

## 原著論文

## 浮腫病由来志賀毒素産生大腸菌の病原遺伝子、薬剤感受性および薬剤耐性遺伝子

又吉正直<sup>1)</sup>、大城 聡<sup>2)</sup>、安里 仁<sup>3)</sup>、貝賀眞俊<sup>4)</sup>

(<sup>1)</sup>沖縄県八重山家畜保健衛生所、<sup>2)</sup>沖縄県畜産課、<sup>3)</sup>沖縄県北部家畜保健衛生所、<sup>4)</sup>沖縄県畜産研究センター)  
 Matayoshi, M., Ooshiro, S., Asato, H., and Kaiga, M. (2010). Virulence genes, drug susceptibility and resistance genes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from pigs with edema disease.  
*Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.* 56, 7-11.

キーワード：浮腫病、志賀毒素産生大腸菌、薬剤感受性、薬剤耐性遺伝子

## 1. はじめに

浮腫病は志賀毒素産生大腸菌 *Shiga toxin-producing Escherichia coli* (STEC) に属する特定の病原因子を保有する大腸菌が、豚の腸管内で異常増殖し、その産生する志賀毒素によって生じる疾病である。離乳後の発育良好な子豚に好発し、発病率は10～40%であるが、死亡率は50～90%と極めて損耗率の高いことで世界中の養豚産業で重要な問題となっている<sup>4,19)</sup>。浮腫病の発生には離乳ストレス、高蛋白質飼料給与、遺伝因子など種々の要因が複雑に関与している<sup>4,19)</sup>。浮腫病には有効なワクチンがなく、予防および治療の目的で抗菌剤が使用されているが、抗菌剤の過剰投与や不適正な使用は、浮腫病を誘発する可能性も示唆され<sup>20,26)</sup>、また耐性菌の出現が人の医療に及ぼす影響も懸念されている<sup>25)</sup>。沖縄県においては、1995年以前には浮腫病の発生は認められなかったが、1996年2月、南部地域の農場で初めて確認され、現在まで全県下で発生が繰り返されている。今回、これまで沖縄県内で分離された浮腫病由来 STEC について、病原遺伝子、薬剤感受性および薬剤耐性遺伝子について調べたので概要を報告する。

## 2. 材料および方法

供試菌株：1996年5月～2009年3月までの間に、14市町村18農場から病性鑑定の目的で搬入され、浮腫病と診断された豚（30～90日齢）27頭の腸管内容由来65株の STEC を供試した。

Stx2e 遺伝子の検出：既報<sup>12)</sup>に基づき PCR により行った。

*fedA* 遺伝子の検出：F18ab 線毛をコードする *fedA* 遺伝

子は既報<sup>11)</sup>に基づき PCR により行った。

*aah* および *aidA* 遺伝子の検出：adhesin involved in diffuse adherence (AIDA) をコードする *aah* 遺伝子および *aidA* 遺伝子は既報<sup>23)</sup>に基づき PCR により行った。薬剤感受性試験：臨床検査標準委員会 (CLSI) の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準<sup>21)</sup>に基づき行った。使用薬剤はアンピシリン (ABPC)、ストレプトマイシン (SM)、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、オキシテトラサイクリン (OTC)、コリスチン (CL)、クロラムフェニコール (CP)、ホスホマイシン (FOM)、スルファメトキサゾール／トリメトプリム (ST) (以上 SN ディスク、日水製薬、東京) およびエンロフロキサシン (ERFX) (栄研化学、東京) の10薬剤を用いた。

薬剤耐性遺伝子の検出：薬剤耐性を示した25頭由来54株について、既報<sup>1,13)</sup>に基づき以下の薬剤耐性遺伝子の検出を PCR で行った。ABPC 耐性遺伝子：*bla*<sub>TEM</sub>、SM 耐性遺伝子：*strA*、*aadA*、OTC 耐性遺伝子：*tetA*、*tetB*、*tetC*、CP 耐性遺伝子：*catA1*、*cmlA*、ST 耐性遺伝子：*sul1*、*sul2*。

## 3. 成績

Stx2e 遺伝子の検出：Stx2e 遺伝子は65株すべての株で検出された。

*fedA* 遺伝子の検出：*fedA* 遺伝子は63株 (96.9%) で検出され、1頭由来2株は検出されなかった。

*aah*、*aidA* 遺伝子の検出：*aah* は65株すべての株で検出された。*aidA* は61株 (93.8%) から検出され、3頭由来4株は検出されなかった。

