

# 15 県下で分離された豚由来 Stx2e 産生大腸菌の血清型と性状

中央家畜保健衛生所  
下條 憲吾  
県南家畜保健衛生所  
高山 裕介

浮腫病の原因菌である Stx2e 産生大腸菌は、血清型 O139 および O141 が主流とされているが<sup>7)</sup>、近年、国内において多剤耐性でエンテロトキシンも保有する血清型 O116 の分離が報告されている<sup>1、3、4、8)</sup>。そこで、県下で分離された Stx2e 保有大腸菌の血清型および性状について調査し、若干の知見を得たので報告する。

## 1 材料および方法

平成 20 年度以降、浮腫病(疑い 1 例含む)と診断された 137 症例のうち、菌株が保存されていた Stx2e 保有大腸菌 121 株(119 症例)を材料とした。全株について、ゲル内沈降法による血清型別試験を実施し、性状調査として、Stx2e 以外の毒素(LT、STa、STb)および定着因子(F4、F5、F6、F18、eae)の保有状況を PCR 法<sup>11)</sup>により確認するとともに、表 - 1 の 12 薬剤について一濃度ディスク法により薬剤感受性試験を実施した。血清型別試験で O116 と判定された株については、分子疫学的解析として、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)を実施し、バンドパターンの解析を行った。また、血液寒天培地上でムコイド状に発育する株がみられたことから、莢膜、若しくは多糖類の産生状況を確認するため、まず、Lee らの方法により String test を実施した<sup>5)</sup>。String test は羊血液寒天培地に一夜培養した菌株について、コロニーに 1 μl ディポーターブルエーゼを接し、そのまま引き上げ、1 cm 以上糸を引いた株を陽性とした。次に、分離地域、時期の異なる O116 および O139 各 4 株について、トリプティックソイブロー一夜培養菌液を初生雛腹腔内に 0.5ml 接種し、翌日、肝臓スタンプ標本を作製し Hiss 染色像を観察した。

表 - 1 薬剤感受性試験における供試薬剤

系統	薬剤名	略称	系統	薬剤名	略称
ペニシリン系	アンピシリン	ABPC	テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	OTC
	アモキシシリン	AMPC		ドキシサイクリン	DOXY
アミノグリコシド系	ストレプトマイシン	SM	ペプチド系	コリスチン	CL
	ゲンタマイシン	GM	サルファ剤合剤	ST合剤	ST
	カナマイシン	KM	ニューキノロン系	エンロフロキサシン	ERFX
	アブラマイシン	APM	セフェム系	セフトオフル	CTF

## 2 成績

血清型別試験では、O116 が 72 株 (59.5%)、O139 が 44 株 (36.4%) であり、この 2 血清型で 95%以上を占めた(表 - 2)。年次毎の分離率は、平成 20 年から 21 年は O139 が高く、平成 22 年以降は O116 が高い傾向が認められた(図 - 1)。毒素および定着因子の保有状況は、O116 は 72 株すべてが LT および STa を保有しており、STb も約 90%保有していた。一方、O139 は STb 保有率が約 20%あったものの、多くの株は Stx2e を単独で保有していた(表 - 3)。

