

## 茨城県における豚由来病原性大腸菌の比較解析： 主要血清型 O116 の解析

藤井勇紀<sup>1)†</sup> 田邊ひとみ<sup>2)</sup> 西野弘人<sup>3)</sup> 大谷芳子<sup>1)</sup> 都筑智子<sup>1)</sup>  
大内義尚<sup>1)</sup> 秋庭正人<sup>4)</sup> 楠本正博<sup>4)</sup>

- 1) 茨城県県北家畜保健衛生所 (〒310-0002 水戸市中河内町 966-1)
- 2) 茨城県鹿行家畜保健衛生所 (〒311-1517 鉾田市鉾田 1367-3)
- 3) 茨城県農林水産部畜産課 (〒310-8555 水戸市笠原町 978-6)
- 4) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 (〒305-0856 つくば市観音台 3-1-5)

(2016年12月2日受付・2017年7月18日受理)

### 要 約

2006～2014年に茨城県で分離された豚由来病原性大腸菌108株の比較解析を実施した。おもなO群血清型はO116(34.3%)、O139(11.3%)、O149(9.3%)であった。O116の平均耐性薬剤数は19薬剤中12.7剤で、フルオロキノロン(FQ)系抗菌剤に対しては全株が耐性を示した。パルスフィールドゲル電気泳動解析の結果、O116株の多くは疫学的に近縁ではなく、またO116株による豚大腸菌症発生農場における聞き取り調査の結果、FQ系抗菌剤の使用歴との関係は認められなかった。O116は家畜生産の脅威となり得る多剤耐性を示すことから、抗菌剤の慎重使用と衛生管理の徹底に加え、発生農場における疫学調査等もあわせて実施する必要がある。

——キーワード：豚大腸菌症，病原性大腸菌，フルオロキノロン系抗菌剤，多剤耐性菌，血清型O116。

-----日獣会誌 70, 643～649 (2017)

豚大腸菌症や浮腫病は、病原性大腸菌に起因し、いずれの病型もその経済的損失は大きく、豚において重要な疾病である。国内において、浮腫病及び大腸菌症の豚からそれぞれ分離されるO139及びO149が豚由来病原性大腸菌の主要血清型であり、次いで多剤耐性傾向の高いO116及びOSB9が高頻度に分離されている[1]。茨城県では豚の病性鑑定実施事例のうち毎年10件程度が豚大腸菌症や浮腫病と診断されているが、近年では複数の抗菌剤に耐性かつ主要第二次選択薬であるフルオロキノロン(FQ)系抗菌剤にも耐性の大腸菌株が分離されるようになり、感受性薬剤の選択に苦慮する事例が増加している。そこで、県内で分離された豚由来病原性大腸菌の実態を把握するため、平成18～26年度に分離された菌株のO群血清型別、 $\beta$ 溶血性の確認、病原関連遺伝子検査、薬剤感受性試験、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を用いた分子疫学的解析、発生状況調査を

実施し、菌株間の比較解析を行った。

### 材料及び方法

**供試菌株**：茨城県で平成18～26年度に行われた病性鑑定において、豚から分離された病原性大腸菌108株(96事例、63農場、103頭由来)を供試した。なお108株のうち、平成18～26年のO139(12株)、O149(10株)、O116(37株)の病原関連遺伝子検査、薬剤感受性試験の一部、PFGEの成績は既報[1]にも含まれる。

**O群血清型別**：市販の抗血清(デンカ生研株、東京及びStatens Serum Institut, Denmark)を用いた凝集試験により型別を実施した。

**溶血性の確認**：5%羊血液寒天培地を用いて、37℃、24時間の好気培養を実施し、生育したコロニーについて、溶血性の有無を確認した。

**病原性関連遺伝子検査**：Vu-Khacら[2]が報告した

† 連絡責任者：藤井勇紀(茨城県県北家畜保健衛生所)

