

資料

国内における新たな多剤耐性病原性大腸菌系統の出現

楠本 正博、岩田 剛敏、秋庭 正人

(国立研究開発法人 農業・産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門)

Kusumoto, M., Iwata, T. and Akiba, M. (2016). Emergence of a multidrug-resistant pathogenic *Escherichia coli* lineage in diseased swine in Japan*Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.* 68, 24-28.

キーワード：病原性大腸菌、多剤耐性、フルオロキノロン耐性、O116、OSB9

はじめに

毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*; ETEC) および志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*; STEC) は、豚の下痢および浮腫病の原因となる重要な病原体である^{6,9)}。豚由来ETECは、易熱性エンテロトキシン (LT)、耐熱性エンテロトキシン (STa および STb)、腸管凝集性大腸菌耐熱性エンテロトキシン (EAST1) のうちいずれかまたは複数の毒素を産生する。また、豚由来 STEC は志賀毒素のバリエーションである Stx2e を産生し、一部の菌株は Stx2e およびエンテロトキシンの両方を産生する^{2,5)}。定着因子として、豚由来 ETEC および STEC は一般に線毛性の F4(K88)、F5(K99)、F6(987P)、F18、F41などを保有する^{2,5)}。これらの病原因子はファージ (プロファージ) やプラスミドなどの可動性遺伝因子上にコードされており^{1,12)}、このことが豚由来病原性大腸菌における病原因子の拡散や多様化を促進していると考えられる。

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^{5,6)}。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、豚病原性大腸菌の分離状況や性状の推移について不明な点が多い。そこで本稿では、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、O 群血清型、遺伝学的系統、病原因子保有状況、薬剤感受性などを調査した結果と、そこから見えてきた新しい多剤耐性病原性大腸菌系統について概説する。

1. 豚由来病原性大腸菌の O 群血清型

Statens Serum Institut 製の大腸菌 O 抗血清 (O1～O188) を用いた血清型別の結果、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%) が型別不能 (OUT) であった。主要な 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 (表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^{3,7,11)}、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の分離が多い点は我が国における大きな特徴と考えられる。

分離された主要 O 群血清型の時間的および地理的な分布については、著者らが引用文献10で報告している。すなわち、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、最近10年間で O116および OSB9の分離は増加傾向にあり、マイナーな O 群血清型 (O139、O149、O116、OSB9以外) の分離もその種類および頻度ともに増加している。また、O 群血清型の分布は地域によって異なり、たとえば O116の分離が最も多い地域があれば、これまでに O116や OSB9が分離されていない地域もある。これらのことは、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は2000年代の中頃から国内での浸潤を拡げ、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¹⁰⁾。

表 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

分離株の O 群血清型	分離株の数			合計 (%)
	下痢	浮腫病	その他	
O139	30	218	4	252 (26.1)
O149	243		2	245 (25.3)
O116	131			131 (13.5)
OSB9	52	4		56 (5.8)
O147	27			27 (2.8)
O141	9	10		19 (2.0)
O123	9	5		14 (1.4)
O138	14			14 (1.4)
O8	8	1	1	10 (1.0)
O2	2		7	9 (0.9)
O157	8		1	9 (0.9)
O121	4	4		8 (0.8)
O9	6		1	7 (0.7)
O45	7			7 (0.7)
O98	4	3		7 (0.7)
O103	6		1	7 (0.7)
O35	5			5 (0.5)
O56	5			5 (0.5)
O86	4	1		5 (0.5)
O15	4			4 (0.4)
O36	3		1	4 (0.4)
O50	3	1		4 (0.4)
O159	4			4 (0.4)
O4			3	3 (0.3)
O7	3			3 (0.3)
O20	2		1	3 (0.3)
O25	2		1	3 (0.3)
O26	1		2	3 (0.3)
O64	3			3 (0.3)
O112	3			3 (0.3)
O142		1	2	3 (0.3)
O164	3			3 (0.3)
O6		2		2 (0.2)
O28	1		1	2 (0.2)
O43	2			2 (0.2)
O51		1	1	2 (0.2)
O83		1	1	2 (0.2)
O132	1		1	2 (0.2)
O16	1			1 (0.1)
O29	1			1 (0.1)
O55		1		1 (0.1)
O72	1			1 (0.1)
O76			1	1 (0.1)
O78			1	1 (0.1)
O89			1	1 (0.1)
O108		1		1 (0.1)
O114	1			1 (0.1)
O115	1			1 (0.1)
O118	1			1 (0.1)
O120	1			1 (0.1)
O124	1			1 (0.1)
O127			1	1 (0.1)
O154			1	1 (0.1)
O163	1			1 (0.1)
O166			1	1 (0.1)
O169	1			1 (0.1)
O174			1	1 (0.1)
O177			1	1 (0.1)
O180	1			1 (0.1)
OSD10			1	1 (0.1)
OUT	40	4	9	54 (5.6)
合計	660	258	49	967 (100)

