□ 内 科 学 □ 原 著

ホンダヌキおよびツキノワグマから分離したブドウ球菌の 薬剤感受性および分子疫学的調査による環境評価

深田恒夫^{1, 2)}, 後藤大介¹⁾, 田代 淳¹⁾, 柴田早苗²⁾, 竹田正人³⁾, 橋川 央⁴⁾, 笹井和美⁵⁾

1) 岐阜大学応用生物科学部附属動物病院, 2) 岐阜大学大学院連合獣医学研究科
〒 501-1193 岐阜県岐阜市柳戸 1-1

3) 大阪市天王寺動物園 〒 543-0063 大阪市天王寺区茶臼山町 1-108

4) 名古屋市東山動物園 〒 464-0804 名古屋市千種区東山元町 3-70

5) 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 〒 599-8531 堺市中区学園町 1-1

(2005 年 9 月 7 日受領, 2006 年 4 月 24 日採択)

Evaluation of Environmental Condition by Drug Resistant and Molecular Epidemiological Analysis of *Staphylococcus* Isolated from Raccoon Dogs and Japanese Black Bears

Tsuneo FUKATA^{1, 2)}, Daisuke GOTOH¹⁾, Jyun TASHIRO¹⁾, Sanae SHIBATA²⁾,
Masato TAKEDA³⁾, Hisasi HASIKAWA⁴⁾ and Kazumi SASAI⁵⁾

1) Veterinary Teaching Hospital, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, 2) The United Graduated School of
Veterinary Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan

3) Osaka City Tennoji Zoo 1-108 Cyausuyama, Tennouji, Osaka 543-0063, Japan

4) Nagoya City Higashiyama Zoo 3-70 Higashiyamamotomati Tigusa, Nagoya Aichi 464-0804, Japan

5) The Graduate School of Life and Environmental Sciences Osaka
Prefecture University, 1-1 Gakuencyo, Naka, Sakai Osaka 599-8531, Japan

ABSTRACT. The purpose of this study is to evaluate the environmental condition by drug resistant and molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus* isolated from raccoon dogs and Japanese Black bears. Nineteen out of 26 raccoon dogs were isolated *S. delphini* and ten out of 35 bears were isolated *S. aureus* and *S. warneri* A respectively. Eight out of 26 wild raccoon dogs have staphylococci that were resistant to at least one of the drugs tested. Six out of 35 wild bears have resistant staphylococci. The genomic DNAs of 37 staphylococci of raccoon dogs and bears were cleaved with restriction endonuclease *Sma*I and subjected to pulsed-field gel electrophoresis. Two strains of *S. sciuri* isolated from two bears of the near areas were shown a same DNA pattern. It is indicated that these two strains of tetracycline resistant were infected from human to bears.

Key words: Japanese black bear, drug resistant, PFGE, raccoon dog, *Staphylococcus*

Jpn. J. Zoo. Wildl. Med. 11(2) : 61-65, 2006

序 論

人間活動の拡大に伴い野生環境の変化が起きており, 野生動物を用いた環境評価が様々な方法によって行われている。その環境評価の1つとして, 野生動物における薬剤耐性菌の保有状況が調べられている。野生動物における薬剤耐性菌の保有は, 野生動物とヒトとの直接または間接的接触を示唆し, 野生動物の生息環境がヒトにより汚染されている可能性を示している。野生動物が薬剤耐性菌を保有することは1970年代から報告されており, この保有割合は年々増加してきている [1]。Kinjo

ら [1] の1992年の報告では, カモシカから2.5 ~ 4.9%の割合で薬剤耐性大腸菌を分離している。2003年O'Rourkeら [2] は, ルイジアナ州ではサメの約60%は耐性菌を持ち, 猛禽類から分離された大腸菌の13%, *Klebsiella* や *Proteus* では50%が耐性菌であったと報告している。

