2003～2019 年の分離株 (n=122) について、性状分析や薬剤感受性試験を実施したので、その概要を報告する。

### II 材料と方法

#### 1 材料

2003～2019 年に県内で分離された豚由来大腸菌 122 株を用いた。

#### 2 方法

##### (1) O 群遺伝子型別 (O-genotyping PCR)

Iguchi ら<sup>2)</sup>の方法に基づき、PCR により O 群遺伝子型別を実施した。

##### (2) 病原性関連因子 (VF)

Vu-Khac ら<sup>3)</sup>の方法に基づき、PCR により毒素因子 (LT、STa、STb、EAST1、Stx1、Stx2e) 及び定着因子 (intimin(*eae*)、F4、F5、F6、F17、F18、F41) の計 13 種類の病原性関連因子の遺伝子を検出した。

##### (3) コリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1* 遺伝子)

Liu ら<sup>4)</sup>の方法に基づき、PCR により *mcr-1* 遺伝子を検出した。

##### (4) 薬剤感受性試験

コリスチン (CL)、アプラマイシン (APM)、ビコザマイシン (BCM) の 3 薬剤について、寒天平板希釈法により実施した。また、アンピシリン (AMP)、ピペラシリン (PIP)、セファゾリン (CFZ)、スフロキシム (CXM)、セフトキシム (CTX)、セフェピム (FEP)、セフォキシチン (FOX)、モクサラクタム (MOX)、アズトレオナム (ATM)、イミペネム (IPM)、メロペネム (MEM)、ゲンタマイシン (GEN)、カナマイシン (KAN)、ストレプトマイシン (STR)、テトラサイクリン (TET)、クロラムフェニコール (CHL)、ナリジクス酸 (NAL)、シプロフロキサシン (CIP)、レボフロキサシン (LVX)、ガチフロキサシン (GAT)、ST 合剤 (SXT) の 21 薬剤について、一濃度ディスク拡散法 (センシディスク、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) により薬剤感受性試験を実施した。

### III 検査成績

#### 1 O 群遺伝子型別

県内分離株は、型別不能を除き、19 種類の遺伝子型に分類された。1 期は Og116 が全体の 28%、Og149 が 27% を占めた。2 期は Og139 が 38% に増加した一方、1 期で主要だった Og116 は 11% まで減少、Og149 に至っては分離が確認されなかった。

