

琉球大学学術リポジトリ

ホルスタイン種新生子牛とその親牛,ならびに飼育環境から分離された多剤耐性大腸菌株の分子疫学的解析

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-13 キーワード (Ja): ホルスタイン種新生子牛, 飼育環境, 多剤耐性大腸菌, プラスミドプロファイル, パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE) キーワード (En): newborn holstein calves, calf-breeding areas, multidrug-resistant Escherichia coli, plasmid profile, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 作成者: 岩崎, 健, 金城, 千順, 日越, 博信, Iwasaki, Ken, Kinjoh, Chiyori, Higoshi, Hironobu メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3561

ホルスタイン種新生子牛とその親牛，ならびに飼育環境から分離された 多剤耐性大腸菌株の分子疫学的解析

岩崎 健*, 金城千順, 日越博信

琉球大学農学部生物生産学科

Molecular Epidemiological Studies on Multidrug-resistant *Escherichia coli* Isolates from Newborn Holstein Calves, Cow of Each, and Calf-breeding Areas

Ken IWASAKI*, Chiyori KINJOH and Hironobu HIGOSHI

Department of Bioproduction, Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus

Abstract: Of all *Escherichia coli* isolates that were obtained from 2 newborn Holstein calves (designated calf A and B), two cows (designated cow A and B, respectively), and calf-breeding areas (trough, floor, fence, litter bed, sawdust, water trough, Holstein cattle breeding area around <calves C and D, and cows E and F>), a total of 120 multidrug resistant *E. coli* isolates with resistance to at least 3 out of 7 tested antibiotics [ampicillin, chloramphenicol, chlortetracycline, kanamycin, streptomycin, nalidixic acid, and sulfadimethoxine] were obtained in 2002. Each isolate was tested for clonal relationships by plasmid profile analysis and/or pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis. Plasmids were found in 65% (78/120) of all *E. coli* isolates tested. A total of 9 different plasmid profiles (i.e., type I - IX) were identified based on the number and size of the plasmids. Type VII was the most widely distributed type in strains from various sources, including calf A, cow A, and calf-breeding areas. The number and type of plasmid profile observed in each Holstein was: calf A, 3 types (II, III, and VII); cow A, one type (VII); calf B, 4 types (I, III, IV, and V); cow B, 2 types (IV and VI). These results show that the calves had more varied profiles than the cows, and that both calves also carried *E. coli* strains with plasmid profiles that were different from those of the calf-breeding areas. PFGE following restriction digestion with *Xba*I was performed on 120 of the isolates, because approximately one-third of the isolates did not carry plasmids and could not be typed by plasmid profile analysis. The 120 isolates were divided into 49 PFGE patterns, which showed that some genetically indistinguishable isolates were present in calf A and calf-breeding areas (floor, trough, sawdust, calf C, or calf D), and some genetically closely related isolates were also present in calf A and calf-breeding areas (floor, trough, sawdust, or water trough). Furthermore, none of the indistinguishable or closely related isolates were shared between calf A and cow A, or calf B and cow B, respectively. These results indicate that there may be other environmental sources, besides the calf-breeding areas (floor, trough, sawdust, water trough, calf breeding locations) identified in this study, that are potential sources of multidrug-resistant *E. coli* infection in newborn Holstein calves.

キーワード：ホルスタイン種新生子牛，飼育環境，多剤耐性大腸菌，プラスミドプロファイル，パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

Key words: newborn holstein calves, calf-breeding areas, multidrug-resistant *Escherichia coli*, plasmid profile, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

*Corresponding author (E-mail : iwaken@agr.u-ryukyu.ac.jp)