薬剤感受性試験：耐性を示した株数は、OTC53株 (81.5%)、SM35株 (53.8%)、CP27株 (41.5%)、ABPC 23株 (35.4%)、ST17株 (26.2%)、KM 9株 (13.8%) であった。薬剤耐性パターンは ABPC-SM-KM-OTC-

表1 浮腫病由来STECの薬剤耐性型

薬剤耐性型	株数 (%)	耐性遺伝子 (株数)
ABPC・SM・KM・OTC・CP・ST	9(13.8)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> ・ <i>strA</i> ・ <i>tetB</i> ・ <i>catA</i> ・ <i>sul2</i> (9)
ABPC・SM・OTC・CP・ST	5(7.7)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> ・ <i>strA</i> ・ <i>tetB</i> ・ <i>catA</i> ・ <i>sul2</i> (5)
ABPC・SM・OTC・CP	7(10.8)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> ・ <i>strA</i> ・ <i>tetB</i> ・ <i>catA</i> (4), <i>bla</i> <sub>TEM</sub> ・ <i>strA</i> ・ <i>aadA</i> ・ <i>tetB</i> ・ <i>catA</i> ・ <i>sul2</i> (3)
ABPC・SM・OTC	2(3.1)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> ・ <i>strA</i> ・ <i>tetA</i> ・ <i>tetB</i> (1), <i>bla</i> <sub>TEM</sub> ・ <i>strA</i> ・ <i>aadA</i> ・ <i>tetB</i> (1),
SM・OTC・CP	2(3.1)	<i>strA</i> ・ <i>aadA</i> ・ <i>tetB</i> ・ <i>catA</i> (1), <i>strA</i> ・ <i>tetB</i> ・ <i>catA</i> (1)
OTC・CP・ST	3(4.6)	<i>tetA</i> ・ <i>cmlA</i> (3)
SM・OTC	9(13.8)	<i>strA</i> ・ <i>tetB</i> (8), <i>aadA</i> ・ <i>tetB</i> (1)
OTC・CP	1(1.5)	<i>tetB</i> ・ <i>catA</i> (1)
SM	1(1.5)	<i>strA</i> (1)
OTC	15(23.1)	<i>tetA</i> (13), <i>tetB</i> (2)
感受性株	11(16.9)	

ABPC:アンピシリン, SM:ストレプトマイシン, KM:カナマイシン, OTC:オキシテトラサイクリン, CP:クロラムフェニコール, ST:スルファメキサゾール/トリメプリーム

CP-ST (9株)、ABPC-SM-OTC-CP-ST (5)、ABPC-SM-OTC-CP (8)、ABPC-SM-OTC (3)、SM-OTC-CP (1)、OTC-CP-ST (3)、SM-OTC (8) OTC-CP (1)、SM (1)、OTC (15) の10パターンに区分された。すべての薬剤に感受性を示したのは11株(16.9%)であった(表1)。一方、GM、CL、FOM および ERFX の4薬剤にはすべて感受性であった。

薬剤耐性遺伝子の検出：薬剤耐性遺伝子は以下のとおりであった。OTC耐性：*tetA* 18株(34.0%)、*tetB* 36株(55.4%)、*tetA* および *tetB* 2株、*tetC* は検出されなかった。SM耐性：*strA* 34株(97.1%)、*aadA* 1株(2.9%)、*strA* および *aadA* 5株(7.7%)。CP耐性：*catA1* 24株(88.9%)、*cmlA* 3株(11.1%)。ABPC耐性：*bla*<sub>TEM</sub> 23株(100%)。ST耐性：*sul2* 14株(82.4%)、*sul1* は検出されなかった。

#### 4. 考察

Stx2e は浮腫病の主要な病原因子の一つである<sup>3,15,20</sup>。Stx2e 遺伝子は65株すべての株から検出された。浮腫病由来 STEC の病原因子<sup>5,18</sup>の一つである小腸上皮細胞の定着に参与する F18ab 線毛をコードする *fedA* 遺伝子は63株(96.9%) が保有していた。Bertschinger ら<sup>4</sup>)は豚の腸管毒血症由来の血清型 O139の大腸菌から初めて *in vivo* で浮腫病の病原因子

である線毛 F107 (F18) を報告している。Imberechts ら<sup>11</sup>)は浮腫病由来大腸菌の28株中24株から *fedA* を検出し、病原因子としての重要性を示唆した。F18ab 線毛の主要なサブユニット遺伝子である *fedA* は染色体あるいはプラスミドに存在し<sup>27</sup>)、Imberechts らは F18ab 線毛をコードする2種類のプラスミドを報告<sup>11</sup>)している。