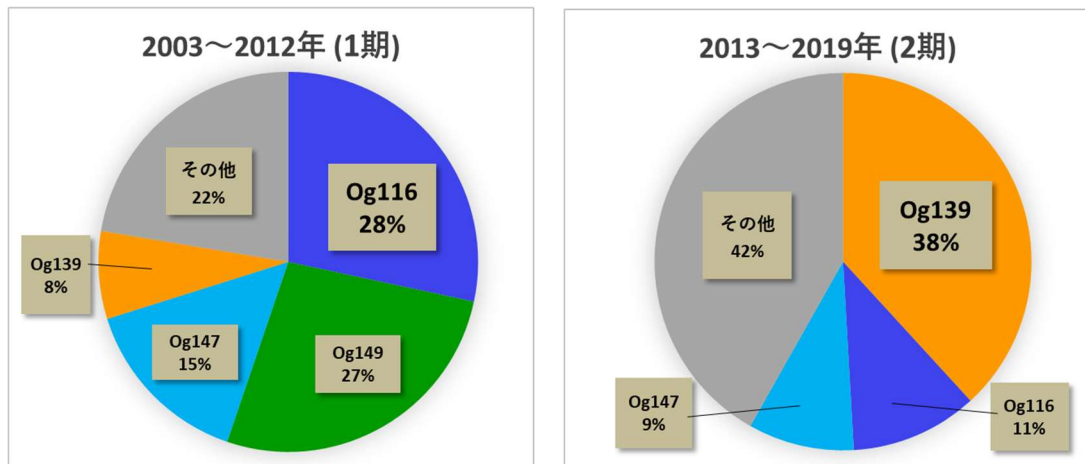


図1 1期、2期でのO群遺伝子型の分布

また、疾病別にみたところ、豚大腸菌症由来株は Og116 と Og149 が約半数を占め、浮腫病由来株は Og139 が全体の 83% を占めた。

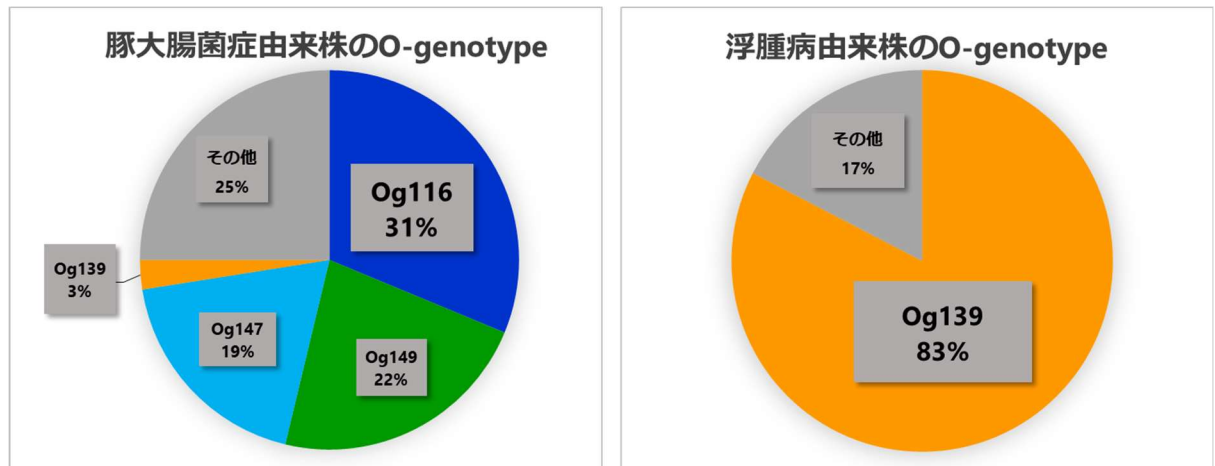


図2 疾病別にみたO群遺伝子型

#### 2 VF 保有率

豚大腸菌症由来株は LT や ST 等の複数の毒素と付着因子を保有し、浮腫病由来株は志賀毒素と F18 付

着因子にほぼ限定していた。これらの特徴は、全国的な傾向と類似していた。

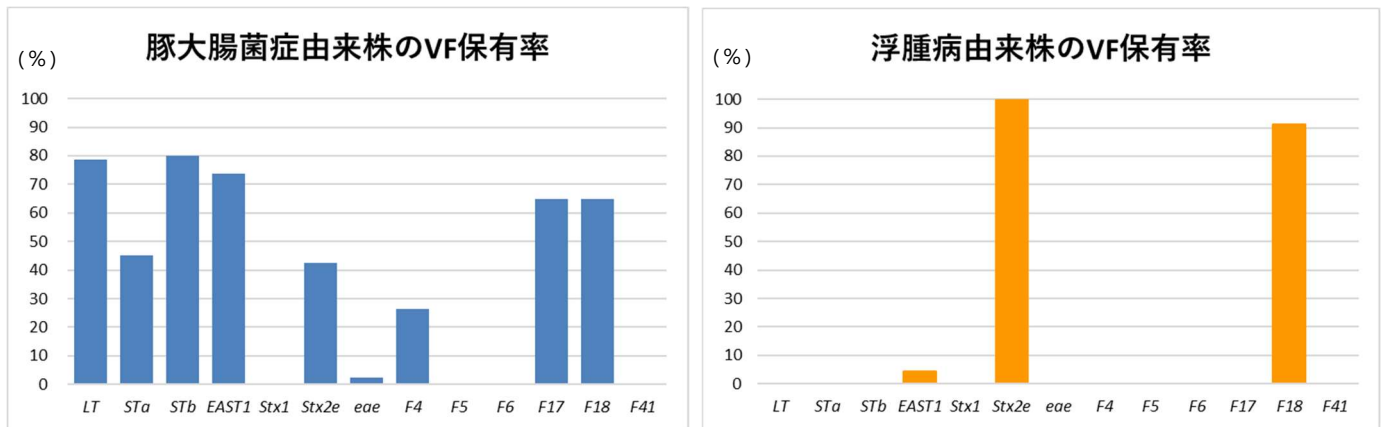


図3 疾病別にみたVF保有率

### 3 *mcr-1* 遺伝子保有率

*mcr-1* 遺伝子の保有率は全株中 32.8% (40/122) であり、2016 年に Kusumoto らが報告<sup>5)</sup>した 13.2% より高い数値を示した (健康豚由来 0.02% (2/9308)、病豚由来 13.2% (90/684))。

