

5 県内で分離された豚由来大腸菌の性状検査及び分子疫学的解析

県中央家畜保健衛生所

赤間俊輔 齋藤俊哉 芝田周平

はじめに

病原性大腸菌は、ある特定の毒素や定着因子等の病原因子を保有する大腸菌で、通常は大腸の腸内細菌叢の一部を形成しているが、ストレスや腸内環境の悪化などが誘因となり疾病をひき起こす。

豚では、主に哺乳から離乳の時期に、豚大腸菌症(下痢)、浮腫病(神経症状等)、敗血症等を引き起こし、高い死亡率を示すため、養豚農家に甚大な経済的損失を与える。

豚における大腸菌感染症は、豚大腸菌症、浮腫病を中心に全国的に報告されており、本県においても、多くの農場において発生が確認されているが、再発農場も多数認められ、農場の慢性疾病として対策に苦慮している現状がある。

そこで今回、対策の一助とするため、過去に病性鑑定で分離された豚由来大腸菌を用いて、性状検査及び分子疫学解析を実施し、本県分離株の特徴や傾向の解明を試みた。

併せて、近年その増加が問題となり、今回の調査においても多数認められたフルオロキノロン耐性株について、その耐性獲得機序の解明を試みたので、その概要を報告する。

材料と方法

材料は、2000年から2014年に、病性鑑定等で分離された豚由来大腸菌株93株(延べ27戸)を供した(一部の検査は、株を選出し実施)。

O血清型別：

スライド凝集反応により実施した。

病原遺伝子検査：

PCR法による、毒素遺伝子(LT, STa, STb, Stx2e)及び定着因子遺伝子(F4, F5, F6, F18, F41, eae)検査を実施した。なお、DNAテンプレートはボイル法により作成し、酵素はRED Taq® ReadyMix PCR Reaction Mix (SIGMA-ALDRICH)を用いた。プライマー及びPCRサイクル等の反応条件は Stacy-Phipps Sら¹⁾、八柳ら²⁾、Donghyok Kら³⁾、Zhang Wら⁴⁾、Musangu Ngelekaら⁵⁾に従った。

パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)：

株間の疫学的な関連性の調査のため、O血清型別にて、同一O血清型であることが確認された12株について実施した。なお、制限酵素はXba (タカラバイオ)、機器はCHEF Mapper(Bio Rad)を用いて実施した。

薬剤感受性試験：

各農場から代表的な株、1-2株(計30株)を選出し、一濃度ディスク法にて実施した。結果は、農場の薬剤耐性菌モニタリング事業であるJVARMの成績と比較検討した。なお、薬剤は、JVARMで調査対象とされている、オキシテトラサイクリン(OTC)、ストレプトマイシン(SM)、アンピシリン(ABPC)、セファゾリン(CEZ)、ST合剤(ST)、クロラムフェニコール(CP)、カナマイシン(KM)、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPFX)、ゲンタマイシン(GM)、セフォタキシム(CTX)、コリスチン(CL)の12薬剤を用いた。

フルオロキノロン耐性獲得機序の調査：

薬剤感受性試験において CPMX に耐性もしくは中間(やや感受性)を示した大腸菌 15 株を材料として、細菌染色体上のキノロン耐性決定領域(QRDR: *gyrA*, *parC*)の塩基配列解析及び PCR 法によるプラスミド伝達性キノロン耐性因子(PMQR)関連遺伝子(*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA*, *oqxAB*, *aac(6')-Ib-cr*)の検索を実施した。

なお、PMQR 関連遺伝子検査において、DNA テンプレートはボイル法により作成し、酵素は RED Taq® ReadyMix PCR Reaction Mix (SIGMA-ALDRICH)を用いた。プライマー及び PCR サイクル等反応条件は Xiang ら⁶⁾に従った。

結果

○血清型別及び病原遺伝子検査：

○血清型及び保有する病原遺伝子は、分離株の由来病態毎に傾向が認められた。豚大腸菌症由来株は、O149(LT, STb, F4 保有)が 5 戸、O116(LT, STa, STb, Stx2e, F18 保有)が 3 戸、その他、O132、O121 等(LT, ST を共通して保有)が各 1 戸(計 6 戸)から分離された。浮腫病由来株は、O139(Stx2e, F18, AIDA- 保有)が 4 戸から分離された。敗血症等由来株は、○血清型に傾向を認めず、病原遺伝子は保有していなかった。

表 1 由来病態毎の○血清型及び病原遺伝子豚大腸菌症由来株

○血清型	病原遺伝子	分離戸数
O149	LT、STb、F4	5
O116	LT、STa、STb、Stx2e、F18	3
O132、他	LT、ST 等	各 1(計 6)

浮腫病由来株

○血清型	病原遺伝子	分離戸数
O139	Stx2e、F18、AIDA-	4

敗血症等由来株

○血清型	病原遺伝子	分離戸数
O8、不明他	なし	各 1(計 8)