〒310-0002 水戸市中河内町 966-1

☎ 029-225-3241 FAX 029-224-6661

E-mail : y.hujii@pref.ibaraki.lg.jp

茨城県における主要血清型 O116 の詳細解析

表 1 茨城県における豚由来病原性大腸菌の血清型、溶血性及び病原関連遺伝子

| O 群<br>血清型 | 年度(H)別分離株数 |    |    |    |    |    |    |    |    |     |      |    | 溶血性          |              | 病原因子検査**     |              |              |              |              |             |             |              |            |  |
|------------|------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|------|----|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|--------------|------------|--|
|            |            |    |    |    |    |    |    |    |    |     |      |    | +            | -            | 毒素因子         |              |              |              |              | 付着因子        |             |              |            |  |
|            | 18         | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 計   | 割合   | LT |              |              | STa          | STb          | Stx1         | Stx2e        | EAST1        | F4          | F5          | F18          | eae        |  |
| O116       |            | 6  | 4  | 5  | 5  | 11 |    | 3  | 3  | 37  | 34.3 | 37 | 36<br>(97.3) | 37<br>(100)  | 36<br>(97.3) | 37<br>(100)  | 22<br>(59.5) |              |              |             | 37<br>(100) |              |            |  |
| O139       | 1          |    | 2  | 3  | 2  |    | 2  | 1  | 1  | 12  | 11.1 | 12 | 2<br>(16.7)  | 1<br>(8.3)   | 1<br>(8.3)   | 11<br>(91.7) | 2<br>(16.7)  |              |              |             | 12<br>(100) |              |            |  |
| O149       | 1          | 1  |    | 2  |    | 3  | 1  | 1  | 1  | 10  | 9.3  | 10 | 9<br>(90)    | 2<br>(20)    | 3<br>(30)    |              | 8<br>(80)    | 9<br>(90)    | 1<br>(10)    |             |             |              |            |  |
| O98        | 2          | 3  |    |    |    |    |    |    |    | 6   | 5.6  | 6  |              | 6<br>(100)   | 6<br>(100)   | 6<br>(100)   |              |              |              |             | 6<br>(100)  |              |            |  |
| O147       |            |    |    |    |    | 4  | 1  |    |    | 5   | 4.6  | 5  | 5<br>(100)   |              | 1<br>(20)    |              | 5<br>(100)   |              |              |             | 5<br>(100)  |              |            |  |
| O45        |            |    |    | 2  |    | 1  | 1  |    |    | 4   | 3.7  | 2  | 2            | 3<br>(75)    | 2<br>(50)    |              |              |              | 1<br>(25)    | 2<br>(50)   | 2<br>(50)   |              |            |  |
| O56        |            | 1  | 1  | 1  |    |    |    |    |    | 3   | 2.8  | 2  | 1            | 2<br>(66.7)  | 2<br>(66.7)  | 2<br>(66.7)  |              |              |              |             | 2<br>(66.7) | 1<br>(33.3)  |            |  |
| O8         |            |    |    |    |    | 1  |    |    | 2  | 3   | 2.8  | 1  | 2            | 2<br>(66.7)  | 1<br>(33.3)  | 1<br>(33.3)  |              |              |              |             | 1<br>(33.3) |              |            |  |
| O9         |            |    |    |    |    | 1  | 1  |    |    | 2   | 1.9  |    | 2            | 2<br>(100)   | 1<br>(50)    |              |              | 1<br>(50)    | 1<br>(50)    |             |             |              |            |  |
| O141       |            |    |    |    |    | 2  |    |    |    | 2   | 1.9  | 2  |              |              |              | 2<br>(100)   |              |              |              |             | 2<br>(100)  |              |            |  |
| O121       |            |    |    |    | 1  |    | 1  |    |    | 2   | 1.9  | 2  |              |              |              | 2<br>(100)   | 2<br>(100)   |              |              |             | 2<br>(100)  |              |            |  |
| O2         |            | 1  | 1  |    |    |    |    |    |    | 2   | 1.9  | 2  |              |              |              | 2<br>(100)   |              |              |              |             |             |              |            |  |
| O157       |            |    | 1  |    |    |    |    |    |    | 1   | 0.9  | 1  |              | 1<br>(100)   | 1<br>(100)   |              |              |              |              |             | 1<br>(100)  |              |            |  |
| O35        |            |    |    | 1  |    |    |    |    |    | 1   | 0.9  | 1  |              | 1<br>(100)   | 1<br>(100)   |              | 1<br>(100)   |              |              |             | 1<br>(100)  |              |            |  |
| O103       |            |    |    | 1  |    |    |    |    |    | 1   | 0.9  |    | 1            |              |              | 1<br>(100)   | 1<br>(100)   |              |              |             | 1<br>(100)  |              |            |  |
| O86        |            |    |    |    |    |    | 1  |    |    | 1   | 0.9  | 1  |              | 1<br>(100)   | 1<br>(100)   |              |              |              |              |             | 1<br>(100)  |              |            |  |
| O142       |            |    |    |    |    |    | 1  |    |    | 1   | 0.9  | 1  |              |              |              | 1<br>(100)   |              |              |              |             |             |              |            |  |
| O159       |            |    |    |    |    |    |    | 1  |    | 1   | 0.9  | 1  |              | 1<br>(100)   | 1<br>(100)   |              |              |              |              |             | 1<br>(100)  |              |            |  |
| OUT*       |            |    | 1  | 1  | 3  | 2  | 4  | 3  |    | 14  | 13.0 | 10 | 4            | 6<br>(42.9)  | 8<br>(57.1)  | 3<br>(21.4)  | 9<br>(64.3)  | 2<br>(14.2)  |              | 7<br>(50)   | 1<br>(7.1)  |              |            |  |
| 全株         | 4          | 12 | 9  | 16 | 9  | 26 | 12 | 9  | 11 | 108 | 100  | 96 | 12           | 62<br>(57.4) | 66<br>(61.1) | 60<br>(55.6) | 1<br>(0.9)   | 71<br>(65.7) | 50<br>(46.3) | 10<br>(9.3) | 3<br>(2.8)  | 80<br>(74.1) | 5<br>(4.6) |  |

\* : UT は Untypable \*\* : ( ) 内は%

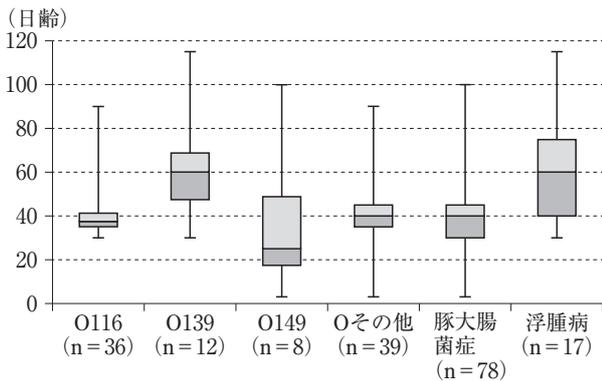


図 1 血清型と疾病別の発生日齢分布 (箱ひげ図)

