

# 大腸菌症の豚から分離された多剤耐性大腸菌血清型 O139

県央家畜保健衛生所

池田 知美      後藤 裕克  
井澤 清        吉田 昌司

## 緒言

病原性大腸菌による豚大腸菌症や浮腫病は、豚が死亡するだけでなく、回復しても発育遅延などによる被害が大きく、養豚における重要な疾病である。

2016年5月に開催された日本豚病研究会研究集会で、1991年から2014年にかけて下痢と浮腫病の豚から分離された大腸菌967株についての調査結果が報告された<sup>4)</sup>。この報告では、O群血清型はO139、O149、O116、OSB9で全体の約70%を占めており(図1)、この4つの主要血清型を遺伝学的系統別に5つに分類したうち、主要な3系統について薬剤感受性試験を実施(表1)。その結果、フルオロキノロン(以下、FQ)系を含む多剤耐性の血清型O116大腸菌による被害の増加が認められているが、本県でのO群血清型別の分離状況は不明であった。

平成28年2月、大腸菌症の豚から、多剤耐性を示す血清型O139の大腸菌が分離され、あわせて過去5年間に本県で分離された豚由来病原性大腸菌について、若干の検討を行ったので、その概要を報告する。

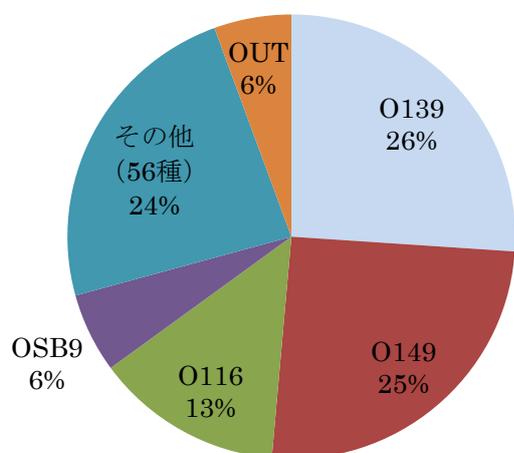


図1 国内豚群由来大腸菌のO群血清型  
(1991～2014年分離)

表1 主要な遺伝学的系統(I～III)における  
O群血清型及び薬剤耐性獲得状況

遺伝学的系統	O群血清型	耐性薬剤数(平均)	フルオロキノロン系耐性株(%)
I	O139	3.1	0
II	O149	4.4	13.3
III	O116 OSB9 O149	9.3	89.9

## 発生概要

発生農場は、繁殖 292 頭、哺乳 430 頭、育成 47 頭、肥育 2,241 頭の一貫経営農場である。呼吸器病対策を主眼に、APP、MHP、PCVのワクチン接種を実施していた。

平成 28 年 2 月 5 日、当該農場から、肥育豚舎内の隣接する豚房で、70～80 日齢で下痢、血便を呈する個体が複数発生し、3 日間で 3 頭が死亡、1 頭衰弱したとして病性鑑定依頼があった。検診当日 1 頭が死亡した豚房には 20 頭程度の同居豚がおり、うち 5 頭に血便を、数頭に水様性下痢を認めた。

## 病性鑑定 材料と方法

### 1 供試材料

死亡豚 1 頭と衰弱豚 1 頭について病性鑑定を実施した。

### 2 方法

#### (1) 病理学的検査

主要臓器を 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色して観察した。

#### (2) ウイルス学的検査

主要臓器からのウイルス分離を実施。小腸内容物について PED および TGE の特異遺伝子検索のための PCR と、A 群ロタウイルス抗原検索のための市販キットによる簡易検査を実施した。

#### (3) 細菌学的検査

血便を呈していることおよび管理獣医師が前日解剖した個体に増殖性腸炎様の所見があったとの稟告にもとづき、結腸および回腸粘膜を用いた *Brachyspira hyodysenteriae* と *Lawsonia intercellularis* の PCR を実施。主要臓器および腸内容物について、 $\beta$ -NAD 加羊血液寒天培地 (37°C、24～48 時間、好気および微好気)、DHL 寒天培地 (37°C、24～48 時間、好気)、1/2BJ 寒天培地および CW 寒天培地 (37°C、24～48 時間、嫌気) での分離培養を実施した。腸内容物については、*Clostridium perfringens* および大腸菌についての定量培養試験も実