PFGE：

浮腫病由来で同一時期に同一地域で分離された 2 農場の分離株は、泳動パターンが完全に一致し、疫学的な関連性が認められたが、その他の株については、疫学的な関連は認められなかった。

薬剤感受性試験：

薬剤毎の耐性率は、OTC：87%、SM、ABPC：63%、ST：47%、CEZ、CP：43%、KM：40%、NA：33%、CPFX：17%、GM：13%、CTX：10%、CL：3%であり、いずれの薬剤についても JVARM より高い耐性率を示した(図 1)。

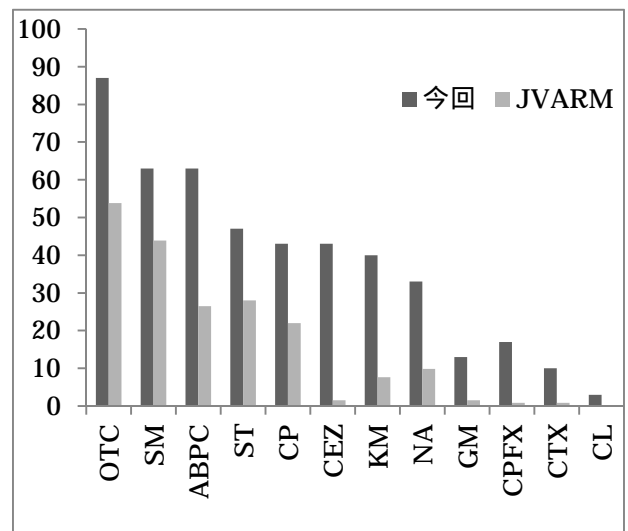


図 1 薬剤感受性試験結果

また、2 剤以上の多剤耐性率は 80% (30 株中 24 株)で、最大 10 薬剤に対する多剤耐性株が確認された(表 2)。

表 2 耐性薬剤数及び該当株数

耐性薬剤数	株数
10	1
9	2
8	4
7	3
6	2
5	3
4	4
3	4
2	1
1	2
0	4

フルオロキノロン耐性獲得機序の調査：

QRDR の塩基配列解析結果

細菌染色体上の DNA ジャイレースやトポイソメラーゼ に変異が生じるとキノロンが作用しにくくなり、細菌は耐性化する⁷⁾。なかでも、キノロン耐性と深く関与する部位が QRDR であり、大腸菌の場合、QRDR 変異が 2 箇所以上蓄積するとフルオロキノロン耐性になるとされる⁸⁾。今回の結果では、15 株中 14 株が 2 箇所以上の QRDR 変異が認められた(表 3)。

表 3 QRDR 変異箇所及び該当株数

QRDR 変異箇所	株数
0	1
1	0
2	5
3	4
4	5

PMQR 関連遺伝子検索結果

QRDR 変異の認められなかった 1 株を含む、計 3 株から *oqxAB* の遺伝子が検出された。その他の PMQR 関連遺伝子(*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA*, *aac(6')-Ib-cr*)はいずれも検出されなかった。

まとめ及び考察

O 血清型別及び病原遺伝子検査の結果、県内には O149、O139、O116 を中心に、様々な病原遺伝子保有パターンを示す多数の O 血清型の病原性大腸菌が浸潤していることが判明した。O149、O139 は、国内外含め多数分離されている古典的な株である⁹⁾が、O116 は、近年関東地方を中心に分離されるようになった株で、豚大腸菌症由来でありながら、同時に浮腫病に関連する Stx2e を保有していた。また、全国的にも、敗血症を起こす株や OSB9 大腸菌のような従来と異なる特徴の株の報告が増加しており、注意が必要と考えられた。

薬剤感受性試験の結果では、いずれの薬剤についても JVARM の成績より、高い耐性率及び多剤耐性率を示した。その原因の一つとして、JVARM は健康豚の糞便由来株を対象としているが、今回の調査は病性鑑定由来株を対象としていることが考えられる。病性鑑定に供される豚は、抗生物質による治療を受けている場合が多く、その豚から分離される菌株については、使用した薬剤の選択圧を受けている可能性が高いと考えられた。

また、家畜衛生分野だけでなく公衆衛生分野でも重要な薬剤と位置付けられる¹⁰⁾ フルオロキノロン(CPFX 等)や、第三世代セフェム(CTX 等)に対する耐性菌が多数確認されたことには注意が必要である。

フルオロキノロン耐性株の増加は、近年、公衆衛生分野、家畜衛生分野ともに問題となっている。

公衆衛生分野では、院内感染対策サーベイランス事業である JANIS で、ヒトの医療機関で分離される主要な細菌及び薬剤耐性について調査されている¹¹⁾。調査対象となっている腸内細菌科の細菌や黄色ブドウ球菌、腸球菌、レンサ球菌等、多くの菌種において耐性株が確認されているが、特に大腸菌は耐性化が顕著である。平成 25 年度の報告では、フルオロキノロン系薬剤のレボフロキサシン耐性を示す大腸菌株が、35.5%と非常に高率に分離されており、年々増加傾向にある¹¹⁾。