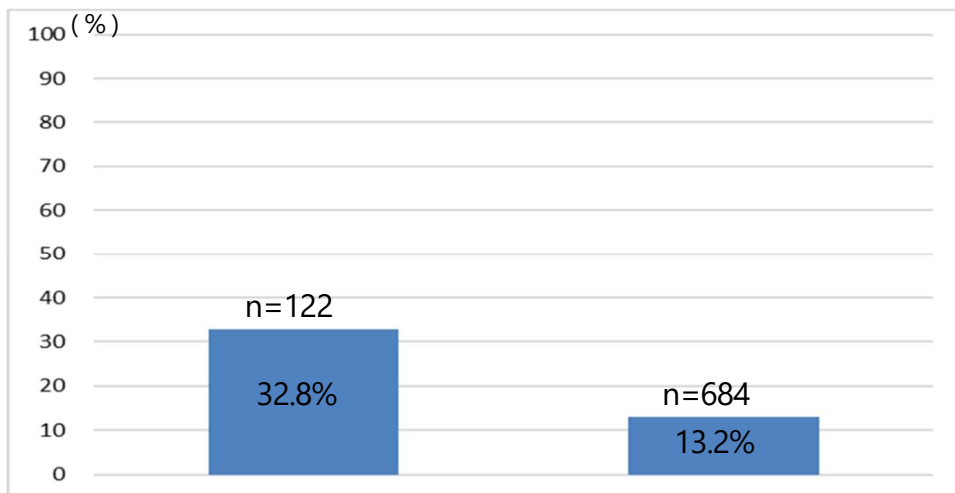


図4 県内 (左) 及び全国 (右: 既報) 分離株の *mcr-1* 遺伝子保有率

### 4 薬剤感受性試験

全株について実施した薬剤感受性試験の成績を図5に示す。TET (92.6%)、CL (67.2%)、STR (63.1%)、CHL (59.0%)、SXT (56.6%) を中心に高い耐性率が認められた。

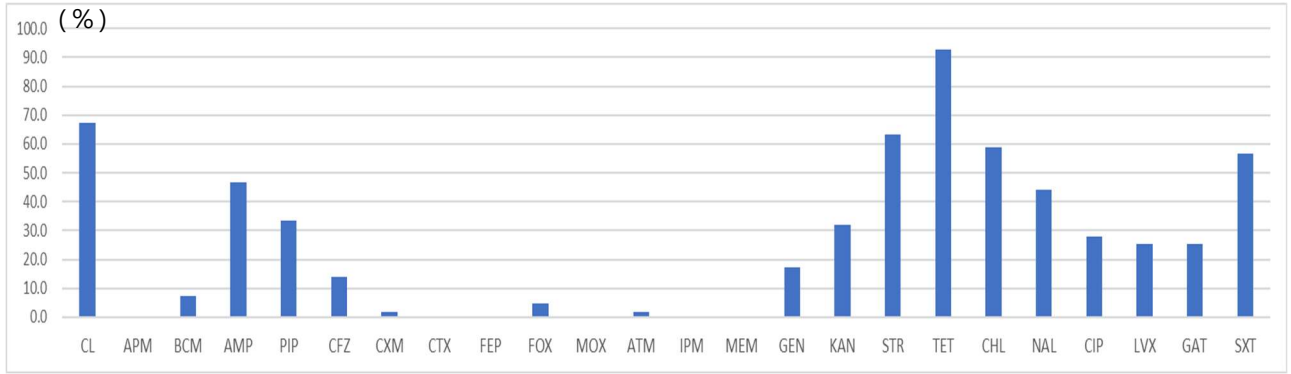


図5 各抗菌剤に対する耐性率 (全株)

また、主要な0群遺伝子型について各抗菌剤に対する耐性率を調べたところ、他と比較してOg116株の耐性率が最も高く、次いでOg139、Og147、Og149で耐性がみられた(図6)。