*aah* 遺伝子および *aidA* 遺伝子は、Diffusely adherent *E.coli* (DAEC) の外膜蛋白質 adhesin involved in diffuse adherence (AIDA) をコードする遺伝子である。DAEC は当初小児下痢由来株から初めて報告され<sup>2</sup>)、新たに病原性大腸菌の6番目のカテゴリーに位置づけられた<sup>22</sup>)。その後 *aah* 遺伝子および *aidA* は人由来 DAEC よりも豚の浮腫病や離乳後下痢由来 STEC に高率に存在することが報告されている<sup>7,23,29</sup>)。今回、*aah* はすべての株で検出され、*aidA* は3頭由来4株を除き61株(93.8%)で検出された。このことにより既報と同様に沖縄県での浮腫病由来株もまた高率に両遺伝子を保有することが明らかとなった。

薬剤感受性試験では6剤耐性の9株(13.8%)をはじめ、2剤以上の多剤耐性株が65株中38株(58.5%)を占めた。薬剤別ではOTC耐性53株(81.5%)が最も多く、続いてSM耐性35株(53.8%)であった。又吉ら<sup>16</sup>)の沖縄県内の豚由来腸管毒素原性大腸菌の薬

剤耐性調査でも OTC および SM は、それぞれ84.8% および81.0%の株で最小発育阻止濃度 (MIC) が $\geq 100\mu\text{g}/\text{ml}$ を示した。これは両薬剤とも全国的に1960年代から細菌性感染症対策の第一次選択薬として長期間使用されてきた経緯があり<sup>25)</sup>、今回の成績もこれが反映されたものと考えられた。CP 耐性は27株 (41.5%) に認められた。CP は広域スペクトルを有することから、動物用医薬品として畜産分野で広く使用されてきた。その後、CP は人に再生不良性貧血などの副作用を引き起こすことが明らかになり<sup>28)</sup>、国内では1998年に食用動物に対する使用が中止されている。Harada ら<sup>8)</sup>は病畜由来大腸菌では健康畜由来大腸菌に比べ、CP に対し高い耐性率が認められることを報告している。その原因として、フロルフェニコールやチアンフェニコールの使用により CP 耐性大腸菌が選択されたことを示唆している。本件も Harada らと同様に CP 耐性菌の選択があったものと考えられた。ABPC 耐性および ST 耐性は、それぞれ23株 (35.4%) および17株 (26.2%) であった。ST は ABPC、SM および OTC などの薬剤とともに豚の臨床現場で多用されてきており、選択圧を高めてきたためと推察された。ST は人の旅行者下痢の ETEC 感染症の治療薬としてドキシサイクリンとともに推奨されている薬剤であり、近年、新生子牛や豚の ETEC 感染症やそれに伴う敗血症の治療薬としても多用されて、その耐性問題が指摘されてきている<sup>10)</sup>。Harada ら<sup>8)</sup>は2001年から2004年において全国の家畜保健衛生所の豚大腸菌症由来118株の薬剤感受性調査を行っているが、その成績では OTC、ジヒドロストレプトマイシン、ABPC、CP、トリメトプリムの順で耐性株が検出されているが、今回もほぼ同様の成績となった。一方、GM、CL、FOM および ERFX の 4 薬剤には供試菌株すべてが感受性を示した。この理由として、4 薬剤とも CL や ERFX のように耐性を獲得しにくい薬剤や GM や FOM など臨床現場でほとんど使用されていないことが考えられた。このうち FOM は人の腸管出血性大腸菌感染症の治療薬として一般的に使用されている薬剤であり<sup>24)</sup>、FOM 耐性株の出現は公衆衛生学的にも人の医療への影響が懸念されるが、今回耐性株は検出されなかった。Uemura ら<sup>26)</sup>の浮腫病由来 STEC57株の28薬剤の寒天平板希釈法による薬剤感受性調査では、供試菌の90%の株が FOM に対して MIC は $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を示し、FOM には低感受性であった。今回、FOM に対して高い感受性が認められたのは、農場での使用歴がほとん

どなく、そのことが反映されたものと推察された。耐性型は 6 剤耐性型の 9 株 (13.8%) をはじめに10耐性型に区分され、2 剤以上の多剤耐性が38株 (58.5%) を占めた。6 剤耐性を示した 9 株はすべて同一農場由来であるが、当該農場は2008年の分離株では 2 剤耐性株であったが、2009年分離株は 6 剤耐性であった。このことは、2008年に浮腫病対策として感受性のあった薬剤を使用した結果、薬剤選択圧による耐性株の誘導をもたらしたことが推察された。薬剤耐性型においては同一個体由来でも 6 農場で同一個体から複数の薬剤耐性型を示す株が分離された。このことは病性鑑定において薬剤感受性検査を行う場合は、同一個体由来の複数菌株を供試することが望ましいことを示唆している。

