

## ブロイラーから分離された大腸菌の $\beta$ ラクタマーゼ産生性及び分子疫学的性状に関する研究

木口陽介<sup>1)†</sup> 小嶋 暢<sup>2)</sup> 遠藤千春<sup>3)</sup> 齋藤友佳<sup>4)</sup> 楠本正博<sup>5)</sup>

- 1) 山形県置賜家畜保健衛生所 (〒999-2232 南陽市三間通444)
- 2) 山形県中央家畜保健衛生所 (〒990-2161 山形市漆山736)
- 3) 山形県庄内家畜保健衛生所 (〒997-1301 東田川郡三川町大字横山字畑田139)
- 4) 山形県農業総合研究センター養豚試験場 (〒998-0112 酒田市浜中八窪1)
- 5) 独農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

(2013年3月19日受付・2014年5月29日受理)

### 要 約

ブロイラーの大腸菌症由来26株について病原性に関する特徴、 $\beta$ ラクタマーゼ産生性、血清型及び分子疫学的性状(マルチローカスシークエンスタイピング解析(MLST)、系統発生群(Phylogenetic groups))について調査した。分離株の性状は26株中O2:H- (シークエンスタイプ(以下ST) ST95, 系統発生群B2群)4株, O25:H4 (ST131, B2群)4株であり、最も割合が高かった。 $\beta$ ラクタマーゼ遺伝子の陽性率は58%(15/26)であり、遺伝子型は*bla*<sub>CMY-2</sub>9株, *bla*<sub>TEM-1</sub>7株, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>1株, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>2株, *bla*<sub>SHV-2</sub>1株認めた。 $\beta$ ラクタマーゼ遺伝子保有株では、本遺伝子非保有株と比較して*iss*, *iucD*, *papC*の病原性関連遺伝子の陽性率が有意に高く( $P<0.05$ )、その他5遺伝子(*astA*, *irp2*, *tsh*, *vat*, *cva/cvi*)でも高い傾向であった。以上の結果から鶏大腸菌症由来大腸菌では、理由は不明だが、 $\beta$ ラクタマーゼ遺伝子と病原性関連遺伝子の双方が同時に保存される傾向があることが示唆された。また、人の患者由来大腸菌と同じ性状(O25:H4 (ST131, B2群))を示す株や, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>SHV-2</sub>等の基質特異性拡張型 $\beta$ ラクタマーゼを保有している株を認めたことから、鶏由来大腸菌の拡散状況を注視する必要がある。

——キーワード:  $\beta$ ラクタマーゼ, 鶏大腸菌症, 腸管外病原性大腸菌, マルチローカスシークエンスタイピング, 系統発生群。

----- 日獣会誌 67, 739~746 (2014)

ブロイラー産業において鶏大腸菌症は、育成率及び増体率の低下が認められ、経済的な損失が大きい疾病として知られている。鶏に対して病原性を示す大腸菌はavian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) と呼ばれており、腸管以外に感染し病原性を発揮することから腸管外病原性大腸菌(extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC)に分類されている[1, 2]。APEC感染症は局所感染と全身感染に大別されており、局所感染では腹膜炎、卵管炎、蜂巢織炎、頭部腫脹症候群等、全身感染では敗血症及び敗血症に続発する炎症、肉芽腫などが認められる[1, 3]。ブロイラーにおける鶏大腸菌症起因菌の血清型は、国内においてはO78, O1, O2の報告が多く[4]、他にO18, O81, O115, O116, O132なども認められている[1]。病原性には付着因子、

鉄の獲得能、血清抵抗性などの関与が知られており[5, 6]、その他に毒素、バクテリオシン、プロテクチンなども関連するとされている[1]。発症要因は①ウイルス、細菌、寄生虫等との混合感染、②日齢、性別、発育速度等の生理学的要因、③飼料中の高マイコトキシン濃度、飼育環境中の高アンモニア濃度、大腸菌に汚染した飲水、飼育環境の湿度不足、極端な気温の日格差などの環境要因が報告されている[1]。畜産領域における国内の農場での抗生物質の使用に関する調査には、農林水産省動物医薬品検査所が実施している薬剤耐性モニタリング体制(JVARM)があり、健康な家畜由来大腸菌の薬剤感受性について毎年モニタリングが実施されている。JVARMによる調査の結果では、健康なブロイラーの糞便由来大腸菌のセファゾリンに対する耐性率が2000~

† 連絡責任者: 木口陽介(山形県置賜家畜保健衛生所)

〒999-2232 南陽市三間通444 ☎0238-43-3217 FAX 0238-43-5249 E-mail: kiguchiy@pref.yamagata.jp