施。分離菌は市販キット「アピ 20」により同定し、大腸菌について毒素因子および定着因子検査を PCR とスライド凝集反応で実施したのち、アンピシリン（A B P C）、セファゾリン（C E Z）、セフトキシム（C T X）、ストレプトマイシン（S M）、テトラサイクリン（T C）、コリスチン（C L）、ナリジクス酸（N A）、エンロフロキサシン（E R F X）、シプロフロキサシン（C P F X）、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤（S T）の 10 薬剤について一濃度ディスク法による薬剤感受性試験を実施した。

## 病性鑑定 結果

### 1 病理学的検査

剖検では、腸管全域における粘膜ヒダ先端の充うっ血や腸管全域における粘膜暗赤色化などが認められ、2 頭に共通した所見としては、腸間膜リンパ節の腫大が見られた。病理組織学的所見としては、2 頭ともに粘膜上皮細胞への細菌の付着・集簇、粘膜固有層の変性とうっ血などの所見が見られた（図 2）。

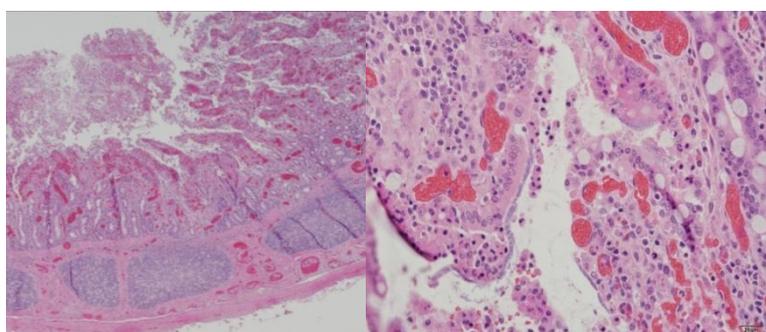


図 2 死亡豚の空腸（左：×40 右：×400）

### 2 ウイルス学的検査

ウイルス分離、P E D および T G E の P C R、A 群ロタウイルスの簡易検査はすべて陰性であった。

### 3 細菌学的検査

2 頭とも *B. hyodysenteriae* と *L. intercellularis* の P C R は陰性で、主要臓器、腸間膜リンパ節から細菌は分離されず、小腸内容物から  $\beta$  溶血性を示す大腸菌が分離された。定量培養では、どちらも豚大腸菌症を疑うとされる  $10^6$  CFU/g 以上の大腸菌<sup>1)</sup> が分離された（表 2）。2 頭の分離株の毒素因子は STb、LT、Stx2e が、定着因子は F18 が陽性であった（表 3）。これらの結果から、本症例を豚大腸菌症と診断した。

表 3 大腸菌の病原因子検査結果

	項目	検査法	結果 (2頭共通)
毒素 因子	STa	PCR	陰性
	STb	PCR	陽性
	LT	PCR	陽性
	Stx2e	PCR	陽性
定着 因子	F4	スライド凝集	陰性
	F5	スライド凝集	陰性
	F6	スライド凝集	陰性
	F18	PCR	陽性

表 2 小腸内容物の定量培養結果

対象菌種	菌数 (CFU/g)	
	No. 1 (死体)	No. 2 (搬送中死亡)
大腸菌	5.6 × 10 <sup>7</sup>	3.0 × 10 <sup>6</sup>
<i>Clostridium perfringens</i>	1.0 × 10 <sup>4</sup> 未満	

大腸菌分離株についての薬剤感受性試験の結果、感受性を示したのは、第三世代セフェムのセフォタキシムのみで、ほとんどの薬剤に耐性であり、FQ系の2剤についても耐性を示した(表4)。

表 4 薬剤感受性試験結果

分離株	ペニシリン系	セフェム系		アミノグリコシド系	テトラサイクリン系	ポリペプチド系	キノロン系	フルオロキノロン系		カルバマゼピム系
	ABPC	CEZ	CTX	SM	TC	CL	NA	ERFX	CPFEX	ST
No. 1	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R
No. 2	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R
健康豚由来大腸菌耐性率%	30.8	0	0	37.4	55.1	0	9.3	NT	1.9	28*

※TMP単剤

最下段は平成27年度JVARM調査における、健康豚由来大腸菌の耐性率を示しているが<sup>2)</sup>、第3世代を含むセフェム系への耐性株は確認されておらず、FQ系耐性株もわずかとなっており、こちらと比べても、今回分離株の耐性薬剤数の多さがうかがえる。