緒 言

子牛の下痢症は、生後数日間の新生子牛に多発する傾向にあり、発育遅延、飼料効率の低下、時には死亡することもあり、家畜の生産性を著しく阻害する要因にもなる。下痢症を原因別にみると、感染性下痢症と非感染性下痢症の二つに大別される。感染性の場合、細菌、ウイルス、および寄生虫の感染に起因するものが多く、細菌では特に大腸菌、サルモネラ菌による感染被害が多数報告されている^{1,2)}。この被害の背景には、複数の抗生物質に耐性を示す多剤耐性菌の出現により、患者に対する感染症の治療管理が困難になったことが挙げられる。薬剤耐性が進行する状況にあつては、下痢症の予防および治療対策を推進するうえで、子牛への多剤耐性菌の感染源および感染経路を特定することは、感染被害の拡大と再発防止のための重要な情報となる。

筆者らは昨年、ホルスタイン種の新生子牛から生後7日齢に至るまで日齢毎に分離した直腸便由来大腸菌株と、各親牛から分離した菌株、ならびに子牛の飼育環境から分離した菌株について薬剤感受性試験を行い、薬剤耐性菌の出現状況と薬剤耐性型より菌株間の関連性を調査した³⁾。その結果、すべての子牛に共通して耐性菌が高率に検出され、しかも多剤耐性菌が過半数を占めるといった現象がみられた。これら多剤耐性菌の耐性型をみると、親子共通の耐性型が少数存在するものの、生後1日齢から各親牛とは異なる多様な耐性型が高率に検出された。このことは、生後7日齢までの子牛は、親牛よりも飼育環境に存在する耐性菌の影響を受け薬剤耐性を獲得していることを示すが、その疫学的な背景は明らかではない。

そこで今回は、昨年ホルスタイン種新生子牛とその親牛、ならびに子牛をとりまく環境から分離された大腸菌株のうち、3剤以上の薬剤に耐性を示した多剤耐性大腸菌株について、プラスミドプロファイルおよびパルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis [PFGE]) 法による分子疫学的解析を行い、菌株間の疫学的な関連性を検討したので、その成績を報告する。

実験材料および方法

1. 供試菌株

供試菌株は、2002年に沖縄県畜産試験場内で出生したホルスタイン種新生子牛とその親牛、ならびに子牛をとりまく飼育環境から分離した大腸菌株のうち、7薬剤 [アンピシリン (ABPC)、クロラムフェニコール (CP)、クロルテトラサイクリン (CTC)、カナマイシン (KM)、ストレプトマイシン (SM)、ナリジクス酸 (NA)、スルファジメトキシシン (SA)] に対する薬剤感受性試験で、3種類以上の薬剤に耐性を示した多剤耐性大腸菌120株を用いた。これら供試菌株の内訳 (Table 1) は、2002年10月と11月に出生したホルスタイン種新生子牛2頭 (呼称A子牛とB子牛) の直腸便から、それぞれ生後7日齢に至るまで日齢毎に分離された多剤耐性大腸菌株74株 (A子牛由来36株、B子牛38株) と、それら親

牛 (呼称A親牛とB親牛) の直腸便からそれぞれ分娩後1日目と7日目に分離された多剤耐性大腸菌18株 (A親牛由来6株、B親牛12株)、さらに子牛房内設備や子牛房近傍で飼育されていた成牛や子牛から分離された多剤耐性大腸菌28株 (飼槽由来6株、床5株、柵下5株、牛床3株、おがくず3株、E親牛2株、C子牛1株、D子牛1株、F親牛1株、給水器1株) である。

2. プラスミドプロファイルによる型別

供試菌株のプラスミドDNAは、LB培地 (1% bacto tryptone, 0.5% bacto yeast extract, 1% NaCl; pH 7.5) で37℃, 18時間振盪培養した菌液2 mlから、Kado & Liuの変法⁴⁾に準拠して抽出した。抽出したプラスミドDNA試料溶液のうち10 μLを、0.8%アガロースミニゲル (Agarose H, ニッポンジーン) で電気泳動を行った。泳動条件は100 Vで、泳動装置にはサブマリンゲルシステム (Model EC370, アステック) を、DNAサイズマーカーにはE. coli V517より抽出した分子量既知のプラスミドと1 kb DNA ladder (宝酒造) を用いた。泳動終了後、ゲルを臭化エチジウム (ethidium bromide [EtBr], 和光純薬) 溶液で染色し、UV照射 (UV transilluminator 2000, バイオラド) により検出したDNAバンドをデジタルカメラで撮影記録した。プラスミドプロファイルは、各菌株が保有しているプラスミドの種類と数に基づいて型別し、1バンド以上相違したものをすべて別の型として分類した。