表1 病原性関連遺伝子プロファイルと病理学的特徴

発生事例	発生時期	農場	日齢	菌株名	病原性関連遺伝子プロファイル	病理学的特徴
1	2008年2月	A	4	19-93	<i>astA</i>	腹膜炎
2	2008年2月	A	5	19-94	<i>iss, irp2, papC, iucD, vat, cva/cvi</i>	腹膜炎
3	2008年2月	B	5	19-111	<i>iss, irp2, papC, iucD, vat, cva/cvi</i>	腹膜炎
4	2008年5月	A	7	20-6	<i>iss, irp2, papC, iucD, vat, cva/cvi</i>	腹膜炎
5	2008年5月	B	5	20-11	<i>iss, irp2, papC, iucD, vat, cva/cvi</i>	腹膜炎
6	2009年4月	C	3	21-120	<i>iss, irp2, iucD, vat</i>	敗血症
			3	21-121	<i>astA</i>	敗血症
			3	21-122	<i>irp2, cva/cvi</i>	敗血症
			3	21-123	<i>irp2</i>	敗血症
			3	21-124	<i>iss, irp2, cva/cvi</i>	敗血症
			3	21-125	<i>iss, cva/cvi</i>	敗血症
7	2009年4月	D	38	21-126	<i>astA, iss, irp2, iucD</i>	敗血症, 脊椎すべり症
8	2009年5月	E	30	21-128	—	敗血症
			30	21-129	<i>astA, iss, irp2, iucD, tsh, cva/cvi</i>	敗血症
9	2009年6月	D	34	21-130	<i>iss, irp2, papC, iucD, vat, cva/cvi</i>	気嚢炎, 腹膜炎
10	2009年7月	F	46	21-131	<i>iss, irp2, vat</i>	心外膜炎, 腹膜炎
11	2009年9月	G	60	21-204	<i>iss, irp2, iucD, tsh, vat, cva/cvi</i>	ヒストモナス病, 敗血症
12	2010年3月	A	7	21-250	<i>iss, irp2, iucD, tsh, cva/cvi</i>	腹膜炎
13	2010年11月	A	4	22-123	<i>astA</i>	腹膜炎
14	2010年11月	A	4	22-125	<i>iss, irp2, iucD, tsh, cva/cvi</i>	腹膜炎
15	2010年9月	H	1	23-155	<i>iss, irp2, iucD, tsh, vat, cva/cvi</i>	敗血症
16	2011年2月	E	26	23-157	<i>astA, iss, papC, iucD, tsh, cva/cvi</i>	心外膜炎, 敗血症
17	2011年3月	E	27	23-160	<i>astA, iss, papC, iucD, tsh, cva/cvi</i>	頭部腫脹症候群
18	2011年3月	E	27	23-161	—	頭部腫脹症候群
19	2011年4月	E	4	23-164	<i>astA, iss, irp2, tsh, vat, cva/cvi</i>	敗血症
20	2011年4月	E	3	23-166	—	鶏脳脊髄炎, 敗血症

2003年が4.9%である [7] のに対し、2004年が10.5%、2005年が16.8%、2006年が10.5%、2007年が18.6%と年々増加傾向にある。セファロスポリン系抗菌薬は畜産領域のみならず人の医療においても重要な薬剤であり、耐性遺伝子を保有するプラスミドが人や鶏以外の家畜に対して病原性の高い *Salmonella enterica* を含めた *Enterobacteriaceae* に伝達する危険性があることが報告されている [8]。そこで本研究では、①鶏大腸菌症の発生状況、②病態と病原性遺伝子の保有の関連、③鶏大腸菌症由来株と人の病原性大腸菌との遺伝学的な比較を目的として調査を実施した。

### 材料及び方法

**供試材料：**2008年2月～2011年4月に山形県内のブロイラー農場8戸の1～60日齢で発生した鶏大腸菌症事例において分離した、20症例26株を検査に供した。株の由来は、1症例1株を18例18株、同一症例で血清型または個体が異なる2例8株を用いた (表1)。また、

対照として健康なブロイラーの糞便由来大腸菌10農場11株を用いた。大腸菌の分離は5%羊脱纖血加トリプトソイ寒天培地 (栄研化学株, 東京) と DHL 寒天培地 (栄研化学株, 東京) に無菌的に取り出した肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、脳の新鮮断面をスタンプし、頭部腫脹症候群が疑われた事例については、眼窩皮下織の新鮮断面をスタンプ後、37℃で一晩好気培養した。各培地上で大腸菌と思われる性状を示したコロニーについて、市販の検査キット (api20E, bioMérieux, France) を用いて菌種を同定した。

**疫学情報：**発生のあった20症例は、大腸菌症等における病理学的特徴、発症日齢及びブロイラー農場の導入元 (孵化場) について調査を実施した。

**O群及びH群血清型別：**病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研株, 東京) の抗血清を用いて型別を行った。本製品に含まれていない血清型については Statens Serum Institute 社製 (Denmark) の抗血清を用いて決定した。