豚大腸菌症または浮腫病と診断された際の分離株 (O116 : 36 株, O139 : 12 株, O149 : 8 株, Oその他 : 39 株, 豚大腸菌症 : 78 株, 浮腫病 : 17 株) について発生日齢の分布を比較した。

PCR 法により, *LT*, *STa*, *STb*, *Stx1*, *Stx2e*, *EAST1*, *F4*, *F5*, *F18*, *eae* の検出を行った。

薬剤感受性試験 : 供試菌株について, アンピシリン (ABPC), アモキシシリン (AMPC), セファゾリン (CEZ), セフトキシム (CTX), カナマイシン (KM), ストレプトマイシン (SM), ネオマイシン (FRM), ゲンタマイシン (GM), テトラサイクリン (TC), オキシテトラサイクリン (OTC), ドキシサイクリン (DOXY), ナリジクス酸 (NA), ノルフロキサシン (NFLX), エンロフロキサシン (ERFX), オルビフロキサシン (OBFX), シプロフロキサシン (CPF), コリスチン (CL), ST 合剤 (ST), クロラムフェニコール (CP) の 9 系統 19 薬剤を用いた薬剤感受性試験を実施した。なお AMPC, FRM, OTC, DOXY, NFLX, ERF, OBFX, CL は既報 [1] から今回新たに追加した薬剤である。ABPC, AMPC, CEZ, CTX, KM, SM, FRM, GM, TC, OTC, DOXY, NA, NFLX, CPF, ST, CP は薬剤感

表2 豚由来病原性大腸菌の血清型別の薬剤耐性の分布 (%)

| 血清型         | ペニシリン系 |      | セファゾリン系 |      | アミノグリコシド系 |      |      |      | テトラサイクリン系 |      |      | キノロン系 | フルオロキノロン系 |      |      |      | その他  |      |      |
|-------------|--------|------|---------|------|-----------|------|------|------|-----------|------|------|-------|-----------|------|------|------|------|------|------|
|             | ABPC   | AMPC | CEZ     | CTX  | KM        | SM   | FRM  | GM   | TC        | OTC  | DOXY | NA    | NFLX      | ERFX | OBFX | CPFX | CL   | ST   | CP   |
| O116 (n=37) | 67.6   | 78.4 | 43.2    | 2.7  | 18.9      | 94.6 | 18.9 | 24.3 | 83.8      | 86.5 | 64.9 | 100   | 100       | 100  | 100  | 100  | 32.4 | 73.0 | 78.4 |
| O139 (n=12) | 66.7   | 66.7 | 58.3    |      | 8.3       | 83.3 | 8.3  | 8.3  | 75.0      | 75.0 | 50.0 | 16.7  | 8.3       |      | 8.3  | 8.3  | 25.0 | 33.3 | 58.3 |
| O149 (n=10) | 40.0   | 40.0 | 10.0    |      | 50.0      | 60.0 | 50.0 | 10.0 | 40.0      | 50.0 | 50.0 | 60.0  | 60.0      | 60.0 | 50.0 |      |      | 20.0 | 20.0 |
| O98 (n=6)   | 100    | 100  | 50.0    |      | 16.7      | 83.3 | 16.7 |      | 100       | 100  | 16.7 | 83.3  | 83.3      | 33.3 | 83.3 | 83.3 | 100  | 100  | 16.7 |
| O147 (n=5)  | 60.0   | 60.0 | 40.0    |      | 40.0      | 100  | 40.0 | 20.0 | 80.0      | 80.0 | 80.0 | 100   |           |      |      |      | 100  | 100  | 100  |
| O45 (n=4)   |        |      |         |      | 25.0      | 75.0 | 25.0 |      | 100       | 100  | 25.0 |       |           |      |      |      | 25.0 | 50.0 | 25.0 |
| O56 (n=3)   | 66.7   | 66.7 | 33.3    |      | 33.3      | 66.7 |      |      | 100       | 100  | 100  |       |           |      |      |      | 66.7 | 66.7 | 33.3 |
| O8 (n=3)    | 100    | 100  | 33.3    |      | 66.7      | 100  | 66.7 | 33.3 | 33.3      | 33.3 |      | 33.3  | 33.3      |      |      | 33.3 | 66.7 | 66.7 | 100  |
| O9 (n=2)    | 50.0   | 50.0 |         |      | 100       | 100  | 100  |      | 100       | 100  | 100  | 50.0  |           | 50.0 | 50.0 |      | 50.0 | 100  | 100  |
| O141 (n=2)  | 100    | 100  | 100     |      | 50.0      | 100  | 50.0 |      |           |      |      |       |           | 50.0 |      |      | 50.0 | 50.0 | 50.0 |
| O121 (n=2)  | 100    | 100  |         |      | 100       | 100  | 100  |      | 100       | 100  | 100  |       |           |      |      |      |      | 50.0 | 100  |
| O2 (n=2)    |        |      |         |      |           | 100  |      | 50.0 | 100       | 100  | 50.0 | 50.0  |           |      |      |      |      | 50.0 | 50.0 |
| O157 (n=1)  |        |      |         |      |           | 100  |      | 100  |           |      |      |       |           |      |      |      |      | 100  | 100  |
| O35 (n=1)   | 100    | 100  |         |      | 100       |      | 100  |      | 100       | 100  |      |       |           |      |      |      | 100  | 100  | 100  |
| O103 (n=1)  |        |      |         |      |           | 100  |      |      |           |      |      |       |           |      |      |      |      |      |      |
| O86 (n=1)   | 100    | 100  | 100     |      | 100       | 100  | 100  | 100  | 100       | 100  |      | 100   | 100       | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  |
| O142 (n=1)  |        |      |         |      | 100       | 100  |      | 100  | 100       | 100  |      |       |           |      |      |      |      | 100  | 100  |
| O159 (n=1)  | 100    | 100  |         |      | 100       | 100  | 100  | 100  | 100       | 100  |      |       |           |      |      |      |      | 100  | 100  |
| OUT (n=14)  | 85.7   | 85.7 | 57.1    | 14.3 | 50.0      | 92.9 | 42.9 | 21.4 | 64.3      | 71.4 | 57.1 | 64.3  | 50.0      | 50.0 | 50.0 | 50.0 | 35.7 | 42.9 | 71.4 |
| 全株 (n=108)  | 65.7   | 69.4 | 38.9    | 2.8  | 33.3      | 88.0 | 30.6 | 19.4 | 75.0      | 77.8 | 52.8 | 63.0  | 53.7      | 50.9 | 53.7 | 52.8 | 38.0 | 61.1 | 64.8 |

