

18 鶏から分離された大腸菌の性状と病原関連遺伝子の保有状況

東青地域県民局地域農林水産部青森家畜保健衛生所

○太田智恵子 齋藤 豪
相馬 亜耶 水島 亮
林 敏展 菅原 健
中村 成宗 中島 聡
盛田 淳三

1 はじめに

鶏大腸菌症は、鶏病原性大腸菌 (*Avian pathogenic Escherichia coli* (以下、APEC)) による鶏の感染症で、気嚢炎、腹膜炎など様々な病態を示す。

APECは腸管以外の臓器に侵入し宿主を発症させることから、腸管外病原性大腸菌 (*Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli* (以下、ExPEC)) の一種とされ、血清型 0-1、0-2、0-78 の分離報告が多い^{1) 2)}。

また、鶏大腸菌症から分離される株と、健康鶏糞便中から分離される大腸菌では病原関連遺伝子の保有状況に差があるとの報告がある¹⁾が、本県では遺伝子の保有状況に関しては報告されていない。

今回、これまでに保存された鶏から分離された大腸菌を用い、調査を実施したので概要を報告する。

2 材料と方法

(1) 材料

鶏大腸菌症由来株 39 株を材料とした。その内訳は平成 25 年から 26 年に発生があった採卵鶏 1 農場 17 株、平成 17 年から 26 年

に発生があった肉用鶏 6 農場 22 株である。

また、健康鶏由来株は 11 株で、採卵鶏が平成 21 年度分離の 7 農場各 1 株、肉用鶏は平成 23 年 2 農場 2 株を用いた。

さらに、大腸菌症発生農場の環境由来株 3 株、内訳は、埃、ねずみ糞、水各 1 株を用いた。

(2) 方法

血清型別試験は、市販の病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研(株))を用い常法に従い実施した。

糖分解性状試験は、16 種類の糖 (アドニトール (ADO)、アラビノース (ARA)、フルクトース (FLU)、ガラクトース (GAL)、グルコース (GLU)、イノシトール (INO)、ラクトース (LAC)、マルトース (MAL)、マンニット (MAN)、マンノース (MNO)、ラムノース (RAM)、サッカロース (SAC)、ソルビトール (SOL)、トレハロース (TRE)、キシロース (XYL)) について、常法により実施した。

薬剤感受性試験は、12 種類の薬剤 (アンピシリン (ABPC)、セファゾリン (CEZ)、セ

フォタキシム (CTX)、ストレプトマイシン (SM)、ゲンタマイシン (GM)、カナマイシン (KM)、テトラサイクリン (TC)、ナリジクス酸 (NA)、シプロフロキサシン (CPFX)、コリスチン (CL)、クロラムフェニコール (CP)、トリメトプリム (TMP)) について、ドライプレート (栄研化学 (株)) を用い、微量液体希釈法により実施した。

病原関連遺伝子の検索は、InstaGene DNA 精製マトリックス (Bio-Rad) で DNA を抽出後、Christa Ewer らの方法³⁾により 8 遺伝子 (付着因子 2 種 (*papC*、*tsh*)、鉄獲得能 2 種 (*irp2*、*iucD*)、血清抵抗性 1 (*iss*)、毒素因子 2 種 (*astA*、*vat*)、遺伝子伝達性 1 種 (*cva/cvi*) について、マルチプレックス PCR を実施した。

3 結果

(1) 血清型別試験

表 1 に示すとおり、大腸菌症由来株では、採卵鶏 17 株のうち 16 株、肉用鶏では、22 株中 10 株が O-78 に分類され、39 株中 26 株 (66.7%) が O-78 であった。

その他の株は、今回の検査では自家凝集や凝集が認められないなど判定出来なかった。

表 1 血清型別結果

由来	用途	農場	血清型	菌株数	O78の割合	
大腸菌症	採卵鶏	A	O78	16/17	66.7% (26/39)	
			UT	1/17		
	肉用鶏	B	O78	5/5		
			C	O78		5/5
			D	UT		3/3
			E	UT		3/3
			F	UT		3/3
健康鶏	採卵鶏	H~N	UT	7/7	0	
	肉用鶏	O,P	UT	4/4	0	
大腸菌症	環境	A	UT	3/3	0	

UT: 判定不能

(2) 糖分解性状試験

表 2 に示すとおり大腸菌症由来株では、マルトースの分解能、サッカロースの分解能の違いにより 3 つのパターンに分類された。

表 2 糖分解性状試験結果

由来	農場	ADO	INO	MAL	MAN	SAC
大腸菌症	A,B,E,F	-	-	+	+	-
	C	-	-	-	+	+
	D,G	-	-	+	+	+
健康鶏	H,J,O	-	-	+	+	-
	I	+	-	+	-	-
	K,L,M,N	-	-	+	+	+
環境	P	-	+	+	-	-
	糞、水	-	-	+	+	-
	埃	-	+	+	+	+