3. PFGE法による染色体DNAの制限酵素断片長型別

サンプルプラグは、LB培地で37℃, 18時間振盪培養した菌液30 μLから、Riceらの方法⁵⁾に準拠して作製した。作製したプラグをリゾチーム液 (2 mg/mL, ナカライテスク) で37℃, 3時間溶菌処理した後、プロテイナーゼK液 (1 mg/mL, 和光純薬) で50℃, 18時間除蛋白処理した。その後、1/3大に切り取ったプラグを制限酵素 *Xba* I (30U/1検体, 宝酒造) で37℃, 18時間処理した。酵素処理したプラグを泳動用アガロースゲル (1% PFCアガロース, バイオラド) に埋め込み、プラグ固定用アガロース (1% ローメルトアガロース, バイオラド) で固定した後、電気泳動を行った。泳動装置にはCHEF-DR III (バイオラド) を用い、泳動条件は国立感染症研究所の報告⁶⁾に従い、電圧6 V/cm, 角度120°, 緩衝液循環温度14℃, パルスタイムと泳動時間は4-8秒を12時間、8-50秒を10時間で行った。DNAサイズマーカーには、Lambda DNA ladder (バイオラド) を用いた。泳動終了後、ゲルを1 μg/mL EtBr溶液で染色し、UV照射 (UV transilluminator 2000, バイオラド) により検出された泳動パターンをデジタルカメラで撮影記録した。PFGE法による遺伝子型別は、Tenoverらの判定基準⁷⁾に準じた。すなわち、各菌株間の泳動パターンが完全に一致した場合は同種菌株、異なるバンド数が3本以下の場合は由来が同一の近縁種と判定した。

実験結果

1. プラスミド DNA の保有状況

プラスミドプロファイル解析に供試した120株のうち、78株(65%)でプラスミドDNAが検出された(Table 1)。A親子およびB親子由来株での検出状況をみると、A親牛の分娩後1日目(100%)、B子牛の生後5日目(100%)と6日目(100%)、およびB子牛の生後7日目(91.7%)にプラスミドDNAが高率に検出され、これら以外はすべて60%以下の低い検出率を示した。

一方、環境由来株での検出状況をみると、プラスミドDNAを保有する菌株は、柵下由来(検出率80%)以外は、飼槽、床、牛床、おがくず、E親牛、C子牛、D子牛、F親牛、および給水器に由来する菌株で、いずれも100%と高率に検出された。

2. プラスミドプロファイル

プラスミドプロファイルは、各菌株が保有するプラスミドDNAの種類と数に基づき、I-IX型の9種類に分類できた(Table 2)。各プラスミド型を構成するプラスミドDNAは、

Table 1. Source of the multidrug-resistant *E. coli* isolates used in this study and the frequency of isolates carrying plasmids.

Source		Number of isolates tested ^{a)}	Number of isolates carrying plasmids	% isolates carrying plasmids
<u>Holstein families postnatal/postpartum</u>				
	day:			
calfA	1 day	2	0	0
	2 day	2	0	0
	3 day	N/A ^{b)}	—	—
	4 day	6	1	16.7
	5 day	8	1	12.5
	6 day	5	3	60
	7 day	13	5	38.5
cowA	1 day	2	2	100
	7 day	4	0	0
calfB	1 day	4	0	0
	2 day	N/A	—	—
	3 day	N/A	—	—
	4 day	n.d. ^{c)}	—	—
	5 day	13	13	100
	6 day	9	9	100
	7 day	12	11	91.7
cowB	1 day	12	7	58.3
	7 day	N/A	—	—
<u>Environment(calf-breeding areas)</u>				
trough		6	6	100
floor		5	5	100
fence		5	4	80
litter bed		3	3	100
sawdust		3	3	100
cowE		2	2	100
calfC		1	1	100
calfD		1	1	100
cawF		1	1	100
water trough		1	1	100