**分離株のO群血清型別**

今回分離された大腸菌は薬剤の系統を問わず、FQ系を含む多剤耐性を示していることから、本症例は国内の一部地域で近年発生が増加している、多剤耐性の血清型O116による大腸菌症<sup>4)</sup>である可能性が考えられた。そこで、免疫血清を用いた凝集反応によるO群血清型別試験を、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に依頼し実施したが、各個体からの分離株は 2 株とも 0139 であった。

### 県内過去分離株との比較

本県では、通常の病性鑑定時は 0 群血清型別を実施していないため、過去にも今回のような多剤耐性 0139 が原因となった症例があったのかどうか、また仮にあった場合には、今回分離株(以下、当該株)との疫学関連の有無について確認するため、過去 5 年間に分離された豚由来病原性大腸菌 5 症例 16 株(以下、県内分離株)について、0 群血清型別および病原因子検査を実施した。0 群血清型別試験のうち一部は、血清型に対応する遺伝子型「0g タイプ」<sup>1)</sup> について、0g 139 か 149 かまたはそれ以外であるかを判定、血清型を推定した。病原因子検査は P C R にて実施。同時に、一濃度ディスク法による薬剤感受性試験も実施し、結果を比較した。

#### 1 0 群血清型別

県内分離株のうち、0139 は 1 症例 3 株、0149 は 3 症例 9 株、その他は 2 症例 4 株であった。

#### 2 病原因子検査

県内分離株は、毒素因子については 0139 はすべて STa、Stx2e を、0149 はすべて STb、LT を保有。付着因子は、0139 はすべて F18、0149 はすべて F4 を保有していた。血清型が不明だった株は、保有する因子は株により異なっていた。

#### 3 血清型別・病原因子プロファイル

各株ごとの血清型別試験結果や病原因子の保有状況(病原因子プロファイル)を図 3 に示す。これらの結果を比較することで、株同士の疫学的な関連性の有無が推測できると考えられる。

プロファイルを比較すると、0149 のプロファイルはどの

症例	当該株	1 <sup>※</sup>			2	3				4 <sup>※</sup>				5 <sup>※</sup>			
株No.	株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
血清型	139	139	139	139	149	149	149	149	149	149	149	149	149	他	他	他	他
保有病原因子	STa																
	STb																
	LT																
	Stx2e																
	F18																
	F4																

(※0 群血清型に対応する遺伝子型 0g タイプ判定による推定血清型)

図 3 当該株と県内分離株の血清型と病原因子プロファイル(保有する因子のセルに着色)

症例でも同一だが、0139 は症例ごとに異なることが判明。このことから、当該株と県内分離株との疫学的関連性は低いと考えられる。

#### 4 薬剤感受性試験

感受性試験を実施し、結果は図4のとおりであった。

県内分離株中、0139 は1症例3株のみであるが、耐性薬剤数は少なく、FQ系にも感受性を示した。多剤耐性かつFQ耐性を示した株が3株あったが、0gタイプは139でも149でもないため血清型は推定できなかった。これらの結果から、県内分離株の中には、当該株のような多剤耐性の0139はないことが判明した。

		1※			2	3				4※				5※			
症例	当該株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
株No.	株	139	139	139	149	149	149	149	149	149	149	149	149	他	他	他	他
血清型		139	139	139	149	149	149	149	149	149	149	149	149	他	他	他	他
薬剤名	ABPC	感受性															
	CEZ	感受性															
	CTX	感受性															
	SM	感受性															
	TC	感受性															
	CL	感受性															
	NA	感受性															
	ERFX	感受性															
	CPFx	感受性															
	SXT	感受性															

(※0群血清型に対応する遺伝子型0gタイプ判定による推定血清型)

図4 当該株と県内分離株の血清型と薬剤感受性試験結果

#### まとめおよび考察

血便や下痢を呈した大腸菌症の豚から大腸菌が分離された。分離された株はFQ系耐性を含む多剤耐性菌であったため、0116による大腸菌症を疑い、0群血清型別試験を実施したが、0139であった。過去5年分の豚由来病原性大腸菌について、0群血清型別・病原因子プロファイル・薬剤感受性試験を実施したところ、当該株と同一の性質を示すものはなかった。

耐性菌の持つ薬剤耐性機構は、突然変異による自然発生的なもの、耐性機構に関与する環状プラスミドが媒介するものがある。βラクタム系やテトラサイクリン系など多くの薬剤に対する耐性はプ

ラスミドにより媒介される。これに対し、細菌の染色体上にある薬剤の作用点（DNAジャイレースやトポイソメラーゼⅣのキノロン耐性決定領域）における変異による結合阻害、というのがFQ系薬剤に対する耐性機構で、この変異はとても低い確率とはいえ、一定割合、自然に発生する<sup>3)</sup>。