今回, 生息環境への適応力が非常に強く, 多くの動物やその住む環境から分離されやすいブドウ球菌に注目して [4], 人の生活環境に近い野生動物としてホンダヌキ (以下, タヌキ) およびヒトの生活環境から遠い野生動物としてツキノワグマ (以下クマ) から分離されたブドウ球菌の薬剤耐性率を野生

深田恒夫ら

および飼育環境下で比較した。また、分離菌の一部についてはパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法によって、それらの相同性を調べ、これらの動物種に特有な DNA バンドパターンの有無を検討した。そして、ブドウ球菌の薬剤感受性および分子疫学的調査結果から環境評価を行った。

材料と方法

1. 検査した動物および材料採取

材料は、2003 年 3 月から 2004 年 9 月までにタヌキ 26 頭とクマ 35 頭から採取した。その内訳は、岐阜大学に送付されたタヌキ 11 頭 (交通事故死: 生育場所・関東地区)、岐阜大学 COE プロジェクトに用いられたタヌキ 10 頭 (交通事故死 2 頭, 捕獲 8 頭: 東海地区)、クマ 21 頭 (捕獲あるいは射殺: 岐阜県山岳地)、東山動物園のタヌキ 2 頭, クマ 2 頭, 天王寺動物園のタヌキ 3 頭, クマ 2 頭, 岩手県の阿仁クマ牧場のクマ 10 頭であった。動物園以外のタヌキは人里近くで確保されており、ヒトの接触が高いと考えられ、クマは岐阜県山岳地で確保されており、ヒトとの接触は少ないと考えた。

採材部位は搬送中に菌の混入がないと考えられる口腔、鼻腔、外耳および肛門から採取した。阿仁クマ牧場からはその生活環境である床、水槽、飼槽、扉の取っ手および通路の 5 か所からも滅菌綿棒によって材料を採取した。

2. ブドウ球菌の分離と種の同定

採取した材料から定法に従ってブドウ球菌を分離した。すなわち、採取された材料の付着した綿棒を直接マニット食塩培地 (日水製薬) に塗布し、37℃ 24 時間培養後、コロニー形態、色素産生能の異なった菌をすべて保存した。分離したブドウ球菌は N-ID テスト・SP-18 (日水製薬) のマニュアルに従い、それぞれの菌種を同定した。さらなる鑑別テストが必要な菌株は、ONPG ディスク (日水製薬) を用いて、 β ガラクトシダーゼ産生能によって鑑別した。分離した菌株は以下の試験まで斜面普通寒天で室温保存した。

3. 薬剤感受性試験

分離したブドウ球菌を感受性ディスク法 (昭和薬品化工) に従って薬剤感受性を調べた。用いた感受性ディスクはスルフアメトキサゾール-トリメトプラム (ST)、ペニシリン G (PCG)、クロラムフェニコール (CP)、テトラサイクリン 30 (TC)、アンピシリン (ABPC)、セファレキシム (CEX) およびオフロキサシン 10 (OFLX) である。培養後、発育阻止円を計測し、判定表により「-」と判定した菌株を耐性、「1+」と判定した菌株を中間型とした。

4. PFGE 法

上記で分離同定したブドウ球菌のうち *S. aureus* 16 株 (タヌキ由来 7 株, クマ由来 9 株), *S. sciuri* 21 株 (タヌキ由来 14

株, クマ由来 7 株) を、GenePath 試薬システムのうちの試薬キット 1 (Bio-Rad Laboratories) とゲルキット 1 (Bio-Rad Laboratories) を用いて、満田の方法 [3] および GenePath 試薬キット 1 に添付されているマニュアルに準じて DNA パターンを解析した。制限酵素としては *SmaI* を用いた。PFGE には CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories) を用いて、電圧 200V, Initial Time 5.3 秒間, Final Time 34.9 秒間, 泳動時間 20 時間に設定した。