今回の成績では、OTC 耐性菌のうち *tetA* が18株 (34.0%)、*tetB* が36株 (55.5%)、*tetA* および *tetB* は 2 株 (3.1%) で認められたが、*tetC* は検出されず、既報<sup>14)</sup>の成績を裏付ける成績であった。県内で分離された動物由来 *Salmonella* Weltevreden の薬剤耐性遺伝子調査<sup>17)</sup>でも OTC 耐性株については、23株中18株 (78.3%) が *tetB* を保有し、6 株が *tetA* 保有株、2 株が *tetA* および *tetB* 保有株であった。これらの成績からこの両遺伝子が県内の浮腫病由来株や *Salmonella* に広く保有され、OTC の主要な耐性遺伝子であることが示唆された。SM 耐性は *strA* 34株 (97.1%)、*strA* および *aadA* 5 株 (14.3%) であった。既報<sup>17)</sup>でも SM 耐性では *strA* は *aadA* よりも高頻度に検出されており、SM の主要な耐性遺伝子であることを裏付ける結果となった。また CP 耐性のうち *catA1* が24株 (88.9%)、*cmlA* が 3 株 (11.1%) から検出された。国内の病畜由来大腸菌の CP 耐性遺伝子調査<sup>9)</sup>では、牛由来株は *catI* が90.0%の高率で認められ、豚由来株は *catI* (54.9%) および *cmlA* (39.2%) が多く検出されている。今回の調査では牛由来株と同様の成績を示した。ABPC 耐性は *bla*<sub>TEM</sub> 保有が23株 (100%) であった。さらに ABPC 耐性 *bla*<sub>TEM</sub> はこれまででも子牛の下痢症由来株<sup>6)</sup>や豚の腸管毒素原性大腸菌<sup>16)</sup>から高頻度に検出されている。今回の成績から県内の病原性大腸菌の ABPC 耐性の主要な耐性遺伝子は *bla*<sub>TEM</sub> であることが明らかとなった。

近年、人医療の薬剤耐性菌の増加傾向と消費者の安全・安心指向の高揚により、食用動物の生産現場では抗菌剤の適正かつ慎重な使用が望まれている。特に国内の動物用抗菌剤の54%が豚用に使用されている<sup>25)</sup>。

また、浮腫病は全国的にも大規模な集団発生や再発生が繰り返されていることから、抗菌剤の使用は不可避であり、使用にあたっては事前の分離菌株の耐性調査を行うことは極めて重要であると考えられる。

## 5. 要約

1996年～2009年にかけて、沖縄県全域の14市町村、18農場、27頭の浮腫病由来の志賀毒素産生性大腸菌65株について、病原遺伝子、薬剤感受性および薬剤耐性遺伝子について調査した。病原遺伝子の検出状況は以下のとおりであった。Stx2e 遺伝子：65株 (100%)、*fedA* 遺伝子：63株 (96.9%)、*aah*：65株 (100%)、*aidA*：61株 (93.8%)。薬剤耐性では6剤耐性 (ABPC-SM-KM-OTC-CP-ST) の9株 (13.8%) をはじめ、54株 (83.1%) が供試薬剤のいずれかに耐性であった。11株 (16.9%) はすべての薬剤に感受性を示した。薬剤耐性遺伝子の検出状況は以下のとおりであった。OTC耐性：*tetA* 18株 (34.0%)、*tetB* 37株 (69.8%)、*tetA* および *tetB* 2株 (3.1%)、*tetC* は検出されなかった。SM耐性：*strA* 35株 (100%)、*strA* および *aadA* 5株 (14.3%)。CP耐性：*catA1* 24株 (88.9%)、*cmlA* 3株 (11.1%)。ABPC耐性：*bla*<sub>TEM</sub> 23株 (100%)。ST耐性：*sul2* 14株 (82.4%)、*sul1* は検出されなかった。

## 6. 引用文献

- 1) Aarestrup FM, et al. (2003) Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries. J Antimicrob Chemother, 52: 715-718.
- 2) Benz I, Schmidt MA. (1989) Cloning and expression of an adhesion (AIDA-1) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun, 57: 1506-1511.
- 3) Bertschinger HU, et al. (1990) Adhesive fimbriae produced in vivo by *Escherichia coli* O139: K12(B): H1 associated with enterotoxaemia in pigs. Vet Microbiol, 25: 267-281.
- 4) Bertschinger HU, Gyles CL. (1994) Oedema disease of pigs. In: Gyles CL ed. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. p193-214, CAB International, Wallingford, UK.
- 5) Bosworth BT, et al. (1998) Differentiation of F18ab<sup>+</sup> from F18ac<sup>+</sup> *Escherichia coli* by single-

strand conformational polymorphism analysis of the major fimbrial subunit gene (*fedA*). Clin Diagn Lab Immunol, 5: 299-302.