受性ディスク (センシディスク, Becton, Dickinson and Company, U.S.A.), ERFX, OBFX は薬剤感受性ディスク (VKB ディスク, 栄研化学株, 東京) を用いたディスク拡散法を実施し, CL のみ微量液体希釈法による MIC 測定を実施した. 判定は, CL のみ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing ([http://aurosan.de/wp-content/uploads/2015/05/v\\_6.0\\_Breakpoint\\_table.pdf](http://aurosan.de/wp-content/uploads/2015/05/v_6.0_Breakpoint_table.pdf)) の基準に準じ, その他薬剤については Clinical and Laboratory Standards Institute (<https://clsi.org/>) の基準に準じた. また, O 群血清型ごとに薬剤耐性菌分布率, 耐性薬剤数について比較, 有意差の有無について分析した.

**発生状況調査:** 主要な血清型を中心に症状, 診断名, 発生の季節, 発生日齢の傾向を調べた.

**PFGE による分子疫学的解析:** 血清型 O116 株について既報 [3] に従いサンプルプラグを作成後, 市販の制限酵素 (Xba I, タカラバイオ株, 滋賀) で 37°C, 6 時間反応させた. 泳動装置 (CHEF-DR III, Bio-Rad,

U.S.A.) を用い, 14°C の Tris-borate-EDTA (TBE) 緩衝液×0.5 中で, 電圧 6.0V/cm, パルスタイム 5~50sec の条件下で 22 時間泳動した [4, 5]. なお PFGE パターン分類は Tenover らの基準 [6] に従い, バンドの相違 3 本以内の菌株を疫学的に近縁 (closely related), バンドの相違 4~6 本の菌株を疫学的関連の可能性あり (possibly related) とした.

**FQ 系抗菌剤使用履歴調査:** O116 が分離された養豚農家において, FQ 系抗菌剤の使用状況についての聞き取り調査を行った.

## 成 績

**O 群血清型別:** 供試菌株は O 型別不能 (OUT) を除き, 18 種の血清型に型別された (表 1). おもな O 群血清型は O116 が 37 株 (34.3%) で最も多く, ついで O139 が 12 株 (11.1%), O149 が 10 株 (9.3%) であり, その他 15 種類の血清型が 35 株 (32.4%), OUT が 14 株 (13.0%) であった.