**病原性関連遺伝子解析：**Ewersら [6] の報告に従い

表2 孵化場別に見た分離株の血清型と分子疫学的性状

孵化場	農場	発生時期	菌株名	血清型	MLST									系統発生群
					ST	<i>adh</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	clonal complex	
I	A	2008年2月	19-93	O2:HUT	1638	10	11	4	12	8	45	2	—	B2
		2008年2月	19-94	O2:H-	95	37	38	19	37	17	11	26	ST95complex	B2
		2008年5月	20-6	O2:H-	95	37	38	19	37	17	11	26	ST95complex	B2
		2010年3月	21-250	O15:H6	69	21	35	27	6	5	5	4	ST69complex	D
		2010年11月	22-123	O1:H21	223	6	4	4	18	24	8	14	ST155complex	B1
		2010年11月	22-125	O78:H-	23	6	4	12	1	20	13	7	ST23complex	A
	B	2008年2月	19-111	O2:H-	95	37	38	19	37	17	11	26	ST95complex	B2
		2008年5月	20-11	O2:H-	95	37	38	19	37	17	11	26	ST95complex	B2
	C	2009年4月	21-120	O56:H4	117	20	45	41	43	5	32	2	—	D
			21-121	O75:H42	2223	6	11	5	8	7	8	2	—	D
			21-122	O25:H4	131	53	40	47	13	36	28	29	—	B2
			21-123	O73:H-	453	99	6	33	33	24	8	7	ST986complex	B1
21-124			O25:H4	131	53	40	47	13	36	28	29	—	B2	
21-125			O72:HUT	2522	6	29	5	18	11	8	2	—	B1	
D	2009年4月	21-126	O25:H4	131	53	40	47	13	36	28	29	—	B2	
	2009年6月	21-130	O2:H6	95	37	38	19	37	17	11	26	ST95complex	B2	
II	2009年5月	21-128	O73:H4	10	10	11	4	8	8	8	2	ST10complex	A	
		21-129	O25:H4	131	53	40	47	13	36	28	29	—	B2	
	2011年2月	23-157	O119:H-	117	20	45	41	43	5	32	2	—	D	
	E	2011年3月	23-160	O157:H4	117	20	45	41	43	5	32	2	—	D
		2011年3月	23-161	O8:HUT	1844	6	29	33	16	11	7	2	—	B2
	2011年4月	23-164	O143:H4	117	20	45	41	43	5	32	2	—	D	
	2011年4月	23-166	O123:H45	2485	6	4	159	140	112	1	17	—	D	
	F	2009年7月	21-131	O2:H5	355	36	24	10	13	17	10	25	—	B2
G	2009年9月	21-204	O8:H5	681	38	39	30	13	17	25	28	—	B2	
III	H	2010年9月	23-155	O10:H12	429	97	40	93	13	23	28	66	—	B2

8 遺伝子 (*astA* (エアロバクチン腸管凝集性毒素), *iss* (血清抵抗性), *irp2* (鉄獲得), *papC* (P線毛), *iucD* (エアロバクチン), *tsh* (温度感知赤血球凝集能), *vat* (空胞化毒素), *cva/cvi* (コリシンVプラスミド)) についてPCRを行った。また、病理学的特徴と病原性関連遺伝子陽性率について比較を行った。

**βラクタマーゼ遺伝子型別**: Kojimaら[9]の報告に従い、*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>PSE-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1group</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2group</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9group</sub>, *bla*<sub>CMY-1</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub>, *bla*<sub>FOX</sub> についてPCRによる型別を行った。また、*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1group</sub> 及び *bla*<sub>CTX-M-2group</sub> 陽性株は Kojimaら[9] 及び Menaら[10]のプライマーを用いてPCRによりβラクタマーゼ遺伝子を増幅後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した後、既報のアミノ酸配列と比較し、βラクタマーゼ遺伝子型を決定した。また、βラクタマーゼ遺伝子保有株及び非保有株に分け病原性関連遺伝子の

陽性率の比較を行った。

**薬剤感受性試験**: 分離株は ampicillin (ABPC), cefazolin (CEZ), cefotaxime (CTX) の薬剤について微量液体希釈法により最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。微量液体希釈法は市販のプレート (ドライブプレート, 栄研化学(株), 東京) を用いて実施した。なお, ABPC, CEZ, CTX のブレイクポイントは Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の *Enterobacteriaceae* の値に準拠した [11]。

**MLST (multilocus sequence typing) 解析**: 大腸菌の sequence type (ST) は, University College Cork のデータベース (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) に記載された7つのハウスキーピング遺伝子 (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) をPCRで増幅後精製し、シーケンス解析により解読した塩基配列をデータベースで照合することにより決定した。

プロイラーから分離された大腸菌の *bla* 産生性と性状

表 3 病原性関連遺伝子と病理学的特徴の比較

	<i>astA</i>	<i>iss</i>	<i>irp2</i>	<i>papC</i>	<i>iucD</i>	<i>tsh</i>	<i>vat</i>	<i>cva/cvi</i>
敗血症 (n=14)	35.7%	64.3%	64.3%	7.1%	42.9%	35.7%	28.6%	57.1%
腹膜炎 (n=10)	20.0%	80.0%	80.0%	50.0%	70.0%	20.0%	60.0%	70.0%
頭部腫脹症候群 (n=2)	50.0%	50.0%	0.0%	50.0%	50.0%	50.0%	0.0%	50.0%
計 (n=26)	30.7%	69.2%	65.4%*	26.9%	53.8%	30.8%	38.5%*	61.5%*
健康鶏糞便由来 (n=11)	27.2%	36.3%	18.2%	0.0%	18.2%	18.2%	0.0%	18.2%