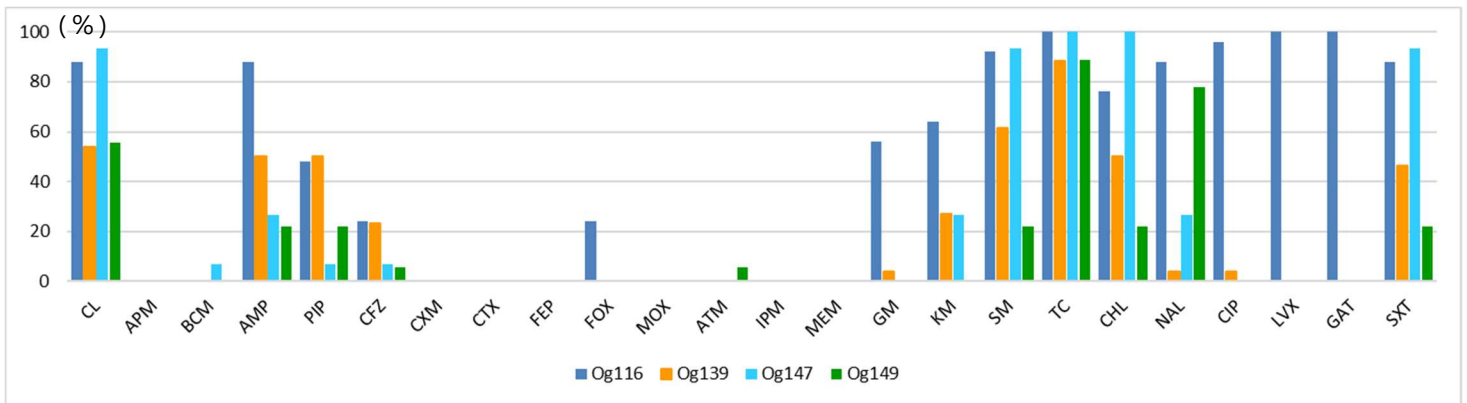


図6 各抗菌剤に対する耐性率 (主要0群遺伝子型)

特に耐性傾向がみられたOg116株及びOg139について、耐性を示した抗菌剤数の成績を表1及び表2に示す。Og116株はいずれの株も8種類以上の抗菌剤に対し耐性を有した。耐性を示した抗菌剤数は平均11.4剤であり、多剤耐性傾向が顕著であった。

表1 Og116株 (n=25) の耐性を示した抗菌剤数

分離年	耐性を示した抗菌剤数 / 株数
2007年	8~9剤 / 3株
	11~13剤 / 7株
2008年	12~13剤 / 6株
2009年	8~9剤 / 3株
2013年	13剤 / 6株

0g139 株については、耐性を持たない株から最大 9 薬剤に耐性を持つ株までばらつきがみられた。耐性を示した抗菌剤数は平均 4.6 剤であり、0g116 株より低いものの、複数の抗菌剤に対して耐性を示した。

表 2 0g139 株 (n=26) の耐性を示した抗菌剤数

分離年	耐性を示した抗菌剤数	/	株数
2010年	2剤	/	5株
2013年	2剤	/	2株
2014年	4剤	/	1株
	6～9剤	/	5株
2015年	5剤	/	1株
2016年	1～2剤	/	3株
	8～9剤	/	3株
2017年	6～7剤	/	5株
2018年	0剤	/	1株

#### IV まとめと考察

県内においては、2000年代は、豚大腸菌症に多い 0 群遺伝子型である 0g116 や 0g149 が流行していたが、2013 年以降は 0g139 が大半を占めるようになった。このことから、10 年程度で主要な遺伝子型が豚大腸菌症由来株から浮腫病由来株に多い型に置き換わった可能性が考えられた。また、近年、全国的に流行している主要な遺伝子型 (0g139、0g149、0g116、0gSB9) 以外の型の分離頻度及び種類が増加しているという報告<sup>6)</sup>があり、本県でも分離の多かった上位 4 種類の遺伝子型(0g139:26 株、0g116:25 株、0g149:18 株、0g147:15 株)以外の分離株が、1 期の 22.4%(15/67)から 2 期の 41.8%(23/55)まで増加しており、同様の傾向がみられた。