健康鶏由来株では、アドニトール、イノシトール、マンニット、サッカロースの分解性状の違いにより 4 つのパターンに分類された。

環境由来株についても、イノシトール、サッカロースの分解性状に違いが認められた。

(3) 薬剤感受性試験

大腸菌症由来株では、表 3 に示すとおり、特に、テトラサイクリンで 97.4%、ナリジクス酸で 76.9% と高い耐性率が認められた。

また、A 農場では、ニューキノロン系の薬剤に、E 農場においてはセフェム系薬剤に耐性の株も認められた。また多くの株に多剤耐性の傾向が認められた。

表3 薬剤感受性試験結果

大腸菌症由来株

農場	ABPC	CEZ	CTX	SM	KM	TC	NA	CPFX	CP
A	S	S	S	S	S	17/17	17/17	2/17	S
B	S	S	S	S	S	5/5	5/5	S	S
C	S	S	S	S	S	5/5	5/5	S	S
D	1/4	S	S	S	2/4	3/4	2/4	S	1/4
E	3/3	1/3	1/3	2/3	2/3	3/3	S	S	1/3
F	1/3	S	S	S	S	3/3	S	S	S
G	S	S	S	S	S	3/3	1/2	S	S
計 (%)	5/39 (12.8)	1/39 (2.5)	1/39 (2.5)	3/39 (7.6)	4/39 (10.3)	38/39 (97.4)	30/39 (76.9)	2/39 (5.1)	2/39 (5.1)

S: 感受性、耐性株数/検査株数

表4 薬剤感受性試験結果

健康鶏、環境由来株

農場	ABPC	CEZ	CTX	SM	KM	TC	NA	CPFX	CP
H	S	S	S	S	1/1	1/1	S	S	S
I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
J	1/1	S	S	S	S	S	S	S	S
K	1/1	S	S	S	S	S	S	S	S
L	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M	1/1	1/1	1/1	S	S	S	S	S	S
N	1/1	S	S	S	S	1/1	S	S	S
O	S	S	S	S	S	1/2	2/2	S	S
P	2/2	2/2	2/2	S	S	S	2/2	S	S
計 (%)	6/11 (54.5)	3/11 (27.3)	3/11 (27.3)	0 (0)	1/11 (9.1)	3/11 (27.3)	4/11 (36.4)	0 (0)	0 (0)
環境	1/3	1/3	S	S	S	1/3	1/3	S	S

S: 感受性、耐性株数/検査株数

健康鶏由来株では、表4に示すとおり農場により感受性の傾向に違いはあるが、供試した薬剤全てに感受性の株も2農場で認められた。

また、ストレプトマイシン、ニューキノロン、クロラムフェニコールに対しては全て感受性であり、大腸菌症由来株との相違が認められた。しかし、ベータラクタム系の薬剤に耐性の株の割合が高く、アンピシリンが54.5%、セファゾリン、セフォタキシムで27%の耐性が認められた。

(4) 病原関連遺伝子保有状況

病原関連遺伝子の保有状況は、大腸菌症由来株では、図1のように1から7種類の遺伝子を保有し、11パターンに分類された。

遺伝子の保有パターンは表5に示すとおり、付着因子(*tsh*)、鉄獲得能(*irp2*、*iucD*)、血清抵抗性(*iss*)の4種類の遺伝子を保有するパターンが最も多く27株であった。

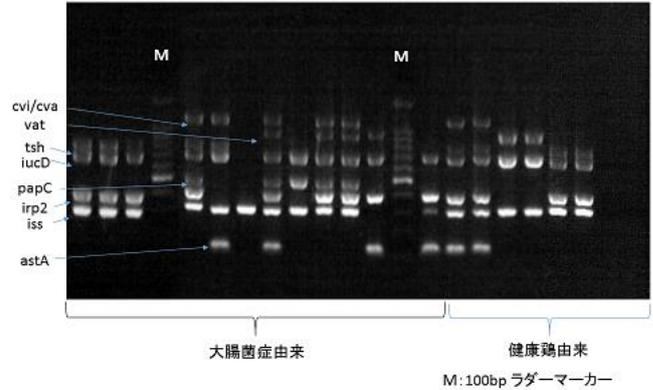


図1 病原関連遺伝子PCR泳動像

表5 病原関連遺伝子保有状況

	付着因子		鉄獲得		血清抵抗性	毒素因子		遺伝子伝達性	株数
	papC	tsh	iucD	irp2	iss	vat	astA	cva/cvi	
大腸菌症	-	-	-	-	+	-	-	-	1
	-	-	-	-	+	-	+	-	2
	-	-	+	-	-	-	+	-	1
	-	+	+	-	-	-	+	+	1
	+	-	+	-	+	-	-	-	1
	+	-	+	-	+	+	-	-	2
	-	+	+	+	+	-	-	+	1
	+	-	+	+	+	+	-	+	2
	-	+	+	+	+	-	+	+	1
	+	-	+	+	+	+	+	+	2

表6 病原関連遺伝子保有状況

	付着因子		鉄獲得		血清抵抗性	毒素因子		遺伝子伝達性	株数
	papC	tsh	iucD	irp2	iss	vat	astA	cva/cvi	
健康鶏	-	-	-	-	-	-	-	-	4
	-	-	-	-	-	-	+	-	1
	-	-	-	-	+	+	-	-	1
	-	-	-	+	-	+	-	-	1
	-	-	+	+	+	-	+	-	1
	-	+	+	+	+	-	+	+	2
	(n=3)								
環境	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	-	-	-	+	+	-	-	-	1