病原性関連遺伝子と病理学的特徴に有意差は認めず

鶏大腸菌症由来株と健康糞便由来株の病原性関連遺伝子の比較：\**P*<0.05 (フィッシャーの正確検定)

表 4 βラクタマーゼ遺伝子保有状況と薬剤感受性試験及びプラスミドレプリコンタイピングの結果

βラクタマーゼ遺伝子	薬剤感受性試験結果			プラスミドレプリコンタイピング		
	ABPC	CEZ	CTX	IncF I A	IncF I B	IncF II A
19-93 <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	128 ≤	128	64 ≤	-	+	-
19-94 <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	128	128 ≤	8	-	+	-
19-111 <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	128 ≤	8	<0.5	-	+	-
20-6 <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	64	128 ≤	4	-	+	-
20-11 <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	64	128 ≤	4	-	+	-
21-126 <i>bla</i> <sub>SHV-2</sub>	128 ≤	128 ≤	8	-	+	-
21-130 <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	128 ≤	128 ≤	8	-	+	-
21-131 <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	128 ≤	64	1	-	+	-
21-250 <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	128 ≤	4	<0.5	+	+	-
22-123 <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	128 ≤	128 ≤	4	+	+	-
22-125 <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	128 ≤	128 ≤	32	-	+	-
23-155 <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	128 ≤	128 ≤	4	-	-	-
23-157 <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	128 ≤	128 ≤	4	+	+	-
23-160 <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	128 ≤	128 ≤	32	+	+	-
23-164 <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	128 ≤	128 ≤	8	+	+	-
23-166	128 ≤	8	<0.5	-	+	-
21-120	2	2	<0.5	+	+	-
21-121	<1	<1	<0.5	-	-	-
21-122	4	<1	<0.5	-	+	-
21-123	2	<1	<0.5	-	+	-
21-124	2	2	<0.5	-	+	-
21-125	2	<1	<0.5	-	+	-
21-128	<1	<1	<0.5	-	-	-
21-129	4	2	<0.5	-	+	-
21-204	2	1	<0.5	-	+	-
23-161	2	2	<0.5	+	-	-

ブレイクポイント：ABPC 32 μg/ml, CEZ 8 μg/ml, CTX 4 μg/ml

MIC：最小発育阻止濃度 (μg/ml)

系統発生群 (phylogenetic groups) 解析：分離株におけるグループ型別は Clermont ら [12] の方法に準拠し PCR を行い、4つのグループ (A群, B1群, B2群, D群) に分類した。

プラスミドレプリコンタイピング：Johnson ら [13]

の報告に従い、FIA, FIB, FIIAグループについて PCRによる型別を行った。

成 績

疫学情報：症例は8農場での発生であり、これらの農

表5 病原性関連遺伝子とβラクタマーゼ遺伝子保有状況の比較

由 来	βラクタマーゼ遺伝子保有状況	<i>astA</i>	<i>iss</i>	<i>irp2</i>	<i>papC</i>	<i>iucD</i>	<i>tsh</i>	<i>vat</i>	<i>cva/cvi</i>
APEC	保有株 (n=15)	40.0%	86.6%*	73.3%	46.6%*	73.3%*	40.0%	53.3%	73.3%
	非保有株 (n=11)	18.1%	45.5%	54.5%	0.0%	27.3%	18.1%	18.1%	45.5%
	小 計 (n=26)	30.8%	69.2%	65.4%	26.9%	53.8%	30.8%	38.5%	61.5%
健康鶏	保有株 (n=5)	20.0%	60.0%	20.0%	0.0%	40.0%	40.0%	0.0%	40.0%
	非保有株 (n=6)	33.4%	16.7%	16.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	小 計 (n=11)	27.2%	36.3%	18.2%	0.0%	18.2%	18.2%	0.0%	18.2%

\* : APECにおけるβラクタマーゼ保有株及び非保有株の比較  $P < 0.05$  (フィッシャーの正確検定)  
健康鶏におけるβラクタマーゼ保有株及び非保有株の比較では有意差なし

場は県内外の3孵化場(孵化場Ⅰ, Ⅱは県外, 孵化場Ⅲは県内)から初生雛を導入していた。発症日齢は1~60日齢と広く分布しており, 生後1週齢以内の発生が65.3% (1~7日齢: 平均3.7日齢), 35日齢を中心とした出荷間際までの発生が34.7% (26~60日齢: 平均35.3日齢)であった。病理学的特徴は, 敗血症が14例, 腹膜炎が10例, 頭部腫脹症候群が2例認められた(表1)。

**O群及びH群血清型別:** 鶏大腸菌症由来株の血清型はO2:H-が4株(4例), O25:H4が4株(3例)と最も多く, 両者で30.7%であり, その他には18の血清型が認められた(表2)。

**病原性関連遺伝子:** 検査に供した株で最も陽性率が高い遺伝子は*iss*で69.2%であった(表3)。次いで*irp2*が65.4%, *cva/cvi*が61.5%であった。病原性関連遺伝子陽性率と病理学的特徴の比較では関連を認めなかった(表3)。