茨城県における主要血清型 O116 の詳細解析

表3 茨城県における豚大腸菌症及び浮腫病の発生状況

| O 群血清型     | 株数  | 発生状況*           |                 |                  |                  |              |              |              |              |              |            |             |            | 診断名          |     |     |    |
|------------|-----|-----------------|-----------------|------------------|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------|-------------|------------|--------------|-----|-----|----|
|            |     | 季節              |                 |                  |                  | 地域           |              |              |              | 症状           |            |             |            | 豚大腸菌症        | 浮腫病 | 他疾病 |    |
|            |     | 春季<br>3月～<br>5月 | 夏季<br>6月～<br>8月 | 秋季<br>9月～<br>11月 | 冬季<br>12月～<br>2月 | 北部           | 東部           | 南部           | 西部           | 下痢           | 嘔吐         | 神経<br>症状    | 眼瞼<br>浮腫   |              |     |     | 死亡 |
| O116       | 37  | 13<br>(35.1)    | 3<br>(8.1)      | 15<br>(40.5)     | 6<br>(16.2)      | 12<br>(32.4) | 12<br>(32.4) | 9<br>(24.3)  | 4<br>(10.8)  | 30<br>(81.1) | 2<br>(5.4) |             |            | 31<br>(83.8) | 36  |     | 1  |
| O139       | 12  | 3<br>(25)       | 2<br>(16.7)     | 3<br>(25)        | 4<br>(33.3)      |              | 1<br>(8.3)   | 5<br>(41.7)  | 6<br>(50)    | 3<br>(25)    |            | 1<br>(8.3)  | 2<br>(1.7) | 10<br>(83.3) | 3   | 9   |    |
| O149       | 10  | 4<br>(40)       | 2<br>(20)       | 2<br>(20)        | 2<br>(20)        | 1<br>(10)    | 4<br>(40)    | 3<br>(30)    | 2<br>(20)    | 3<br>(30)    | 1<br>(10)  |             |            | 9<br>(90)    | 8   |     | 2  |
| O98        | 6   | 2<br>(33.3)     | 1<br>(16.7)     | 2<br>(33.3)      | 1<br>(16.7)      |              |              |              | 6<br>(100)   | 5<br>(83.3)  |            | 2<br>(33.3) |            | 2<br>(33.3)  | 2   | 4   |    |
| O147       | 5   | 2<br>(40)       | 1<br>(20)       | 1<br>(20)        | 1<br>(20)        |              |              | 5<br>(100)   |              | 3<br>(60)    |            |             |            | 5<br>(100)   | 5   |     |    |
| O45        | 4   |                 |                 | 3<br>(75)        | 1<br>(25)        | 1<br>(25)    |              | 2<br>(50)    | 1<br>(25)    | 2<br>(50)    |            |             |            | 4<br>(100)   | 3   |     | 1  |
| O56        | 3   | 1<br>(33.3)     |                 | 2<br>(66.7)      |                  | 2<br>(66.7)  |              | 1<br>(33.3)  |              | 2<br>(66.7)  |            |             |            |              | 3   |     |    |
| O8         | 3   | 2<br>(66.7)     |                 |                  | 1<br>(33.3)      | 1<br>(33.3)  | 1<br>(33.3)  |              |              | 3<br>(100)   |            |             |            | 3<br>(100)   | 2   |     | 1  |
| O9         | 2   |                 |                 | 1<br>(50)        | 1<br>(50)        | 1<br>(50)    |              |              | 1<br>(50)    | 1<br>(50)    |            |             |            | 2<br>(100)   | 2   |     |    |
| O141       | 2   |                 |                 | 1<br>(50)        | 1<br>(50)        |              |              | 2<br>(100)   |              |              |            | 2<br>(100)  | 2<br>(100) |              |     | 2   |    |
| O121       | 2   | 1<br>(50)       |                 | 1<br>(50)        |                  | 1<br>(50)    | 1<br>(50)    |              |              |              |            | 1<br>(50)   |            | 2<br>(100)   | 1   |     | 1  |
| O2         | 2   | 1<br>(50)       |                 |                  | 1<br>(50)        | 1<br>(50)    |              |              | 1<br>(50)    |              |            | 1<br>(50)   |            | 2<br>(100)   |     |     | 2  |
| O157       | 1   |                 |                 |                  | 1<br>(100)       | 1<br>(100)   |              |              |              | 1<br>(100)   |            |             |            |              | 1   |     |    |
| O35        | 1   |                 | 1<br>(100)      |                  |                  | 1<br>(100)   |              |              |              | 1<br>(100)   |            |             |            |              | 1   |     |    |
| O103       | 1   |                 |                 | 1<br>(100)       |                  | 1<br>(100)   |              |              |              |              |            |             |            | 1<br>(100)   | 1   |     |    |
| O86        | 1   | 1<br>(100)      |                 |                  |                  |              | 1<br>(100)   |              |              | 1<br>(100)   |            |             |            |              |     |     | 1  |
| O142       | 1   |                 |                 |                  | 1<br>(100)       | 1<br>(100)   |              |              |              |              |            |             |            | 1<br>(100)   |     |     | 1  |
| O159       | 1   |                 | 1<br>(100)      |                  |                  |              |              | 1<br>(100)   |              | 1<br>(100)   |            |             |            |              |     |     | 1  |
| OUT        | 14  | 5<br>(35.7)     | 1<br>(7.1)      | 6<br>(42.9)      | 2<br>(14.3)      | 3<br>(21.4)  | 4<br>(28.6)  | 4<br>(28.6)  | 3<br>(21.4)  | 7<br>(50)    |            | 1<br>(7.1)  | 1<br>(7.1) | 12<br>(85.7) | 10  | 2   | 2  |
| 全株         | 108 | 35<br>(32.4)    | 12<br>(11.1)    | 38<br>(35.2)     | 23<br>(21.3)     | 27<br>(25)   | 29<br>(26.9) | 28<br>(25.9) | 24<br>(22.2) | 63<br>(58.3) | 3<br>(2.8) | 8<br>(7.4)  | 5<br>(4.6) | 84<br>(77.8) | 78  | 17  | 13 |
| O116<br>以外 | 71  | 22<br>(31)      | 9<br>(12.7)     | 23<br>(32.4)     | 17<br>(23.9)     | 15<br>(21.1) | 17<br>(23.9) | 19<br>(26.8) | 20<br>(28.2) | 33<br>(46.5) | 1<br>(1.4) | 8<br>(11.3) | 5<br>(7.1) | 53<br>(74.6) | 42  | 17  | 12 |

\* : ( ) 内は%

**溶血性の確認**：供試菌株 108 株中、完全溶血を呈したのは 96 株 (88.9%) で、残りの 12 株 (11.1%) について溶血性は認められなかった。主要 3 血清型 (O116, O139, O149) については全株で完全溶血が認められた (表 1)。

**病原関連遺伝子検出**：血清型ごとの保有率をみると、O116 は *LT* (97.3%), *STa* (100%), *STb* (97.3%), *Stx2e* (100%), *EAST1* (59.5%), *F18* (100%), O139 は *Stx2e* (91.7%), *F18* (100%), O149 は *LT* (90.0%), *EAST1* (70.0%), *F4* (90.0%) の保有率がそれぞれ高かった (表 1)。