表 - 2 血清型別分離株数および分離率

	O116	O139	OSB9	UT
分離株数	72	44	3	2
分離率 (%)	59.5	36.4	2.5	1.7

: Shigella boydii 9 型と同じ血清型  
型別不能

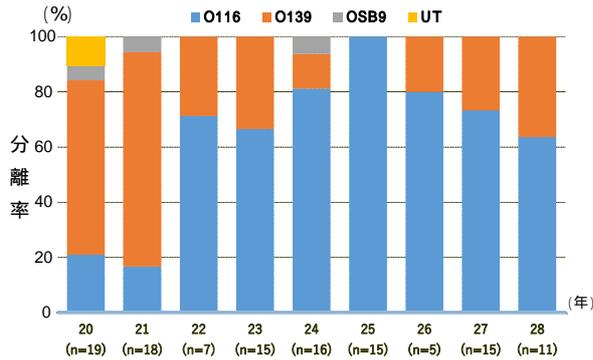


図 - 1 血清型別分離率の推移

表 - 3 毒素産生および定着因子保有状況

血清型 (株数)	株数 (%)							
	LT	STa	STb	F4	F5	F6	F18	eeae
O116 (72)	72 (100.0)	72 (100.0)	64 (88.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	70 (97.2)	0 (0.0)
O139 (44)	1 (2.3)	7 (15.9)	9 (20.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	42 (95.5)	0 (0.0)
OSB9 (3)	3 (100.0)	3 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (100.0)	0 (0.0)
UT (2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (50.0)	0 (0.0)
全体 (n=121)	76 (62.8)	82 (67.8)	73 (60.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	116 (95.9)	0 (0.0)

O116とその他の血清型について薬剤耐性率を比較したところ、O116は12薬剤中8薬剤で他の血清型より有意に耐性率が高く、特に、ERFXの耐性率は100%であった(図-2)。また、分離株数の多かったO116とO139について耐性薬剤数を比較したところ、O116は全株が3薬剤以上に耐性であり、平均耐性薬剤数は7.0薬剤であった。一方、O139は供試薬剤全てに感受性の株も8株みられ、平均耐性薬剤数は2.5薬剤であった(表-4)。次に、O116の薬剤耐性率の推移を2年毎に区切ると、SMでは平成20年から21年は耐性率が100%であったが、平成22年以降30%前後で推移していた。KM、APMおよびCLでは平成20年から21年には耐性株が認められなかったが、平成22年以降は高耐性率を示す傾向が認められた(図-3)。O116と判定された72株について実施したPFGEでは62パターンに分類された。県内浸潤株は多様なPFGEパターンを示し、近似率90%では42クラスター、80%では29クラスターに分類された(図-4)。また、調査時期に最も浮腫病診断症例数が多かった農場(A農場)においても、分離時期により異なるPFGEパ

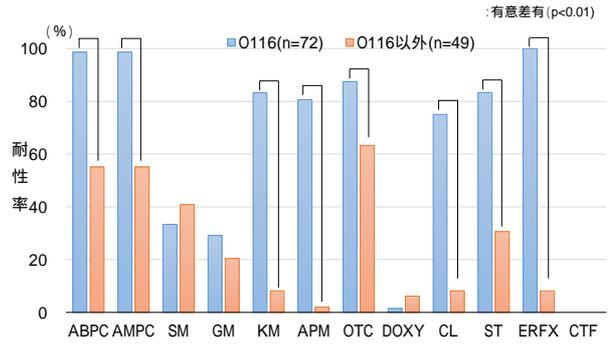


図 - 2 O116およびO116以外の血清型の耐性率

表 - 4 O116およびO139の耐性薬剤数

耐性薬剤数	株数												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
O116 (n=72)	0	0	0	1	1	0	10	19	22	13	6	0	0
O139 (n=44)	8	9	3	11	6	4	3	0	0	0	0	0	0
							O116						
平均耐性薬剤数							7.0						
							O139						
平均耐性薬剤数							2.5						