a) Number of *E. coli* isolates with resistance to at least three out of seven tested antibiotics, including nalidixic acid, streptomycin, chlortetracycline, ampicillin, sulfadimethoxine, chloramphenicol, and kanamycin.

b) N/A: not applicable.

c) n. d.: no date. Sampling error.

I型で10 kb, 6 kb, 1.5 kb, 1 kb, II型で10 kb, 5.5 kb, III型で10 kb, 5 kb, IV型で8 kb, 5 kb, V型で6 kb, VI型で5 kb, VII型で1.5 kb, 1 kb, VIII型で4.5 kb, 1.5 kb, 1 kb, IX型で10 kb, 1.5 kb, 1 kb, があった。

プラスミドプロファイル別の検出率をみると, I型3株(2.5%), II型5株(4.2%), III型11株(9.2%), IV型17株(14.2%), V型9株(7.5%), VI型2株(1.7%), VII型25株(21.7%), VIII型1株(0.8%), IX型5株(4.2%)であり, VII型が最も高率に検出され, 次いでIV型, III型, V型, II型とIX型, I型, VI型, VIII型の順で高値を示した。

プラスミドプロファイルのうち, 菌株の由来が単独であったのは, I型(B子牛由来), II型(A子牛), V型(B子牛), VI型(B親牛), VIII型(柵下)で, これら以外のプラスミド型では, すべて複数の由来を有していた(Table 3)。

3. プラスミドプロファイルと薬剤耐性型別との比較

プラスミドプロファイルと薬剤耐性型とを比較すると, それらの疫学的背景にいくつかの相違が認められた。例として, プラスミドプロファイルのI型にはB子牛由来株だけが分布しており, その薬剤耐性型はナリジクス酸(NA)-ストレプトマイシン(SM)-クロルテトラサイクリン(CTC)-アンピシリン(ABPC)-スルファジメトキシシン(SA)の5剤耐性型を示している。これと同一の薬剤耐性型は, B子牛以外にも, I型とは異なるプラスミド型に属しているIII型のA子牛, IV型のB親牛, V型のB親牛, VII型の給水器, IX型の床からも確認されており, 同一の薬剤耐性型であっても異なるプラスミド型を示していた。

一方, IV型に属しているB子牛由来の菌株は, NA-SM-CTC-ABPC-SAの5剤耐性型であるのに対して, 同型に属するB親牛由来の菌株では, NA-SM-CTC-SAの4剤耐性型であり, 異なる薬剤耐性型であっても同一のプラスミド型を示していた。また, VII型はA子牛, A親牛, D子牛, E親牛, F親牛, 柵下, 床など広域に分布しており, これらは異なる薬剤耐性型を伴うものの, 同一のプラスミド型を示していた。

4. 採材由来別にみたプラスミドプロファイルの分布状況

プラスミドプロファイルの分布をみると, A子牛ではII型, III型, VII型の3種類, A親牛ではVII型の1種類, B子牛ではI型, III型, IV型, V型の4種類, B親牛ではIV型, VI型の2種類が確認できた(Table 4)。このように親牛のプラスミドプロファイルが1種類から2種類に対して子牛では3種類から4種類と, 子牛は親牛よりも多様なプラスミドプロファイルを有していた。

また親子間で共通したプラスミドプロファイルとして, A親子間ではVII型が, B親子間ではIV型があり, なかでもVII型は飼育環境でも検出され, 広域に分布していた。