**薬剤感受性試験**：供試菌株全体及び各血清型の薬剤耐性菌分布率を表 2 に示す。全体では 19 薬剤中 13 薬剤 (ABPC, AMPC, SM, TC, OTC, DOXY, NA,

NFLX, ERFX, OBFX, CPFX, ST, CP) で耐性菌分布率が 50% 以上で、中でも SM, TC, OTC では 70% 以上であった。一方で第 3 世代セフェム系抗菌剤である CTX では 2.8%, アミノグリコシド系抗菌剤の GM では 19.4% であった。血清型ごとにみると、主要 3 血清型 (O116, O139, O149) では 19 薬剤中 16 薬剤で O116 の薬剤耐性菌分布率が最も高かった。特に、すべての O116 株は FQ 系抗菌剤に耐性を示し、O149 と O98 株においても 50% 以上の株が耐性を示した。一方、O139 における FQ 系抗菌剤に対する耐性は 10% 以下であった。

各血清型における耐性薬剤数の平均値は、19 薬剤中、O116 が 12.7 剤 (8~17 剤), O139 が 6.6 剤 (1~11 剤), O149 が 7.3 剤 (0~13 剤), その他血清型は 9.2 剤 (1

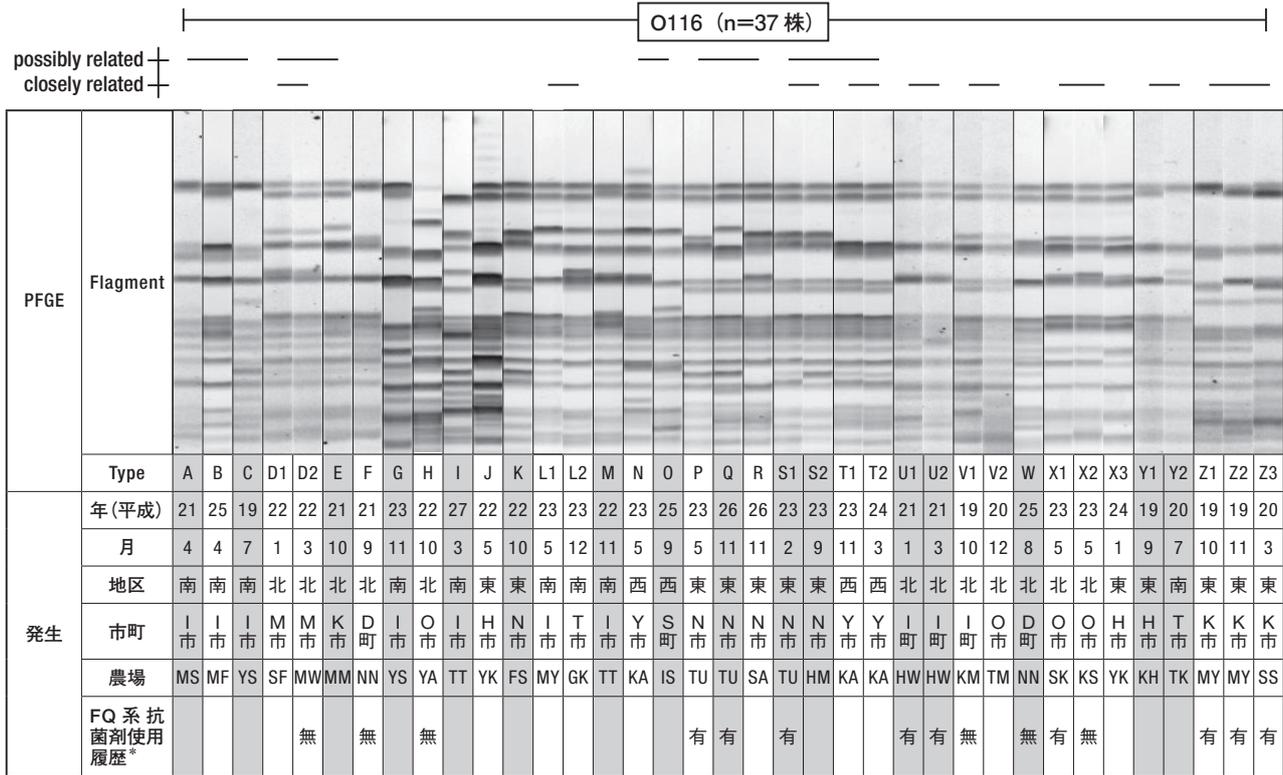


図2 O116のPFGEパターンと発生年月日、発生地域、抗菌剤使用履歴等情報  
\*：空白は使用履歴不明

～17 剤) であり、O116はO139、O149に比べて多剤に耐性であった (*t* 検定: それぞれ  $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ )。耐性薬剤数が最も多かったのはO116とO86の17剤であった。

**発生状況調査:** 表3のとおり、O116、その他血清型ともに発生時期は春季(3～5月)と秋季(9～11月)の割合が高かった。またO116は特定の地域に偏ることなく発生がみられ、おもに下痢を主徴とする豚大腸菌症を引き起こし、浮腫病と診断される事例はなかった。発生日齢(図1)の中央値はO116が38日(30～90日)、O139が60日(30～115日)、O149が25日(3～100日)、その他血清型は40日(3～90日)、豚大腸菌症が40日(3～100日)、浮腫病が60日(30～115日)であった。

**PFGEによる分子疫学的解析:** O116のPFGEパターンは、37株で26パターン(A～Z)に分類された(図2)。

**FQ系薬剤使用履歴調査:** O116の37株は37事例28農場(1回再発: 5農場, 2回再発: 2農場)から分離されているが、そのうち少なくとも5農場(KM, NN, MW, YA, KS)で、FQ系薬剤の使用履歴がなかった(図2)。