- 6) Bradford PA, et al. (1999) Characterization of expanded-spectrum cephalosporin resistance in *E. coli* isolates associated with bovine calf diarrhoeal disease. J Antimicrob Chemother, 44: 607-610.
- 7) Ha S, et al. (2003) Prevalence of a gene encoding adhesin in diffuse adherence among *Escherichia coli* isolates in pigs with postweaning diarrhea or edema disease. J Vet Diagn Invest, 15: 378-381.
- 8) Harada K, et al. (2005) Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs in Japan. J Vet Med Sci, 67: 999-1003.
- 9) Harada K, et al. (2006) Role in coresistance in the development of resistance to chloramphenicol in *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs. Am J Vet Res, 67: 230-235.
- 10) Hariharan H, et al. (2004) Antibiotic resistance among enterotoxigenic *Escherichia coli* from piglets and calves with diarrhea. Can Vet J, 45: 605-606.
- 11) Imberechts H, et al. (1992) Characterization of F107 fimbriae of *Escherichia coli* 107/86, which causes edema disease in pigs, and nucleotide sequence of the F107 major fimbrial subunit gene, *fedA*. Infect Immun, 60: 1963-1971.
- 12) Johnson WM, et al. (1990) Differentiation of genes coding for *Escherichia coli* verotoxin 2 and the verotoxin associated with porcine edema disease (VTe) by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol, 28: 2351-2353.
- 13) Keyes K, et al. (2000) Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. J Antimicrob Chemother, 44: 421-424.
- 14) Lanz R, et al. (2003) Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different species in Switzerland. Vet Microbiol, 91: 73-84.
- 15) Marques LRM, et al. (1987) *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. FEMS Microbiol

- Lett, 44: 33-38.
- 16) 又吉正直、中澤宗生。(2001) 子豚由来腸管毒素原性大腸菌の薬剤耐性、 $\beta$ -lactamase 産生性、耐性遺伝子、R プラスミドおよびプラスミドプロファイル。日獣会誌、54: 913-919.
  - 17) 又吉正直、久高 潤。(2010) 1992年~2007年に沖縄県の人、動物および環境から分離された *Salmonella* Weltevreden の薬剤感受性と耐性遺伝子。感染症誌、84: 24-27.
  - 18) Nagy B, et al. (1997) Biological Relationship between F18ab and F18ac fimbriae of enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs with oedema disease or diarrhea. Microb Pahtog. 22: 1-11.
  - 19) 中澤宗生、末吉益雄。(1996) ブタの浮腫病。臨床と微生物 (臨時増刊)、23: 843-849.
  - 20) 中澤宗生。(1999) 大腸菌病。p333-335、豚病学 (第4版)、近代出版、東京。
  - 21) National Committee for Clinical Laboratory Standards (2007) Performance stand for antimicrobial disk susceptibility testing. 17 th ed, NCCLS M100-S17, Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
  - 22) Nataro JP, Steiner T. (2002) Enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. In: Donnenberg MS ed *Escherichia coli* virulence mechanisms of a versatile pathogen. p189-207, Academic Press, USA.
  - 23) Niewerth U, et al. (2001) The AIDA autotransporter system is associated with F18 and Stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. Clin Diagn Lab Immunol, 8: 143-149.
  - 24) Takeda T, et al. (1998) Early use of fosfomycin for shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection reduces the risk of hemolytic-uremic syndrome. *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-producing *E.coli* strains, Kaper JB et al eds, p385-387, ASM Press, Washington DC.
  - 25) 田村豊。(2003) 動物用抗菌剤の使用動向と薬剤耐性菌対策。日獣会誌、56: 685-691.
  - 26) Uemura R, et al. (2003) Antimicrobial susceptibilities of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from pigs with edema disease in Japan. Microbiol Immunol, 47: 57-61.
  - 27) Wittig W, et al. (1994) Expression and plasmid transfer of genes coding for the fimbrial antigen F107 in porcine *Escherichia coli*, strains Zbl Bakt 281: 130-139.
  - 28) Yunis AA. (1989) Chloramphenicol toxicity: 25 years of research. Am J Med, 87: 44N-48N.
  - 29) Zhao L, et al. (2009) Analysis of the AIDA-I gene sequence and prevalence in *Escherichia coli* isolates from pigs with post-weaning diarrhoea and oedema disease. Vet J, 180: 124-129.