5. 統計処理

得られた結果を、正規近似法によって *p* 値を求めた。

GenePath 試薬キット 1 に添付のマニュアル、Hauschild ら、Goering らおよび Tenover らの報告に準じて *S. aureus* および *S. sciuri* と同定したブドウ球菌の DNA バンドパターンの比較分析を行った [4,5,6]。

結 果

1. ブドウ球菌の分離

タヌキ 26 頭すべて、クマ 35 頭中 34 頭 (97%), 阿仁クマ牧場の環境 5 か所すべてからブドウ球菌が分離された。得られたブドウ球菌はタヌキから 134 株, クマから 73 株, 合計 207 株であった。1 頭当たりの分離株数はタヌキ 5.2 株 (1~7 株), クマ 2.1 株 (0~9 株) であった。タヌキでは、*S. delphini* が 19 頭 (73%) と最も多く、次いで *S. sciuri* が 13 頭 (50%), *S. aureus* が 7 頭 (27%) の順で分離された (表 1)。複数分離では *S. delphini* と *S. sciuri* の組合せが最も多く 10 頭 (38%), 次いで *S. delphini* と *S. aureus* が 6 頭 (23%) であった。クマでは、*S. aureus* と *S. warneri* A がともに 10 頭 (29%) から分離され、次いで *S. sciuri* が 9 頭 (26%) から分離された (表 1)。*S. aureus* と *S. sciuri* の組合せが 6 頭 (17%) で最も多かった。タヌキではクマに比べて有意に *S. delphini* および *S. xylosus* の保有率が高く、*S. schleiferi* の保有率は有意にクマが高かった (*p* < 0.05)。

2. 薬剤耐性菌の割合

抗菌剤のいずれかに耐性を示したブドウ球菌は野生タヌキ 8 頭 (38%), 野生クマ 6 頭 (29%), 動物園タヌキ 5 頭 (100%), 動物園クマ 3 頭 (75%), 牧場クマ 2 頭 (20%) であった (表 2, 表 3)。最も耐性菌が多かったのは PCG (13 株) で、最も耐性が出現しなかったのは OFLX (3 株) であった (表 4)。多剤耐性菌は野生タヌキから 4 株, 動物園タヌキから 5 株, 野生クマから 3 株, 牧場クマから 1 株分離された (表 2, 表 3)。野生タヌキから 4 剤耐性株が 1 株, 牧場クマからは 3 剤耐性菌が 1 株分離された。

3. PFGE 解析

同一地区で捕獲された 2 頭のクマから分離されたレーン 17

野生動物のブドウ球菌による環境評価

表 1 分離したブドウ球菌の株数

	ホンドタヌキ	ツキノワグマ	合 計
調べた頭数	26	35	61
<i>S. sciuri</i>	13	9	22
<i>S. delphini</i>	19	3*	22
<i>S. aureus</i>	7	10	17
<i>S. warneri</i> A	4	10	14
<i>S. gallinarum</i>	2	4	6
<i>S. chromogenes</i>	4	3	7
<i>S. intermedius</i>	5	1	6
<i>S. xylosus</i>	6	0*	6
<i>S. cohnii</i> A	5	1	6
<i>S. haemolyticus</i>	1	4	5
<i>S. lentus</i>	0	3	3
<i>S. sheilferi</i>	0	5*	5
<i>S. lugdunensis</i>	3	1	4
<i>S. hyicus</i>	0	4	4
<i>S. caprae</i> B	0	4	4
その他	9	5	14
分類不能	13	15	28

*ブドウ球菌のホンドタヌキとツキノワグマと保有率の比較 ($P < 0.05$)

表 2 ホンドタヌキにおける薬剤耐性ブドウ球菌

環 境	調べた頭数	耐性菌を持つ頭数	中間型以上の耐性菌を持つ頭数	分離された菌株数	耐性菌株数	中間型以上の耐性菌株数	多剤耐性菌株数
野 生	21	8 (38%)	12 (57%)	83	9 (11%)	23 (28%)	4 (5%)
動物園	5	5 (100%) *	5 (100%) *	8	6 (75%) *	7 (88%) *	5 (63%) *