### 考 察

国内での調査[1]により、O116は豚由来大腸菌において第3位の分離頻度を占め、平成17年以降に確認

されている血清型である。茨城県では、O116は平成19年に初めて確認された後、最も多く分離される血清型である(表1)。

病原関連遺伝子について(表1)、付着因子はO8とOUTを除き、少なくとも1因子の保有が認められた。主要3血清型のうち、毒素因子のうち高率な保有がみられたのはO139で1因子(*Stx2e*)、O149で2因子(*LT*, *EAST1*)であったのに対し、O116では5因子(*LT*, *STa*, *STb*, *Stx2e*, *EAST1*)であった。浮腫病起病性の豚大腸菌株の多くが*Stx2e*を産生するとの報告[7]がされているが、O116においては*Stx2e*を保有しているにも関わらず浮腫病の病変を引き起こした症例はみられず、そのほとんどが下痢や急死を呈す豚大腸菌症と診断されていた。毒素因子の種類・保有数と病原性との関連については不明な点が多く、今後さらなる知見を積み重ね検証していく必要がある。

溶血性について、国内の豚由来病原性大腸菌は豚大腸菌症、浮腫病のどちらの分離株においても完全溶血株が多く、診断指標の1つとなる[8]。本県の株も全体で88.9%と、血清型を問わずほとんどの株で完全溶血が認められたが、今回、新たにO116でもすべての株で完全溶血を示すことが明らかとなった。しかしO116を除く主要血清型(O139, O149)においても同様に、全株が完全溶血を示していることから、溶血性は病原性の指標

にはなるが、O116 を含めた血清型の判別に用いることは困難であることが推察された。

薬剤感受性試験結果について、供試菌全体（108 株）では 19 薬剤中 13 薬剤ですでに耐性菌分布率が 50% を超えていること、また、特に主要血清型 O116 は、第 2 次選択薬剤として承認されている FQ 系抗菌剤において全株で阻止円を形成せず、耐性薬剤数も平均 12.7 剤（19 薬剤中）と多剤耐性傾向であることから、茨城県内で発生する豚大腸菌症・浮腫病は治療薬の選択肢が少なく、第 1 次選択薬投与の段階で効果のみられない事例も多く存在しているものと予想される。また、O116 以外についても、O149 のうち 60.0% が FQ 耐性であり、全国の O149 の FQ 耐性菌分布率（約 10%）[1] と比較して高く、全国的に分離報告の少ない O98 [8] が 4 番目に多く分離され、その 83.3% が FQ 耐性であるなど、本県の上位血清型は FQ 耐性を高率に保有しているのが特徴的である（表 2）。O116 はそのほとんどが下痢、急死による豚大腸菌症を引き起こし、発生も離乳後 1～2 週間に集中している特徴があった（表 1、図 1）。しかし、離乳後の下痢や急死は、その他血清型においても同様に発生しており、発生季節にも大きな違いがみられないことから、発生状況のみで O116 を含む血清型全般の特定は困難である。そのため O116、O149、O98 などの FQ 耐性菌分布率の高い血清型株が主原因である県内の豚大腸菌症において、FQ 系抗菌剤を用いた治療は現実的ではない。CTX などの第 2 次選択薬を除き、今回用いた薬剤の中では GM が 19.4% と最も耐性菌分布率が低く（表 2）、治療効果のみられる可能性が高いが、耐性株も一定数は存在しているため、的確な薬剤の選択には、早期の病性鑑定と薬剤感受性試験が必須である。O116、O149、O98 のような FQ 耐性株が多い血清型がある一方で、O139 のように FQ 耐性株の少ない血清型も存在したが、血清型ごとの耐性獲得状況の違いに関しては今後、農場の抗菌剤使用状況を含めた、詳細な調査が必要である。

前述のとおり O116 は 37 株に共通して FQ 系抗菌剤に対して阻止円不形成であり、これが当所では従来経験のない特徴であったことから、当初、疫学的に近縁な O116 が拡散し浸潤しているものと推察された。しかし PFGE 解析を実施した結果、PFGE パターンは 37 株で 26 種類と多様に分かれたため、同一のクローンが広まった可能性は否定された。また FQ 系抗菌剤の使用履歴のない 5 農場においても O116 による豚大腸菌症は発生しており、各発生農場で新たな FQ 耐性変異株が選択された可能性は低いと考えられる。そのうちの 2 株（D2、X2）についてはそれぞれ同一の PFGE パターンを示す FQ 耐性株（D1、X1）が他農場で分離されていることから、一部の O116 株が農場間で伝播した可能性も示唆

されている（図 2）。

国内獣医療分野における抗菌剤の推定販売量（<http://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/>）をみると、近年は全体の 5 割以上が養豚業界への販売で占められており、O116 株の多くが多剤耐性であることを考えると、農場での FQ 系以外の抗菌剤使用による選択圧で急速に県内に広まった可能性も考えられる。また、県内では主要血清型以外にも 17 薬剤に耐性の O86 などの多剤耐性菌が分離されており（表 2）、多剤耐性菌の増加には薬剤耐性プラスミドの伝達が大きく関与していることも考えられ、大腸菌間あるいは他の細菌との間でのプラスミドを介した薬剤耐性遺伝子の伝播、拡散についても、今後の調査を検討し、その薬剤耐性獲得状況を注視していく必要がある。