SB9, *S. boydii* 9 型; SD10, *S. dysenteriae* 10 型; UT, 型別不能

2. 遺伝学的系統

主要 O 群血清型 (O139, O149, O116, OSB9) の全 684 株は、Warwick 大学の大腸菌データベースを用いた multilocus sequence typing (MLST)¹⁴⁾ により 8 種類の sequence type (ST) に型別された (表 2)。そのうち ST1 と ST2290, ST100 と ST5125, ST410 と ST2273 については、それぞれの塩基配列が極めて近いことから同じ系統に属すると見なされる。したがって、MLST の結果から豚由来病原性大腸菌の主要 O 群血清型は 5 つの遺伝学的系統、すなわち、主に ST1 の O139 からなる系統 I、主に ST100 の O149 からなる系統 II、主に ST88 の O116 および OSB9 からなる系統 III、主に ST42 の O139 からなる系統 IV、ST410 と ST2273 の O149 からなる系統 V に分類される (表 2)。

PCR による病原因子プロファイリング¹³⁾ の結果、系統ごとに特徴的な病原因子を保有しており、系統 I は線毛性の定着因子として F18 を保有する STEC、系統 II は F4 を保有する ETEC、系統 IV は F18 を保有する ETEC、系統 V は F5 を保有する ETEC であった (表 2)。また、系統 III はほぼ全て (99.5%) の株が Stx2e およびエンテロトキシン両方の産生遺伝子を保有する特徴的な集団であるが、ほとんど (97.9%) の株が下痢の豚から分離されており、今後、本系統における両毒素と病原性との関連について詳細な検討が必要と考えられる。

3. 薬剤感受性

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、主要 O 群血清型 (全 684 株) についてディスク拡散法⁴⁾ を用いた薬剤感受性試験を行った。その結果、菌株数の多い主要 3 系統における耐性株 (試験した 21 剤のうち少なくとも 1 剤に耐性の株) の割合は系統 I で

表 2. 主要 O 群血清型の遺伝学的系統

遺伝学的 系統	O 群血清型		MLST		病原因子プロファイル					
	O 群	株数 (%)	ST	株数 (%)	毒素	株数 (%)	定着因子	株数 (%)		
I	O139	227 (100)	ST1	226 (99.6)	Stx2e	224 (98.7)	F18	220 (96.9)		
			ST2290	1 (0.4)	STb	10 (4.4)				
					EAST1	10 (4.4)				
					STa	8 (3.5)				
II	O149	241 (100)	ST100	240 (99.6)	LT	241 (100)	F4	239 (99.2)		
			ST5125	1 (0.4)	STb	241 (100)				
					EAST1	241 (100)				
					STa	84 (34.9)				
III	O116	131 (69.7)	ST88	188 (100)	Stx2e	187 (99.5)	F18	185 (98.4)		
	OSB9	56 (29.8)			LT	183 (97.3)				
	O149	1 (0.5)			STa	175 (93.1)				
					STb	127 (67.6)				
					EAST1	87 (46.3)				
IV	O139	25 (100)	ST42	25 (100)	LT	25 (100)	F18	25 (100)		
					STb	25 (100)				
					EAST1	25 (100)				
V	O149	3 (100)	ST410	2 (66.7)	STa	2 (66.7)	F5	3 (100)		
			ST2273	1 (33.3)	STb	2 (66.7)				
					LT	1 (33.3)				