**βラクタマーゼ遺伝子保有状況:** βラクタマーゼ遺伝子保有株は15株(57.7%), 非保有株は11株(42.3%)であった。遺伝子の内訳では最も多く保有する遺伝子が*bla<sub>CMY-2</sub>*で9株, 次いで*bla<sub>TEM-1</sub>*で7株であり, 他に*bla<sub>CTX-M-2</sub>*が2株, *bla<sub>SHV-2</sub>*, *bla<sub>CTX-M-15</sub>*が各1株であった(表4)。βラクタマーゼ遺伝子を保有株及び非保有株に分け, 病原性関連遺伝子陽性率を比較すると, βラクタマーゼ保有株では*iss*, *iucD*, *papC*の病原性関連遺伝子陽性率が有意に高く( $P < 0.05$ , フィッシャーの正確検定), その他5遺伝子(*astA*, *irp2*, *tsh*, *vat*, *cva/cvi*)でも高い傾向を認めた(表5)。

**薬剤感受性試験:** 薬剤耐性率はABPCが61.5%, CEZが57.7%, CTXが46.1%であった(表4)。

**MLST:** 16のSTに型別された。最も多い株はST95が5株, 次いでST117及びST131が各4株であった(表2)。

**系統発生群:** 各グループの比率は, A群が7.7%, B1群が11.5%, B2群が53.8%, D群が26.9%であった(表2)。

**プラスミドレプリコンタイピング:** FIAグループが

23.1%, FIBグループが80.8%, FIIAグループが0%であった(表4)。

## 考 察

本県のプロイラーにおける鶏大腸菌症の発症日齢には二峰性が認められ, 生後1週齢以内の発生が65.3% (1~7日齢: 平均3.7日齢), 35日齢を中心とした出荷間際までの発生が34.7% (26~60日齢: 平均35.3日齢)であった。血清型はO2:H-及びO25:H4が計8株で全体の30.7%であり, その他には18の血清型が認められた。国内における発生ではO78を主として報告されている[4]が, 今回の調査ではさまざまな血清型が認められた。βラクタマーゼ遺伝子型別では, いずれかのβラクタマーゼ遺伝子を保有している株が57.7%であった。保有遺伝子型の内訳は*bla<sub>CMY-2</sub>*が9株, *bla<sub>TEM-1</sub>*が7株と多く認められた。βラクタマーゼ産生遺伝子と薬剤感受性試験結果との比較では, βラクタマーゼ産生遺伝子保有株は, すべてABPCに対して耐性を示していた。また, CEZ耐性株(ブレイクポイント:  $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ )は57.7%であり, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *bla<sub>CMY-2</sub>*, *bla<sub>CTX-M-2</sub>*, *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, *bla<sub>SHV-2</sub>*を単体もしくは複数保有していた。CTX耐性株(ブレイクポイント:  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ )は*bla<sub>CMY-2</sub>*, *bla<sub>CTX-M-2</sub>*, *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, *bla<sub>SHV-2</sub>*を保有していた。また, 薬剤耐性を示した株には19-111株や21-131株のように*bla<sub>TEM-1</sub>*保有株でCEZ耐性を示す株や, 本検査で使用したβラクタマーゼ遺伝子検索で陰性であったにもかかわらず23-166株のようにABPC, CEZ耐性を認める株があることから, 今回検査を行ったβラクタマーゼ遺伝子以外の耐性遺伝子等の存在が示唆された。*bla<sub>CTX-M-2</sub>*, *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, *bla<sub>SHV-2</sub>*は基質特異性拡張型βラクタマーゼ(Extended spectrum β-lactamase: ESBL)に分類されており, 国内ではAsaiら[14]が牛や鶏の大腸菌症由来ESBL産生株の性状について報告している。今回検査に供した農場では抗菌性の飼料添加物は使用されていなかった。また細菌性疾病が発生しても, 抗菌剤による治療は行わず, 症状を示す鶏の対策は摘発・淘汰を基本としている。現在, 日本では鶏用のセファロsporin系抗菌薬は

承認されていないが、ペニシリン系抗菌薬は承認されており、ESBLやCMY-2を含めたβラクタマーゼの選択圧になりうる。本県におけるブロイラーの飼養農場は、県外からの初生雛導入によるものがほとんどであり、今回調査に供した株は孵化場Ⅲ由来の23-155株を除くすべてが県外孵化場からの導入鶏によるものであった。県内の孵化場Ⅲでは抗菌薬を使用していないことが判明したが、県外の孵化場Ⅰ、Ⅱにおける抗菌薬の使用状況は今回の調査では不明であった。