5. PFGE法による制限酵素断片長型別

PFGE法では, 環境由来の2株を除く118菌株から鮮明な泳動パターンが得られた。これらをTenoverらの判定基準に準じて分類すると, A型からS型までの19種類に大別され, 亜型を含めると49種類に分類できた(Table 5)。

その内訳をみると, A子牛と環境間に, 同種菌株としてBii型が2株(A子牛由来1株, 環境由来1株), Ci型が8株(A子牛由来6株, 環境由来2株)が存在しており, Bii型の近縁種であるBi型が1株(環境由来), Biii型が1株(環境由来), またCi型の近縁種であるCii型が2株(A子牛由来), Ciii型が4株(A子牛由来), Civ, v, vi型がそれぞれ1株(A子牛由来), Cvii, viii型がそれぞれ1株(環境由来)確認された。

A子牛とB子牛間に, 同種菌株としてEi型が14株(A子牛由来1株, B子牛由来13株), Ei型の近縁種としてEii型が1株(A子牛由来), Ii型(A子牛由来1株)と近縁種であるIii型がB子牛由来で1株確認された。

B親牛と環境間には, 同種菌株としてMii型が5株(B親牛由来2株, 環境由来3株), Mii型の近縁種であるMii型が3株(B親牛由来), Miii型が1株(B親牛由来), Miv型が2株(B親牛由来)確認された。なお, A親牛由来の菌株と同種あるいは近縁種である菌株は, A子牛あるいは環境からも検出されなかった。

Table 2. Plasmid profiles based on the number and size of the plasmid detected in 78 of 120 multidrug-resistant *E. coli* isolates.

Plasmid profile	Plasmid size (kb)		Number isolates(%)
I	10	6	1.5 1 3 (2.5)
II	10	5.5	5 (4.2)
III	10	5	11 (9.2)
IV	8	5	17 (14.2)
V	6	5	9 (7.5)
VI		5	2 (1.7)
VII		1.5	1 25 (20.8)
VIII		4.5	1.5 1 1 (0.8)
IX	10	1.5	1 5 (4.2)

Table 3. Discrimination among multidrug-resistant *E. coli* isolates by plasmid profile and antibiotic resistance patterns.

Plasmid profile	Source	Number of isolates	Resistance patterns ^{a)}							
			NA	SM	CTC	ABPC	SA	CP	KM	
I	calfB	3	NA	SM	CTC	ABPC	SA			
II	calfA	2		SM	CTC	ABPC	SA	CP	KM	
	calfA	2	NA	SM	CTC	ABPC	SA			
III	calfB	9	NA	SM	CTC	ABPC	SA			
IV	calfB	12	NA	SM	CTC	ABPC	SA			
	coWB	5	NA	SM	CTC		SA			
V	calfB	9	NA	SM	CTC	ABPC	SA			
VI	cowB	2	NA	SM	CTC		SA			
	calfA	2		SM	CTC	ABPC	SA	CP	KM	
	cowA	2		SM	CTC		SA			
	calfD	1		SM	CTC	ABPC	SA		KM	
	cowE	2			CTC	ABPC	SA	CP		
	cowF	1	NA	SM	CTC		SA			
	litter bed	2	NA	SM	CTC		SA			
		1		SM	CTC	ABPC	SA			
	fence	1	NA	SM	CTC		SA			
		1		SM	CTC	ABPC	SA			
VII		1	NA	SM	CTC	ABPC	SA	CP	KM	
	sawdust	1		SM	CTC	ABPC	SA			
		1	NA	SM	CTC	ABPC	SA	CP		
	flooe	1	NA	SM	CTC	ABPC	SA	CP	KM	
		1	NA	SM	CTC		SA	CP	KM	
	trough	2	NA	SM	CTC	ABPC	SA	CP	KM	
		1	NA	SM	CTC	ABPC	SA	CP		
	water trough	1	NA	SM	CTC	ABPC	SA			
VIII	fence	1		SM	CTC		SA		KM	
	calfC	1		SM	CTC	ABPC	SA	CP	KM	
IX	floor	1	NA	SM	CTC	ABPC	SA			
	trough	1		SM	CTC	ABPC	SA	CP	KM	
		1		SM	CTC	ABPC	SA	CP		

a) Tested in 2003 (3). Abbreviations: NA, nalidixic acid; SM, streptomycin; CTC, chlortetracycline; ABPC, ampicillin; SA, sulfadimethoxine; CP, chloramphenicol; KM, kanamycin.