健康鶏由来株では、遺伝子を保有しないものから、6種類の遺伝子を保有する7パターンに分類され、保有しないものが4株と多く認められた。

環境由来株では、遺伝子を保有しないものが2株、2種類の遺伝子を持つものが1株であった。

表7 病原関連遺伝子保有状況

由来	付着因子		鉄獲得		血清 抵抗性	毒素因子		遺伝子 伝達性
	papC	tsh	iucD	irp2	iss	vat	astA	cva/cvi
全体	4 7.5	29 54.7	39 73.6	37 69.8	40 75.5	8 15.1	10 18.9	8 15.1
大腸菌症	4 10.3	27 69.2	35 89.7	32 79.5	36 89.7	5 12.8	5 12.8	6 15.4
採卵鶏	0	15 88.2	15 88.2	16 94.1	15 88.2	0	0	0
肉用鶏	4 18.2	12 54.5	20 90.9	15 68.2	20 90.9	5 22.7	5 22.7	6 27.3
健康鶏	0	2 18.2	4 36.4	5 45.5	4 36.4	3 27.3	5 45.5	2 18.2
環境	0	0	0	1 33.3	1 33.3	0	0	0

上段:保有株数 下段:保有割合(%)

大腸菌症由来株と健康鶏由来株について、病原関連遺伝子の保有状況を比較すると、大腸菌症由来株では、健康鶏由来株に比べ、4種類の遺伝子の保有率が高く認められた。また、大腸菌症由来株について、採卵鶏、肉用鶏の保有状況を比較すると、同様に高い保有率であった。

4 まとめ及び考察

今回、県内で分離された鶏由来の大腸菌性状検査を行ったところ、血清型別は、大腸菌症由来株 39 株中 26 株 (66.7%) が O78 に分類され、国内で分離される APEC の主な血清型と同様の結果となった^{1) 2)}。その他の大腸菌・健康鶏・環境由来株は今回の検査では分類できなかった。

糖分解性状については、大腸菌では、マルトース、マンニットはほとんどが陽性、サッカロースについては半数程度が陽性、アドニトール、イノシトールについては陽性となるものは稀とされている。

同一農場の菌株は、全て同じ糖分解能であり、大腸菌症由来株では、マルトース、

サッカロースの分解能により 3 種類に分類された。健康鶏・環境由来株では、イノシトール、マンニット、サッカロースの分解能により 4 種類に分類された。また、農場毎に同じ性状であったが、数種類の糖分解に差を認め、農場の疫学的特徴づけが可能と思われた。既報では、農場内において複数の性状を示す大腸菌が分離されており¹⁾、症例を積み重ねることが重要と思われた。

薬剤感受性試験では、大腸菌症由来株は、39 株中 38 株がテトラサイクリンに耐性、32 株がナリジクス酸に耐性であった。農場毎には、ニューキノロン系薬剤耐性、セフェム系薬剤耐性の農場も認められた。健康鶏由来株では、11 株中 6 株がアンピシリンに耐性、環境由来株では、3 株中 1 株がセファゾリンに耐性であった。

大腸菌症由来株は多剤耐性の傾向を示した。一方、健康鶏由来株では、第 3 世代セフェム系薬剤耐性が複数の農場で認められ、今後の注意が必要と思われた。

病原関連遺伝子の保有状況では、農場間の特徴はなく、菌株毎に保有に差が認められた。大腸菌症由来株は、1 個以上の遺伝子を保有し、うち 27 株が *iss*、*irp2*、*iucD*、*tsh* の 4 遺伝子を保有していた。また、大腸菌症由来株は 4 遺伝子の保有割合が高く、健康鶏・環境由来 6 株は、全ての遺伝子を保有しておらず、既報と同様に遺伝子の保有と病原性との関連が示唆された。

既報と同様に病原性との関与が示唆された。今回調査した遺伝子 *iss*、*iucD*、*tsh* はプラスミド性に保有することが分かっており、複数の遺伝子が関与する可能性もある。

大腸菌症の発症に関与する因子について

は、他の病原体、飼養環境なども今後も検討する必要がある。薬剤耐性状況の監視や病原関連遺伝子の保有状況と病態の関連性についてさらなる症例を積み重ねる所存である。

参考文献

- 1) 木口陽介ら：ブロイラーから分離された大腸菌のβラクタマーゼ産生性及び分子疫学的性状に関する研究，日獣会誌 67 739～ 746 (2014)
- 2) 工藤剛ら：平飼い鶏舎の採卵鶏に発生した大腸菌症,岩獣会報, 34, 139－142 (2008)
- 3) Chirista Ewer, et al :Rapid Detection of Virulence-Associated Genes in Avian Pathogenic Escherichia coli by Multiplex Polymerase Chain Reaction, AVIAN DISEASES, 49, 269-273(2005)