また、県内の健康鶏由来の大腸菌におけるβラクタマーゼ保有状況を調査するため、健康ブロイラーの糞便由来大腸菌10農場11株についてβラクタマーゼ遺伝子の検索を行ったところ45.4%でいずれかの遺伝子を保有していた(表5)。なお、これらのブロイラー飼養農場でも、抗菌性飼料添加物や抗菌剤が使用されていない。このことから農場における抗菌剤や抗菌性の飼料添加物の使用がないにもかかわらず、県内で分離されたAPEC及び健康なブロイラー糞便由来大腸菌ではβラクタマーゼ産生遺伝子保有率がJVARMにおける全国の薬剤耐性率と比較して高いことが示唆された。以上のことから、本県におけるAPECの薬剤耐性遺伝子の獲得は、農場での薬剤使用における選択圧だけではないことが推察され、孵化場を含めた素びな生産農場においても抗菌薬の使用状況を注視し、健康鶏糞便由来の分離菌の薬剤耐性状況をモニタリングする必要がある。

APECの鶏に対する病原性には、コリシンVプラスミドや血清抵抗性、付着因子、鉄の獲得能などの関与が知られており、これらに関する8遺伝子[6]について検査を実施したところ、最も高率に保有していたのは*iss*であった。Kawanoら[15]によれば、APECの病原性はコリシンVプラスミドが主要な役割を果たし、染色体上の病原性関連遺伝子は補助的に症状を悪化させるとしている。また病原性関連遺伝子の保有状況の比較ではAPEC由来大腸菌は健康鶏由来大腸菌と比べ*iss*, *tsh*, *iucD*, *cva/cvi*が有意に高い割合で病原性遺伝子を保有していた[15]。われわれの検討では、APEC由来大腸菌は健康鶏由来大腸菌と比べ、*irp2*, *vat*, *cva/cvi*で有意差( $P<0.05$ )を認めた。この結果はコリシンVプラスミド上の何らかの病原性関連遺伝子が鶏大腸菌症を引き起こすのに重要な役割を果たしていることを裏付けるものであった。

各症例の病理学的特徴では主要なものとして敗血症が14例、腹膜炎が10例、頭部腫脹症候群が2例であった。各病理学的特徴と病原性関連遺伝子の保有状況の比較では関連を認めなかった。同一農場由来株における各性状の比較では、19-94株及び20-6株のように発生時期が異なる症例において血清型、分子疫学的性状、薬剤耐性遺伝子の保有状況及び病原性関連遺伝子プロファイルが

同一の株を認めた。また同一孵化場由来株における各性状の比較では、A農場の19-94株とB農場の19-111株のように異なる農場由来において各性状が同一である株を認めた。このことから疫学的な関連がある農場では同一の性状株で鶏大腸菌症の発生が認められることを示唆している。また、一方ではC農場の6株のように同一症例から複数の血清型や病原性関連遺伝子プロファイルを検出する事例も認められた。

分離株を用いたβラクタマーゼ産生遺伝子と病原性関連遺伝子の比較では、βラクタマーゼ産生遺伝子保有株の病原性関連遺伝子陽性率が有意に高いことから、理由については不明であるが、APECでは病原性関連遺伝子や薬剤耐性遺伝子双方が同時に保存される傾向があることが示唆された。

近年、菌のゲノムタイピングに広く用いられている解析手法がMLSTで、菌株ごとに複数遺伝子の配列の差異をパターン化することにより、系統分析・分子疫学・母集団構造の調査に応用されている。MLSTは遺伝子配列を読む客観的な解析のため、世界で報告されている菌株と容易に比較することができ、STが同一または近縁な集団の特徴を知ることができるとされている。University College Corkの2013年12月現在のデータベースには大腸菌のSTが約4,200タイプ登録されている。鶏大腸菌症ではOzawaら[4]により、国内で分離されたO78ではST23が最も多く、他にST155, ST117, ST369, ST1645が認められたと報告されている。人におけるExPECとしては尿路病原性大腸菌(uropathogenic *Escherichia coli*: UPEC)が知られている。UPEC患者由来株ではST14, ST69, ST73, ST95, ST131などが報告されており[16]、今回の供試株にもUPEC由来と同じST95及びST131が認められた。系統発生群は大腸菌の鉄輸送関連遺伝子を含む3遺伝子の保有状況を元にExPECと常在性大腸菌に分類する方法として知られている[12]。この分類では常在性大腸菌はA群, B1群, ExPECではB2群, D群が多いとされている。Moulin-Schouleurら[17]はAPECの中でB2群は人における新生児髄膜炎、尿路感染症、敗血症のハザードになりうることを述べており、今回の調査では鶏大腸菌症由来株の53.8%でB2群, 26.9%でD群が認められた。系統発生群の型別とMLSTの比較では、分離数の多いST95の5株及びST131の4株はすべてB2群に型別された。またST117の4株はすべてD群に型別され、系統発生群とMLSTで一定の傾向が認められた。

人の医療領域においてESBL産生性大腸菌は、国内のみならず海外でも報告が増加しており[18, 19]、院内感染の原因菌とされている。その中で問題視されているESBL産生性大腸菌にはO25:H4(ST131, CTX-M-