*各系統の全数に対する割合

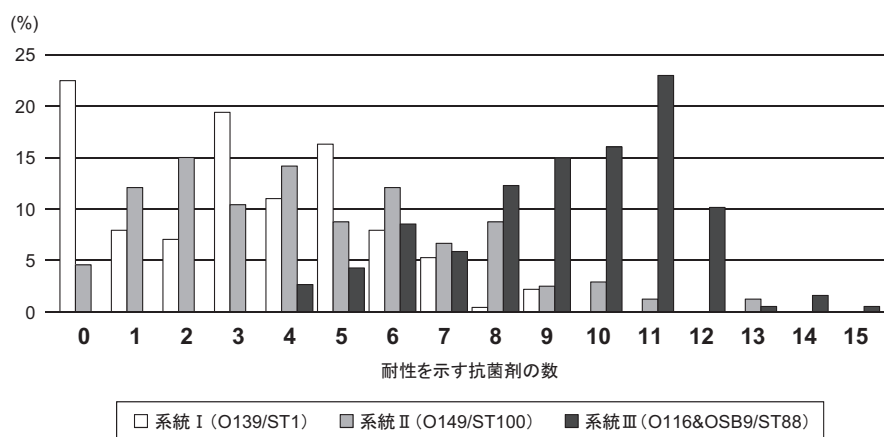


図 1. 主要 3 系統の多剤耐性レベルの比較

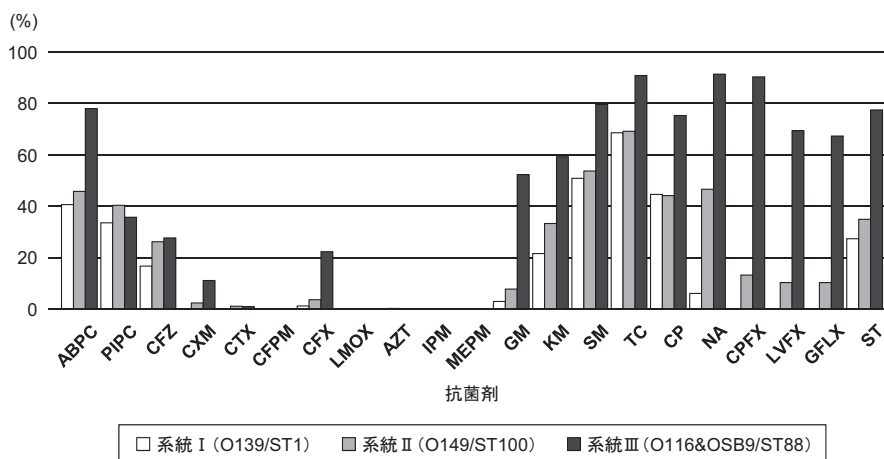


図 2. 主要 3 系統の各抗菌剤に対する耐性菌分布率の比較

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, セフトキシム; CFX, セフトキシチン; LMOX, モキシサラクタム; 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, ナリジクサ酸; 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

77.5% (176/227)、系統Ⅱで95.4% (230/241)、系統Ⅲで100% (188/188)であった。また、系統Ⅲは21剤のうち平均9.3剤に耐性(最多で15剤に耐性)であり、系統Ⅰ(平均3.1剤に耐性)および系統Ⅱ(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1)。

主要3系統の各抗菌剤に対する耐性菌分布率を図2に示す。キノロンおよびフルオロキノロン耐性菌の分布率はともに系統により大きく異なり、系統Ⅰの6.2%、系統Ⅱの46.5%、系統Ⅲの91.0%がナリジクス酸に耐性、また系統Ⅰにフルオロキノロン耐性菌は存在せず、系統Ⅱの13.3%および系統Ⅲの89.9%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率は系統Ⅲの大きな特徴である。他の抗菌剤に対する系統Ⅰと系統Ⅱの耐性菌分布率に大きな違いはみられないが、多剤耐性傾向が顕著な系統Ⅲでは、両系統に比べて多くの抗菌剤でより高い耐性菌分布率を示した(図2)。

Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System (JVARM)による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、「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自然である。しかし、系統Ⅲ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を行い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。

まとめ

国内では2000年代の中頃より、主に下痢の豚から[1] O116およびOSB9(まれにO149)、[2] ST88、[3] Stx2eおよびエンテロトキシン両毒素の産生遺伝子を保有、[4] F18線毛(定着因子)を保有、[5] 高レベルな多剤耐性、[6] 約90%がフルオロキノロン耐性などの特徴を持つ新たな系統の病原性大腸菌(系統Ⅲ)が分離されている。本系統は、毒素産生性や薬剤耐性に関する特徴から養豚産業へのリスクが高いと考えられる。また、本系統が分離される地域は現在のと

ころ限定的であるが、その分離頻度はすでに従来型の豚由来病原性大腸菌(系統ⅠおよびⅡ)に次ぐレベルに至っており、今後も浸潤状況を注視する必要がある。

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) Beutin L, et al. (2008) Evaluation of major types of Shiga toxin 2E-producing *Escherichia coli* bacteria present in food, pigs, and the environment as potential pathogens for humans. *Appl Environ Microbiol*, 74: 4806-4816.
- 2) Blanco M, et al. (1997) Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. *J Clin Microbiol*, 35: 2958-2963.
- 3) Chen X, et al. (2004) Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea in eastern China. *Vet Microbiol*, 103: 13-20.
- 4) Clinical and Laboratory Standards Institute (2014) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fourth informational supplement, Document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
- 5) Fairbrother JM, et al. (2005). *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev*, 6: 17-39.
- 6) Frydendahl K (2002) 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.
- 7) Garabal JI, et al. (1996) Serogroups of *Escherichia coli* isolated from piglets in Spain. *Vet Microbiol*, 48: 113-123.
- 8) Harada K, et al. (2010) Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicro-

- bial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan. J Biomed Biotechnol, 2010: 180682.
- 9) Holland RE (1990) Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. Clin Microbiol Rev, 3: 345-375.
- 10) Kusumoto M, 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.
- 11) Neef NA, et al. (1994) Development of large intestinal attaching and effacing lesions in pigs in association with the feeding of a particular diet. Infect Immun, 62: 4325-4332.
- 12) Shepard SM, et al. (2012) Genome sequences and phylogenetic analysis of K88- and F18-positive porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. J Bacteriol, 194: 395-405.
- 13) Vu-Khac H, et al. (2007) Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. Vet J, 174: 176-187.
- 14) Wirth T, et al. (2006) Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Mol Microbiol, 60: 1136-1151.