考 察

筆者らは昨年、ホルスタイン種新生子牛に対する多剤耐性大腸菌の汚染源や伝播様式を探るため、新生子牛とその親牛、ならびに子牛房内設備や子牛房近傍で飼育されていた成牛や子牛から分離された薬剤耐性大腸菌の薬剤耐性型をもとに、これら由来の異なる各菌株間の関連性を調査した。その結果、生後7日齢までの子牛は、親牛よりも飼育環境から多剤耐性大腸菌の汚染を強く受け、薬剤耐性を獲得していると推察された。しかし、薬剤耐性型といった従来の表現型別法による菌株の識別方法では、細菌の識別能力、再現性、安定性の観点から、確実な菌株の識別が困難である。そこで今回、より詳細な解析が可能なプラスミドプロファイルおよびパルスフィールド電気泳動 (PFGE) 法による分子疫学的解析を行い、汚染源の特定を試みた。

プラスミドプロファイルでは、各菌株が保有するプラスミ

ド DNA の種類と数に基づき、I型からIX型の9種類に分類された。A, B各親子間のプラスミドプロファイルと比較すると、A子牛由来である菌株の一部は、プロファイルの型 (VII型) が、A親牛に由来するすべての菌株と一致しており、またB子牛由来である菌株の一部は、プロファイルの型 (IV型) が、B親牛由来の過半数の菌株と一致していた。このことは、子牛への汚染源の一つとして親牛が推定されるものの、子牛は親牛よりも多彩なプロファイルを有することから、親牛以外の新たな汚染源が多岐にわたって存在することを示唆している。

一方、子牛房内設備やその近傍で飼育されている成牛や子牛などの環境由来の菌株では、そのプロファイル型がVII型に集中しており、プラスミドプロファイルの分布に偏りが認められた。このことは、飼槽、床、柵下、牛床、おがくず、給水器などの子牛房設備に限らず、子牛房近傍で飼育されている成牛や子牛までもが、同一起源の菌株に汚染されている可

Table 4. Distribution of plasmid profiles among multidrug-resistant *E. coli* isolates from cows, calves, and calf-breeding areas.

Source	Number of isolates	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
calfA	36		5[13.9]	2[5.6]				3[8.3]		
cowA	6							2[33.3]		
calfB	38	3[7.9]		9[23.7]	12[31.6]	9[23.7]				
cowB	12				5[41.7]		2[16.7]			
trough	6							4[66.7]		2[33.3]
floor	5							3[60.3]		2[40.0]
fence	5							3[60.0]	1[20.0]	
litter bed	3							3[100]		
sawdust	3							3[100]		
cowE	2							2[100]		
cowF	1							1[100]		
water trough	1							1[100]		
calfD	1							1[100]		
calfC	1									1[100]
Total	120	3[2.5]	5[4.2]	11[9.2]	17[14.2]	9[7.5]	2[1.7]	26[21.7]	1[0.8]	5[4.2]

能性を示唆するものである。さらに、環境由来菌株において大半を占めたⅦ型は、A子牛由来の一部の菌株とも一致することから、これら子牛をとりまく環境も子牛にとっては重要な汚染源になりうると推察される。同時に、子牛房施設環境から比較的多くの多剤耐性菌が分離されたことを考慮すると、汚染された子牛から環境への再汚染の可能性も高いことが示唆される。