15, B2群) 株がある。この株は院内感染だけではなく、市中感染事例として尿路感染症及び敗血症から分離されている。なお、この性状をもつ株は人のみならず鶏や牛、犬などの畜産分野及びコンパニオンアニマルからも分離されている [2, 18, 19]。今回の調査では ESBL 産生株ではなかったが、O25:H4 (ST131, B2群) を認めた。

*Enterobacteriaceae* に認められるさまざまなプラスミドを PCR によりグループ分けする方法としてはプラスミドレプリコンタイプングが知られている。APEC や UPEC において薬剤耐性遺伝子を保有するプラスミドのレプリコンタイプとしては FII, FIA, FIB, II, A/C, L/M, N, NT 等が報告されている [8]。また、病原性関連遺伝子を保有するプラスミドにはコリシン V とコリシン BM があり、これらは IncFIB グループに属している [13]。本検討において、大腸菌のプラスミド上に存在することが知られる  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子 (*bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>SHV-2</sub>) を保有する株のレプリコンタイプはすべて IncFIA または IncFIB であった。また、ほとんどの株は *cva/cvi* が陽性、IncFIB グループ陽性であったが、23-155 株のように *cva/cvi* 陽性、IncFIB グループ陰性株も認められた。このことは、*cva/cvi* が FIB グループ以外のプラスミドでも保存されていることを示唆している。IncF グループのプラスミドは大腸菌のみならず *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica* でも報告されており、薬剤耐性遺伝子が伝達する可能性が示唆されている [8]。今後の検討課題として、 $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子が保存されているプラスミドの特定を行い、その伝達性を確認する必要がある。

現在、国内における食鳥処理において鶏大腸菌症と診断された鶏は食鳥処理の事業の規制及び食鳥検査に関する法律に基づき全部廃棄となっており、食用に供されることはない。しかし、石畝ら [20] は、市販鶏肉から分離した  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子保有大腸菌には O78:H- (*bla*<sub>CTX-M-14</sub>, A 群), O25:H4 (*bla*<sub>CTX-M-1</sub>, B2 群) 株などがあり、検査に供した食肉の 28% から *bla*<sub>CTX-M</sub> 陽性株を分離したことを報告している。このことは食鳥処理場で鶏が適正に処理されていても、鶏肉に大腸菌が付着するリスクがあることが推察され、その大腸菌の中には人に感染するリスクがあり、かつ ESBL を保有している株が含まれる。

結論として、本研究では鶏大腸菌症を起こす大腸菌の病理学的特徴と今回調査した病原関連遺伝子に関連は認められず、発症に至る因子については今後もさらに検討が必要である。また  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子の保有状況では  $\beta$  ラクタマーゼ保有株と非保有株における病原性関連遺伝子の陽性率に有意差を認めた。分離株の分子疫学的性状検査では、鶏大腸菌症由来大腸菌には人に感染する

リスクのある性状をもつ大腸菌が認められたことから、今後も生産現場における  $\beta$  ラクタマーゼ保有大腸菌の拡散状況を注視する必要がある。

## 引用文献

- [1] Barnes HJ, Nolan LK, Vaillancourt JP: Colibacillosis, Diseases of poultry 12th ed, Saif YM, et al eds, 691-732, Iowa State Press, Ames Iowa (2008)
- [2] Johnson TJ, Jordan D, Kariyawasam S, Stell AL, Bell NP, Wannemuehler YM, Alarcon CF, Li G, Tivendale KA, Logue CM, Nolan LK: Sequence analysis and characterization of a transferable hybrid plasmid encoding multidrug resistance and enabling zoonotic potential for extraintestinal *Escherichia coli*, Infect Immun, 78, 1931-1942 (2010)
- [3] 村瀬敏之: 採卵用成鶏における大腸菌症. 鶏病研報, 45, 147-155 (2009)
- [4] Ozawa M, Baba K, Asai T: Molecular typing of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strains in Japan by using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis, J Vet Med Sci, 72, 1517-1520 (2010)
- [5] 関崎 勉: 鶏の大腸菌症より分離された大腸菌の病原因子について, 鶏病研報, 24, 13-22 (1988)
- [6] Ewers C, Janßen T, Kießling S, Philipp HC, Weiler LH: Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction, Avian Dis, 49, 269-273 (2005)
- [7] Kojima A, Asai T, Ishihara K, Morioka A, Akimoto K, Sugimoto Y, Sato T, Tamura Y, Takahashi T: National monitoring for antimicrobial resistance among indicator bacteria isolated from food-producing animals in Japan, J Vet Med Sci, 71, 1301-1308 (2009)
- [8] Carattoli A: Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*, Antimicrob Agents Chemother, 53, 2227-2238 (2009)
- [9] Kojima A, Ishii Y, Ishihara K, Esaki H, Asai T, Oda C, Tamura Y, Takahashi T, Yamaguchi K: Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program, Antimicrob Agents Chemother, 49, 3533-3537 (2005)
- [10] Mena A, Plasencia V, Garcia L, Hidalgo O, Ayestaran JI, Alberti S, Borrell N, Perez JL, Oliver L: Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development, J Clin Microbiol, 44, 2831-2837 (2006)
- [11] Franclin R Cockerill, et al: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement, Clinical and Laboratory Standards Institute, 32(3) (2012), (<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/M100S22E.pdf>, accessed September 2014)
- [12] Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E: Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenet-