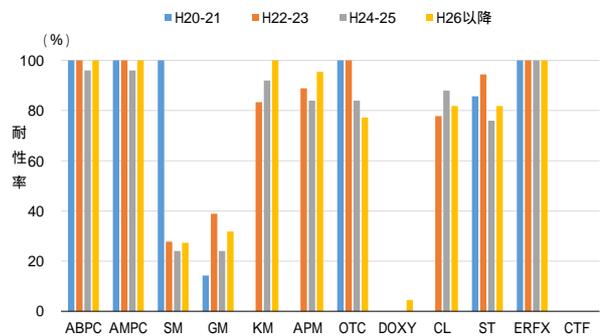


図 - 3 O116の耐性率の推移

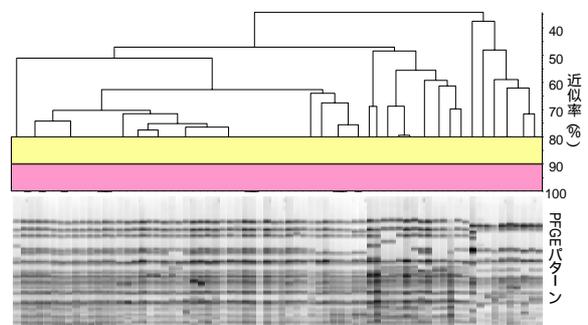


図 - 4 PFGEパターンおよび近似率

ーンが認められた(図-5)。次に、PFGEパターンに経時的に耐性率の変化がみられたSM、KM、

APM および CL の薬剤耐性パターンを対応させた図を作成したところ。平成 22 年 9 月以前に分離された 10 株と平成 22 年 11 月以降に分離された 62 株は薬剤耐性パターンおよび PFGE パターンが大きく異なっていた(図 - 6)。String test では O116 が全て陽性、その他の血清型は全て陰性を示し、String test 陽性株は全てムコイド状コロニーを示した。初生雛腹腔内接種後の肝臓の Hiss 染色像では、O116 の菌体周囲に大きな空胞が確認された。O139 でも空胞がみられる菌体があったものの、散見される程度であり、O116 より小さい傾向が認められた(写真 - 1)。