一方、家畜衛生分野では、菌種や報告により耐性率にばらつきがあるものの、大腸菌の他、カンピロバクター、アクチノバシラスブルニューモニエ、マイコプラズマ、マンヘミアヘモリティカ、豚丹毒菌、その他多くの菌種で耐性株の存在が報告されている¹²⁻¹⁶⁾。今回の調査では、近年の分離株に、耐性株が集中する傾向が認められており、公衆衛生分野同様、近年の急速な耐性化の可能性が示唆された。

フルオロキノロン耐性機序については、従来、細菌染色体上の QRDR の変異による耐性獲得もしくは薬剤の膜透過性の変化による耐性獲得(QRDR 以外の細菌染色体上の変異)の存在が報告されていたが、耐性遺伝子はいずれも細菌染色体上に存在し、菌から菌へ伝播することはないと考えられてきた^{7,17)}。しかし、1998 年の Martinez らのプラスミド性キノロン耐性遺伝子 *qnr* の報告¹⁸⁾以降、プラスミド伝達性キノロン耐性因子(PMQR)関連遺伝子が多数報告されるようになり、これまでに、PMQR

関連遺伝子として、*qnr*、*aac(6')-Ib-cr*、*qepA*、*oqxAB* が報告^{6,7)}されている。

今回、野外で分離された株のフルオロキノロン耐性株について、耐性獲得機序の解明を試み、その内 14 株は QRDR 変異を認め、QRDR 変異の認められなかった 1 株を含む計 3 株に PMQR を確認した。

PMQR 保有株は、耐性プラスミドの伝達によって、異なる菌種に対して、キノロン耐性が伝達する可能性がある⁷⁾とされる⁷⁾が、実際にどの程度 PMQR が関与した異菌種間でのキノロン耐性伝達が存在するのか、その伝達リスクは殆ど評価されていないため、今後、PMQR が確認された農場において、大腸菌以外の様々な菌種についても、PMQR 保有状況を調査することで PMQR の伝達リスクを評価していきたいと考えている。

今回の調査を通して、県内に多様な病原遺伝子、薬剤耐性を保有する病原性大腸菌が存在することが判明した。その中には、従来の典型的な株ばかりではなく、キノロン耐性株等、従来と異なる特徴の株も多数確認された。つまり、同じ大腸菌による感染症であっても、株によって症状や発症時期、有効薬剤が様々であることから、改めて対策の困難さが浮き彫りとなった。今後も分離株について、モニタリングを継続し、新規株、流行株の特徴や薬剤耐性状況の把握に努めることで、疾病対策の一助としていきたい。

謝辞

稿を終えるにあたり、O 血清型別、QRDR 塩基配列解析の実施に加え、数々の御指導・御助言をいただいた動物衛生研究所、細菌・寄生虫研究領域、楠本正博主任研究員に深謝する。

参考文献

- 1) Stacy-hipps,S.et al.
J.Clin.Microbiol.33(5):1054-1059(1995)
- 2) 八柳ら.
感染症学雑誌.第 69 卷.第 11 号(1995)
- 3) Donghyok K et al.
J.Vet.Diagn.Invest 11:146-151(1999)
- 4) Zhang W et al.
Vet Microbiol.20;123(1-3):145-52(2007)
- 5) Musangu Ngeleka et al.
J.Vet. Diagn.Invest15 :242-252(2003)
- 6) Xiang Chen et al .
Antimicrobial Agent and Chemotherapy
3423-3427(2012)
- 7) 嵯峨知生.臨床と微生物.vol40 No.3 219-
223(2013)
- 8) 動物医薬品検査所.薬剤耐性菌についての
Q&A 第二版 p11
- 9) Disease of Swine Tenth Edition p724
- 10) 食品安全委員会.家畜等への抗菌性物質の
使用により選択される薬剤耐性菌の食品
健康影響に関する評価指針
- 11) JANIS ホームページ.院内感染サーベイラ
ンス検査部門 2013 年 1 月～12 月年報
- 12) 動物医薬品検査所.平成 25 年度家畜由来細
菌の抗菌性物質感受性実態調査結果
- 13) 小池ら.日獣会誌.64:45-49 (2011)
- 14) 守岡ら.日獣会誌.59:815-819(2006)
- 15) 勝田賢.日本家畜臨床感染症研究会誌
5 卷 2 号(2010)
- 16) 宮尾ら.日獣会誌.59:409-415 (2006)
- 17) 平井敬二.日本化学療法学会雑誌.vol.53
No.6 349-356(2005)
- 18) Martinez et al.
Lancet. 14;351(9105):797-9(1998)