- ic group, Appl Environ Microbiol, 66, 4555-4558 (2000)
- [13] Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson SJ, Logue CM, White DG, Doetlott C, Nolan LK : Plasmid replication typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates, Appl Environ Microbiol, 73, 1976-1983 (2007)
- [14] Asai T, Masani K, Sato C, Hiki M, Usui M, Baba K, Ozawa M, Harada K, Aoki H, Sawada T : Phylogenetic groups and cephalosporin resistance genes of *Escherichia coli* from diseased food-producing animals in Japan, Acta Vet Scand, 53, 52 (2011)
- [15] Kawano M, Yaguchi K, Osawa R : Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan, Microbiol Immunol, 50, 961-966 (2006)
- [16] Lau SH, Reddy S, Cheesbrough J, Bolton FJ, Willshaw G, Cheasty T, Fox AJ, Upton M : Major uropathogenic *Escherichia coli* strain isolated in the northwest of England identified by multilocus sequence typing, J Clin Microbiol, 46, 1076-1080 (2008)
- [17] Moulin-Schoule M, Répérant M, Laurent S, Brée A, Mignon-Grasteau S, Germon P, Rasschaert D, Schouler C : Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns, J Clin Microbiol, 45, 3366-3376 (2007)
- [18] Ewers C, Grobbel M, Stamm I, Kopp PA, Diehl I, Semmler T, Fruth A, Beutlich J, Guerra B, Wieler L H, Guenther S : Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M15 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals, J Antimicrob Chemother, 65, 651-660 (2010)
- [19] Peirano G, Pitout JDD : Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4, Int J Antimicrob Agents, 35, 316-321 (2010)
- [20] 石畝 史, 永田暁洋, 鈴木里和, 山崎史子, 望月典郎, 荒川宜親 : 福井県内における人および鶏肉由来基質特異性拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学的解析, 日獣会誌, 63, 883-887 (2010)

$\beta$ -Lactamase Production and Molecular Epidemiological Characteristics of *Escherichia coli* Isolated from Broiler Chickens

Yosuke KIGUCHI<sup>1)†</sup>, Toru OJIMA<sup>2)</sup>, Chiharu ENDOH<sup>3)</sup>, Yuka SAITO<sup>4)</sup> and Masahiro KUSUMOTO<sup>5)</sup>

- 1) Yamagata Prefecture Okitama Livestock Hygiene Service Center, 444 Mitumadori, Nanyo, 999-2232, Japan
- 2) Yamagata Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center, 736 Urushiyama, Yamagata, 990-2161, Japan
- 3) Yamagata Prefecture Shonai Livestock Hygiene Service Center, 139 Hatakeda, Yokoyama, Mikawa, Higashitagawa-gun, 997-1301, Japan
- 4) Yamagata Integrated Agricultural Research Center Swine Experiment Station, 1 Yakubo, Hamanaka, Sakata, 998-0112, Japan
- 5) National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan

SUMMARY

A total of 26 strains of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with colibacillosis were investigated for the pathological feature  $\beta$ -lactamase productivities, serotypes and molecular epidemiological characteristics including sequence types (STs) analyzed using multilocus sequence typing (MLST) and phylogenetic groups. The most prevalent characteristics were O2:H-, ST95, and phylogenetic group B2; and O25:H4, ST131, and B2 (four strains each). Fifteen (58%) of the 26 isolates possessed  $\beta$ -lactamase gene (s) including *bla*<sub>CMY-2</sub> (nine strains), *bla*<sub>TEM-1</sub> (seven strains), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (one strain), *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (two strains), and *bla*<sub>SHV-2</sub> (one strain). In the  $\beta$ -lactamase gene-positive strains, the prevalence rate of the three virulence-associated genes (VAGs), *iss*, *iucD*, and *papC*, was significantly high ( $P < 0.05$ ), and the prevalence of the other five VAGs (*astA*, *irp2*, *tsh*, *vat*, and *cva/cvi*) tended to be high compared to the  $\beta$ -lactamase gene-negative strains. These results suggested that the  $\beta$ -lactamase gene and VAGs were likely to be conserved in *E. coli* that caused avian colibacillosis. It is necessary to observe the diffusion of avian pathogenic *E. coli*, because we found *E. coli* strains possessing extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) genes (i.e. *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>SHV-2</sub>) and O25:H4 (ST131 and B2) strains, which were the major type of ESBL-producing *E. coli* isolated from patients.

— Key words :  $\beta$ -lactamase, colibacillosis, extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, multilocus sequence typing (MLST), Phylogenetic group.

† Correspondence to : Yosuke KIGUCHI (Yamagata Prefecture Okitama Livestock Hygiene Service Center)

444 Mitumadori, Nanyo, 999-2232, Japan

TEL 0238-43-3217 FAX 0238-43-5249 E-mail : kiguchi@pref.yamagata.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 67, 739~746 (2014)