プラスミド媒介性の耐性菌の場合、抗菌剤の使用により選択圧がかかると、プラスミドをもった耐性菌のみ増殖するが、薬剤の使用を中止すると、選択圧がなくなり、プラスミドの脱落などにより耐性機構が失われ、感受性菌が優位に増殖する。

対するFQ系耐性菌は、選択圧がかかると、染色体が変異して薬が結合できなくなった耐性菌だけが増殖する。この変異は、FQ耐性菌が増殖することにより子孫株に受け継がれ、プラスミドのように脱落することなく、選択圧がなくなっても耐性機構が残存する。このためFQ系薬剤への耐性は、一度獲得すると簡単には消えないと考えられる（図5）。

今回の発生農場では、呼吸器病発生に苦慮しており、本症例の発生直前からはFQ系薬剤ノルフロキサシンを飼料添加していた。このように、疾病発生が増加したため抗菌剤を多用する、あるいは第二次選択薬であるFQ系薬剤を治療初期から使

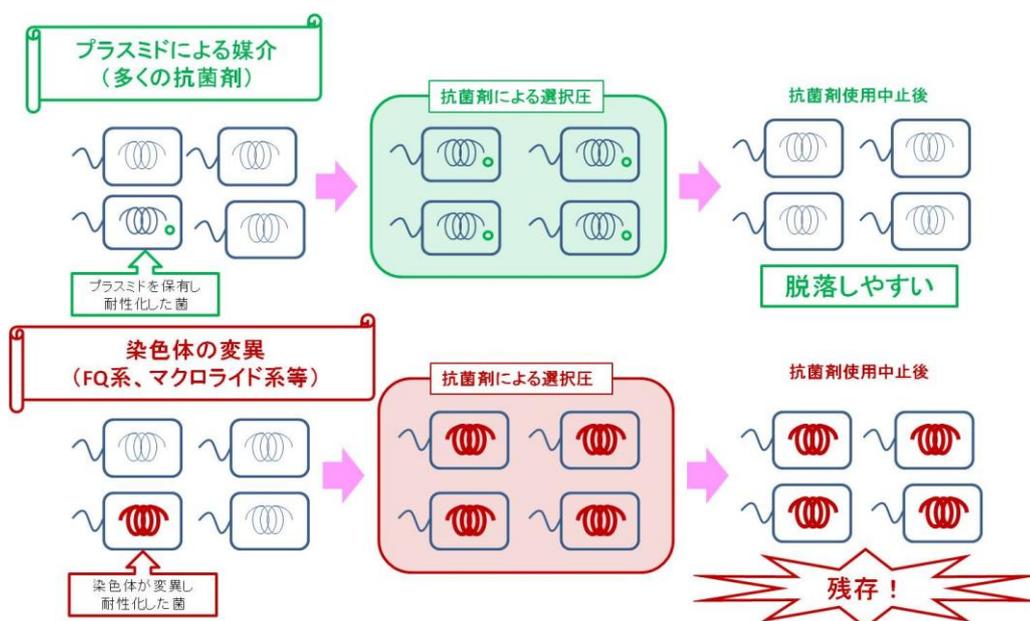


図5 耐性菌の出現と抗菌剤

用する等により、農場内で継続して選択圧がかかると、分離頻度が高いにもかかわらず、これまでにFQ系への耐性が確認されていなかった0139でもFQ系への耐性を獲得しうると考えられる。

これを防ぐには、飼養環境を整えて家畜の健康を維持することや、疾病発生時、治療初期には第一次選択薬など適切な薬剤を使う、また、原因菌を特定して薬剤感受性試験を実施する、などにより、必要最低限の使用にとどめる、いわゆる「抗菌剤の慎重使用」を徹底することが重要と考える。

謝辞：大腸菌のO群血清型別を実施していただいた、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 細菌・寄生虫研究領域 楠本正博主任研究員に深謝いたします。

## 引用文献

- 1) Atsushi Iguchi et al. : J Clin Microbiol、53(8)、2427-2432(2015)
- 2) 動物医薬品検査所 平成27年度家畜由来細菌の抗菌性物質感受性実態調査結果  
<http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/pdf/h27cyousakekkagaiyou.pdf>
- 3) 動物用抗菌剤研究会：最新データ 動物用抗菌剤マニュアル（第2版）、58、株式会社インターズー（2013）
- 4) 楠本正博ら：日本豚病研究会報、68、24-28（2016）