今回の調査により、O116 によって引き起こされる豚大腸菌症は菌の多剤耐性及び FQ 耐性の性質から、家畜生産において脅威となり得る血清型であることが示唆された。O116 は現在、茨城県を含め 7 県からの分離報告 [1] があり、すでにいくつかの県では本県のように短期間で主要血清型となっているが、今後、全国規模で浸潤が広がるようであれば、より大きな経済的損害をもたらされることが懸念される。2015 年 5 月の世界保健総会において、薬剤耐性に関するグローバル・アクション・プランが採択されたことを受け、国内でも薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン（<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000120769.pdf>）が策定されるなど、薬剤耐性菌対策は国内外で大きな課題となっている。そのような中で O116 のような多剤耐性菌が本県に浸潤している実態が明らかとなった現状をふまえ、家畜保健衛生所は O116 を含む薬剤耐性菌の存在について情報提供するとともに、抗菌剤の責任ある慎重使用の徹底を関連業者、関係獣医師及び飼養者へ促し、抗菌剤の有効性の維持と新たな耐性菌発生防止対策を徹底していく必要がある。今後は O116 が分離された農場について、環境調査及び発育ステージごとの O116 保菌調査等を行い、農場対策と県内の O116 清浄化につなげていく予定である。

## 引用文献

- [1] Kusumoto M, Hikoda Y, Fujii Y, Murata M, Miyoshi H, Ogura Y, Gotoh Y, Iwata T, Hayashi T, Akiba M : Emergence of a multidrug-resistant Shiga toxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* lineage in diseased swine in Japan, J Clin Microbiol, 54, 1074-1081 (2016)
- [2] Vu-Khac H, Holoda E, Pilipcinec E, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, López C, González EA, Blanco J : Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pig-

- lets with diarrhoea in Slovakia, *Vet J*, 174, 176-187 (2007)
- [3] Akiba M, Uchida I, Nishimori K, Tanaka K, Anzai T, Kuwamoto Y, Wada R, Ohya T, Ito H : Comparison of *Salmonella enterica* serovar Abortusequi isolates of equine origin by pulsed-field gel electrophoresis and fluorescent amplified fragment length polymorphism fingerprinting, *Vet Microbiol*, 92, 379-388 (2003)
- [4] Liesegang A, Tschäpe H : Modified pulsed-field gel electrophoresis method for DNA degradation-sensitive *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* strains, *Int J Med Microbiol*, 291, 645-648 (2002)
- [5] 和田昭仁, 寺嶋 淳, 渡辺治雄 : パルスフィールド電気泳動法 (PFGE) による分子疫学的同定法, *日本細菌学雑誌*, 52, 763-775 (1997)
- [6] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B : Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing, *J Clin Microbiol*, 33, 2233-2239 (1995)
- [7] 小林秀樹 : 豚の浮腫病—古くて新しい病気—, *All About Swine*, 28, 16-22 (2006)
- [8] 中澤宋生 : 大腸菌病, 豚病学, 柏崎 守ら編, 第4版, 328-337, 近代出版, 東京 (1999)

### Comparative Analysis of Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Diseased Swine in Ibaraki Prefecture, Japan: Analysis of the Most Prevalent Serogroup O116

Yuki FUJII<sup>1)†</sup>, Hitomi TANABE<sup>2)</sup>, Hiroto NISHINO<sup>3)</sup>, Yoshiko OTANI<sup>1)</sup>, Satoko TSUZUKU<sup>1)</sup>, Yoshinao OOUCHI<sup>1)</sup>, Masato AKIBA<sup>4)</sup> and Masahiro KUSUMOTO<sup>4)</sup>

- 1) *Ibaraki Prefectural Kenpoku Livestock Hygiene Service Center, 966-1 Nakagachicho, Mito, 310-0002, Japan*
- 2) *Ibaraki Prefectural Rokkou Livestock Hygiene Service Center, 1367-3 Hokota, Hokota, 311-1517, Japan*
- 3) *Ibaraki Prefecture Department of Agriculture, Livestock Division, 978-6 Kasaharacho, Mito, 310-8555, Japan*
- 4) *National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

#### SUMMARY

We analyzed 108 strains of pathogenic *Escherichia coli* isolated from diseased swine (sampled from 63 farms, 96 cases and 103 individuals) in Ibaraki Prefecture, Japan, between 2006 and 2014. The O serogroups of the 108 strains were determined using the agglutination test and the predominant serogroups were found to be O116 (34.3%), O139 (11.3%) and O149 (9.3%). The results of antimicrobial susceptibility testing showed that the O116 strains were resistant to many antimicrobials (12.7 on an average; 19 maximum), whereas strains O139 and O149 exhibited resistance to a lower number of antimicrobials (6.6 and 7.3 on average, respectively). Surprisingly, all O116 strains were resistant to fluoroquinolones. Most of the O116 strains showed epidemiologically unrelated PFGE patterns and there is no relation between the isolation of fluoroquinolone-resistant O116 and the use of fluoroquinolones on the farm as a result of a hearing investigation. In this study, we demonstrated that O116 is a multidrug-resistant serogroup that can pose a threat to livestock production. Selective use of antimicrobials and detailed epidemiological studies are required to prevent further dissemination of O116 strains on farms. — Key words : Colibacillosis in swine, Enterotoxigenic *Escherichia coli*, fluoroquinolones, multidrug-resistant bacteria, Serogroup O116.

† Correspondence to : Yuki FUJII (Ibaraki Prefectural Kenpoku Livestock Hygiene Service Center)

966-1 Nakagachicho, Mito, 310-0002, Japan

TEL 029-225-3241 FAX 029-224-6661 E-mail : y.hujii@pref.ibaraki.lg.jp

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 70, 643~649 (2017)