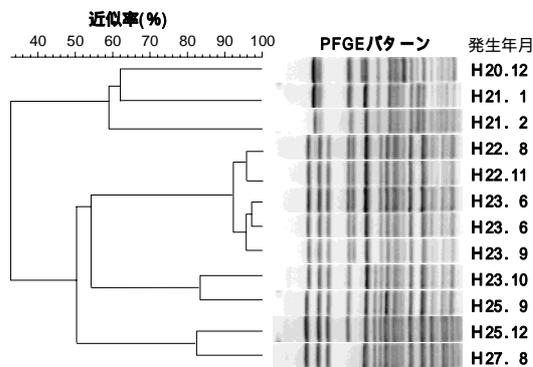


図 - 5 A農場におけるPFGEパターンおよび近似率

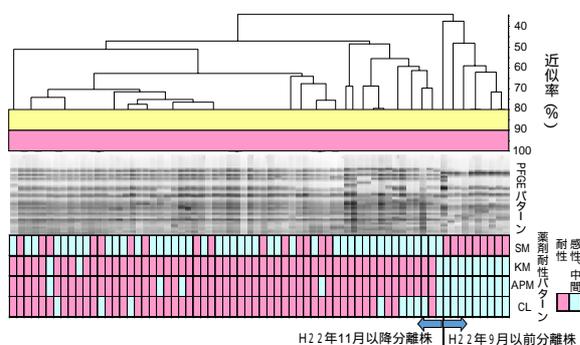


図 - 6 PFGEパターン、近似率および薬剤耐性パターン

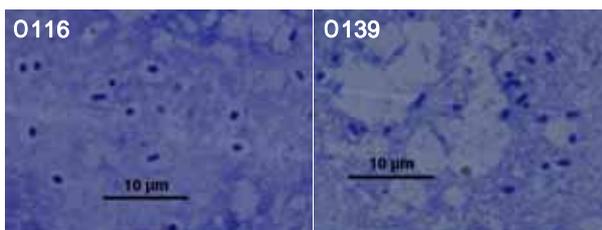


写真 - 1 Hiss染色像

### 3 まとめおよび考察

平成 11 年および平成 14 年における調査では、本県における Stx2e 保有大腸菌の主要血清型は O139 および O141 と報告されていた<sup>2、6)</sup>。しかしながら、今回実施した血清型別試験では、O116 と O139 で 95%以上を占め、特に平成 22 年以降は O116 が多数を占めており、現在の主要血清型は O116 であることが明らかとなった。近年出現した O116 はエンテロトキシンを保有し、多剤耐性であることが報告されているが<sup>3、4)</sup>、本県で分離された O116 も全株がエンテロトキシンを保有しており、多剤耐性であった。このエンテロトキシンの保有が下痢症を伴う浮腫病を起こす一要因と考えられ、また、抗菌性物質による対策は注意が必要であると考えられた。分子疫学解析で O116 は多様な PFGE パターンを示したことから、異なる由来の株が県内に浸潤していることが示唆された。また、1 農場でも時期により異なる PFGE パターンが認められたことから、1 農場内において、同一由来株による疾病が継続発生したり、ある時期に由来の異なる株が侵入しているものと考えられた。平成 22 年 9 月から 11 月を境に系統樹解析の近似率が最も低く、SM、KM、APM および CL の薬剤耐性パターンも異なる傾向がみられた。これらのことから、この時期に KM、APM および CL に耐性の O116 が県内に侵入した可能性が示唆された。O116 は全株が String test 陽性で、Hiss 染色では菌体周囲に大きな空胞が観察された。String test は、ヒトの肝臓瘍などから分離される *Klebsiella pneumoniae* のうち、過粘稠性株を判定する方法である。過粘稠性には莢膜合成遺伝子が関与するとされており、また、生体内での菌の生残性に有利に働くと考えられている<sup>9、10)</sup>。このことから、O116 は厚い莢膜を保有するか、多くの多糖類を産生することが示唆され、薬剤耐性率の高さと併せて他の血清型より生残性が高い可能性があり、これが近年の O116 増加の一要因となっていることが考えられた。また、String test は簡便な方法であり、現場における O116 のスクリーニングに有用と考えられた。今後、O116 による浮腫病への対策に資するため、全国的な浸潤

状況や薬剤耐性状況を調べるとともに、より詳細な性状調査等を実施していくことが必要である。

#### 4 謝辞

稿を終えるにあたり、血清型別試験および PFGE にご協力いただいた農研機構動物衛生研究部門楠本正博先生に深謝いたします。

#### 5 参考文献

- 1) 赤間俊輔ら：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解析，第 56 回栃木県家畜保健衛生業績発表会集録，49-53(2014)
- 2) 荒木博司ら：県内で分離された病原性大腸菌の性状，平成 11 年度長崎県家畜保健衛生業績発表会集録，31-34 (1999)
- 3) 藤井勇紀ら：茨城県における豚由来病原性大腸菌の比較解析と多剤耐性系統の出現，第 57 回茨城県家畜保健衛生業績発表会，56-625, (2015)
- 4) Kusumoto M. et al.: Emergence of a Mu-Itidrug-Resistant Shiga Toxin-Producing Enterotoxigenic Escherichia coli Lineage in Diseased Swine in Japan, J Clin. Microbiol., 54(4), 1074-1081(2016)
- 5) Lee -C. H. et al.: Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in Klebsiella pneumoniae isolates: association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia, J. intern. med., 259, 606-614(2006)
- 6) 三浦昭彦ら：県内での豚大腸菌症由来株の性状と浮腫病との関連性，平成 14 年度長崎県家畜保健衛生業績発表会集録，61-63(2002)
- 7) 中澤宗夫：浮腫病，豚病学，柏崎守ら編，第 4 版，333-335，近代出版，東京(1999)
- 8) 田中健介ら：新潟県内で分離された豚由来病原性大腸菌の比較解析における一考察，平成 26 年度新潟県家畜病性鑑定年報，31-34(2014)
- 9) Yeh KM. et al.: Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for Klebsiella

- pneumoniae liver abscess in Singapore and Taiwan.: J Clin Microbiol, 45, 466-471(2007)
- 10) Yu WL. et al.: Association between rmpA and magA genes and clinical syndromes caused by Klebsiella pneumoniae in Taiwan, Clin. Infect. Dis., 42(10), 1351-1358(2006)
  - 11) Vu-khac H. et al.: Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of Escherichia coli isolated from piglets with diarrhea in Slovakia, Vet. J., 174, 176-187(2007)