プラスミドプロファイル解析においては、プラスミドDNAを保有していない菌株が顕著に認められた。供試した菌株はすべて、薬剤感受性試験で既に多剤耐性が確認されたにもかかわらず、このようにプラスミドDNAが検出できなかった原因としては、菌株の保存や継代の段階でプラスミドDNAが欠落したものと予想される。いずれにしても、今回のような場合、疫学マーカーとしてプラスミドプロファイルを利用したことで、そのパターンに偏りを生じた危険性がある。そこでプラスミドプロファイルから得られた疫学情報を、分子疫学解析法として最も実績のあるPFGE法により確認することにした。

染色体DNAを分析対象としたPFGE法では、環境由来の2株を除く118菌株から49種類にも及ぶ泳動パターンが認められ、プラスミドプロファイルにより型別された9種類と比較して、極めて高い識別力を示した。PFGE法による分析の結果、A子牛由来の菌株と非常に近縁度の高い菌株が、床、飼槽、おがくず、給水器などの子牛房内設備や、子牛房近傍で飼育されている子牛から分離されたことが判明した。一方、B子牛由来の菌株と近縁関係にある菌株は、今回調査したB親牛、A子牛、A親牛、子牛房内設備のいずれからも分離されていなかった。また、A、B各親子間に近縁度の高い菌株は認められなかった。このように、PFGE法による結果は、プラスミドプロファイルとに若干の相違を示したが、これは菌株の識別能を直接的に反映しているものと考えられる。

以上のことから、新生子牛に対する多剤耐性大腸菌の汚染源として、床、飼槽、おがくず、給水器などの子牛房内設備や子牛房の近傍で飼育されている子牛といった飼育環境が密

接に関与することが示唆された。よって、同牛舎施設内での二次汚染対策をとる際には、子牛をはじめ、これら子牛をとりまく環境に対する徹底した衛生管理や浄化が重要な鍵となる。また、今回特定した汚染源以外にも、潜在的な汚染源が存在すると推察されたことから、今後は耐性菌の蔓延防止を図るために、人為的要因や牛舎外の環境要因に起因する耐性菌汚染も考慮して、飼育従事者をはじめ野生動物、野鳥、昆虫により媒介される汚染経路についても十分に検討する必要がある。

要 約

ホルスタイン種新生子牛（呼称A子牛、B子牛）とその親牛（A親牛、B親牛）、ならびに子牛の飼育環境（飼槽、床、柵下、牛床、おがくず、給水器、周囲で飼育されていた牛<C子牛、D子牛、E親牛、F親牛>）から分離した大腸菌株のうち、7薬剤 [アンピシリン (ABPC)、クロラムフェニコール (CP)、クロルテトラサイクリン (CTC)、カナマイシン (KM)、ストレプトマイシン (SM)、ナリジクス酸 (NA)、スルファジメトキシシン (SA)] に対する薬剤感受性試験で、3種以上の薬剤に耐性を示した多剤耐性大腸菌120株（A子牛由来36株、B子牛38株、A親牛6株、B親牛12株、飼育環境28株）について、プラスミドプロファイルおよびパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による分子疫学的解析を行い、各菌株間の関連性を検討した。

1. 供試菌株におけるプラスミドDNA保有率は65% (78株/120株) で、各菌株が保有するプラスミドDNAの種類と数に基づき、プラスミドプロファイルをI型からIX型の9種類に分類できた。このうち、Ⅶ型が最も検出率が高く、A子牛、A親牛、飼育環境など広域に分布していた。親子別のプラスミドプロファイル分布状況を見ると、A親牛ではⅦ型の1種類に対し、A子牛ではⅡ、Ⅲ、Ⅶ型の3種類、B親牛でⅣ型、Ⅵ型の2種類に対し、B子牛ではⅠ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ型の4種類が確認できた。子牛は親牛よりも多

Table 5. Clonal relationships among multidrug-resistant *E. coli* isolates from cows, calves, and calf-breeding areas, as determined by macrorestriction fragment analysis using PFGE.