抗菌剤については、テトラサイクリンを筆頭に複数の抗菌剤で耐性が認められたが、これらの抗菌剤は豚での販売量が多く<sup>7)</sup>、畜産現場で頻繁に使用されるため、耐性株が維持されていると推測する。また、クロラムフェニコールは 2013 年以降、畜産動物への使用が禁止されているが、テトラサイクリン系抗菌剤の使用とクロラムフェニコール耐性に有意な関係が確認されており<sup>8)</sup>、クロラムフェニコール耐性はテトラサイクリン系の使用による共選択によるものと考えられた。県内分離菌の *mcr-1* 遺伝子保有率は既報<sup>5)</sup>より高い傾向を示した。*mcr-1* 遺伝子はプラスミド上に存在するコリスチン耐性に関与する遺伝子であり、2015 年に中国で、家畜、食肉及びヒトから *mcr-1* 遺伝子を保有する大腸菌が分離されたとの論文が初めて公表された<sup>4)</sup>。その後、日本を含む諸国からも *mcr-1* 遺伝子の検出が相次いで報告されている<sup>9,10)</sup>。コリスチンはこれまで飼料添加物として使用されていたが、国内における添加物としての使用は 2018 年に禁止されている。同様に、中国でも 2017 年 4 月以降、飼料添加物としての使用が中止されており、コリスチンの生産量減少に伴い、豚及び鶏糞便由来のコリスチン耐性株の分離頻度及び糞便中の *mcr-1* 遺伝子の検出量に有意な低下が認められた<sup>11)</sup>。このことから、国内においても今後、使

用量の減少により、コリスチン耐性株や *mcr-1* 遺伝子の検出動向が変化する可能性が示唆された。

今回実施した薬剤感受性試験から、全国と同様、県内主要株の多剤耐性傾向が認められた。必要以上の抗菌剤投与は耐性化リスクを高めるため、引き続き慎重使用が求められる。今後も分離菌の収集を重ね、抗菌剤に関する指導や薬剤耐性状況の把握に努めていきたい。

## V 謝辞

大腸菌の諸検査の実施及び試験計画に対する御助言を賜りました、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 人獣共通感染症研究領域 腸管病原菌グループ 楠本正博グループ長、玉村雪乃主任研究員に深謝いたします。

## VI 参考文献

- 1) 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, 1074-1081 (2016)
- 2) Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M, Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan. *Escherichia coli* O-Genotyping PCR: a Comprehensive and Practical Platform for Molecular O Serogrouping, J. Clin. Microbiol, 53 (8), 2427-2432 (2015)
- 3) Vu-Khac H, Holoda E, Pilipcinec E, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, López C, González EA, Blanco J. Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhea in Slovakia, Vet J, 174, 176-187 (2007)
- 4) Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *MCR-1* in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study, Lancet Infect Dis, 16(2), 161-168 (2016)
- 5) Kusumoto M, Ogura Y, Gotoh Y, Iwata T, Hayashi T, Akiba M. Colistin-Resistant *Mcr-1*-Positive Pathogenic *Escherichia Coli* in Swine, Japan, 2007-2014, Emerg. Infect Dis, 1315-1317 (2016)
- 6) 楠本正博: 国内で新たに出現した豚由来病原性大腸菌系統の解析, 動衛研研究報告, 第 125 号, 31-34 (2019)
- 7) 農林水産省 動物医薬品検査所: 令和 2 年度各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量 (2020)
- 8) Makita K, Goto M, Ozawa M, Kawanishi M, Koike R, Asai T, Tamura Y. Multivariable Analysis of the Association Between Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Apparently Healthy Pigs in Japan, Microb. Drug Resist, 22, 28-39 (2016)
- 9) Suzuki S, Ohnishi M, Kawanishi M, Akiba M, Kuroda M. Investigation of a plasmid genome database for colistin-resistance gene *mcr-1*, Lancet Infect Dis, 16(3), 284-285 (2016)

10 ) George V, Ioanna K. Colistin Resistant *mcr* Genes Prevalence in Livestock Animals (Swine, Bovine, Poultry) from a Multinational Perspective, A Systematic Review, *Vet Sci*, 8(11), 265 (2021)

11) Wang Y, Xu C, Zhang R, Chen Y, Shen Y, Hu F, Liu D, Lu J, Guo Y, Xia X, Jiang J, Wang X, Fu Y, Yang L, Wang J, Li J, Cai C, Yin D, Che J, Fan R, Wang Y, Qing Y, Li Y, Liao K, Chen H, Zou M, Liang L, Tang J, Shen Z, Wang S, Yang X, Wu C, Xu S, Walsh TR, Shen J. Changes in colistin resistance and *mcr-1* abundance in *Escherichia coli* of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: an epidemiological comparative study, *Lancet Infect Dis*, 20(10), 1161-1171 (2020)