PFGE pattern ^{a)}	subtype	Number of bands	Number of isolates	Isolated from:				
				calfA	cowA	calfB	cowB	Environment
A	i	14	1	1				
	ii	16	1	1				
	iii	16	1	1				
B	i	16	1					1
	ii	14	2	1				1
	iii	12	1					1
C	i	15	8	7				1
	ii	15	2	2				
	iii	16	4	4				
	iv	15	1	1				
	v	16	1	1				
	vi	16	1	1				
	vii	18	1					1
	viii	16	1					1
D	i	15	5			5		
	ii	16	14			14		
	iii	16	1			1		
	iv	16	1			1		
	v	17	1			1		
	vi	17	1			1		
	vii	17	1			1		
E	i	17	14	1		13		
	ii	18	1	1				
F	i	15	1	1				
	ii	18	3	2				1
	iii	17	7	1				6
	iv	17	4	4				
	v	16	4	4				
G	i	16	1	1				
	ii	16	2					2
H		20	1					1
I	i	9	1	1				
	ii	11	1			1		
J		15	3		3			
K	i	13	2		2			
	ii	12	1		1			
L	i	9	1				1	
	ii	10	1				1	
M	i	15	3				3	
	ii	15	5				2	3
	iii	17	1				1	
	iv	18	1				1	
	v	19	2				2	
N		11	1					1
O		13	1					1
P		17	1					1
Q		22	1					1
R		14	2					2
S		18	1					1

a) The letters differentiate groups of isolates, and the roman numerals indicate minor differences between isolates of the same group.

彩なプロファイルを示しており、飼育環境とは異なるプロファイルを示していた。

2. プラスミドプロファイルをA, B各親子間で比較すると、A子牛由来である菌株の一部は、プロファイルの型(VII型)が、A親牛に由来するすべての菌株と一致しており、またB子牛由来である菌株の一部は、プロファイル型(IV型)が、B親牛由来の過半数の菌株と一致していた。一方、子牛房内設備やその近傍で飼育されている成牛や子牛などの環境由来の菌株では、そのプロファイル型がVII型に集中しており、プラスミドプロファイルの分布に偏りが認められた。また、環境由来菌株で大半を占めたVII型は、A子牛由来の一部の菌株とも一致していた。
3. PFGE法では供試した120株から49種類の泳動パターンが認められ、A子牛由来の菌株と非常に近縁度の高い菌株が、床、飼槽、おがくず、給水器などの子牛房内設備や、子牛房近傍で飼育されている子牛から分離された。一方、B子牛由来の菌株と近縁関係にある菌株は、今回調査したB親牛、A子牛、A親牛、子牛房内設備のいずれからも分離されなかった。また、A, B各親子間に近縁度の高い菌株は認められなかった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、御協力頂いた沖縄県畜産試験場各位に深謝いたします。

文 献

- 1) White, D. G., Hudson, C., Maurer, J. J., Ayers, S., Zhao, S., Lee, M. D., Bolton, L., Foley, T. and

Sherwood, J. 2000. Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 4593-4598.

- 2) Seyfarth, A. M., Wegener, H. C. and Frimodt-Moller, N. 1997. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium from humans and production animals. *J. Antimicrob. Chemother.*, 40: 67-75.
- 3) 岩崎 健, 鮫島好美, 下門奈月, 日越博信. 2003. ホルスタイン種親子の直腸便由来大腸菌における薬剤耐性. 琉大農学報, 50: 53-59.
- 4) Kado, C. I. and Liu, S. T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, 145: 1365-1373.
- 5) Rice, D. H., McMenamin, K. M., Pritchett, L. C., Hancock, D. D. and Besser, T. E. 1999. Genetic subtyping of *Escherichia coli* O157 isolates from 41 Pacific Northwest USA cattle farms. *Epidemiol. Infect.*, 122: 479-484.
- 6) 国立感染症研究所. 腸管出血性大腸菌 O157の検出・解析等の技術研修会資料4. 17-31.
- 7) Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. and Swaminathan, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 2233-2239.