*：野生動物および動物園由来の耐性菌を持つ頭数の比較 ($P < 0.05$)

表 3 ツキノワグマにおける薬剤耐性ブドウ球菌

環 境	調べた頭数	耐性菌を持つ頭数	中間型以上の耐性菌を持つ頭数	分離された菌株数	耐性菌株数	中間型以上の耐性菌株数	多剤耐性菌株数
野 生	21	6 (29%) ^a	19 (90%)	59	9 (15%) ^c	29 (49%)	3 (5%)
牧 場	10	2 (20%) ^a	6 (60%)	18	2 (11%) ^c	8 (44%)	1 (6%)
動物園	4	3 (75%) ^b	3 (75%)	6	4 (67%) ^d	4 (67%)	0 (0%)
牧場の環境	5	0 (0%) ^a	0 (0%)	8	0 (0%) ^c	0 (0%)	0 (0%)

ab 間, cd 間にそれぞれ有意差有 ($P < 0.05$)

および 18 の 2 株の *S. sciuri* から同一 DNA バンドパターンが見られた (図 1)。また、遠く離れた地区で捕獲された野生のタヌキから分離された 2 株の *S. aureus* の DNA バンドパターンは、約 70% 一致した。そのほかの菌株はすべて異なる DNA バンドパターンを示した。

考 察

野生動物の持つ薬剤耐性菌の由来はヒトの直接あるいは間

接的接触によって汚染された環境からである可能性が高く、したがって、野生動物の保有する薬剤耐性菌が環境汚染の指標になると考えられる [1]。Kinjo ら [1] は、野生のカモシカと飼育されているカモシカの糞便中の大腸菌から薬剤耐性菌ならびに R プラスミド陽性大腸菌を分離し、それらが飼育カモシカから高率に分離されたため、薬剤耐性大腸菌および R プラスミド大腸菌が環境汚染の指標になると指摘した。この研究では、TC、ストレプトマイシン、サルファ剤の耐性大腸菌が指

深田恒夫ら

表4 各抗菌剤へ耐性を示したブドウ球菌の割合

抗菌剤	耐 性	中間型	合 計
ST	9 (5%)	0 (0%)	9 (5%)
PCG	13 (7%)	14 (8%)	27 (15%)
TC	7 (4%)	6 (3%)	13 (7%)
CP	4 (2%)	4 (2%)	8 (4%)
ABPC	8 (4%)	8 (4%)	16 (9%)
CEX	5 (3%)	17 (9%)	23 (12%)
OFLX	3 (2%)	28 (15%)	31 (17%)
調べた菌株数	174		

ST:スルファメトキサゾール-トリメトプラム, PCG:ペニシリン G, CP:クロラムフェニコール, TC:テトラサイクリン 30, ABPC:アンピシリン, CEX:セファレキシン, OFLX:オフロキサシン
10

標となると結論づけた。今回の調査で野生動物から比較的多く PCG, ABPC への耐性菌が分離された。ヒトの保有する耐性菌の耐性パターンが変化しているように [7], 野生動物が保有する薬剤耐性菌も、従来から使用されているテトラサイクリン

系以外にも新しいサルファ剤やニューキノロン系抗生物質への耐性が年々増加している [2]。比較的新しい OFLX のような抗菌剤および耐性の成立されにくいとされている CP, ST などの抗菌剤への耐性菌が野生動物から分離された。このことは、ヒトと同様に野生動物の間にもこれらの抗菌剤への耐性菌が次第に増加してきている可能性を示唆している。

Kinjo ら [1] によるニホンカモシカの糞便の調査では、カモシカのわずか 2.5 ~ 4.9% しか糞便に薬剤耐性大腸菌を保有していなかった。上記の報告 [2,7] でも耐性菌が高率に分離されており、今回の調査では、糞便以外の部位からも採取したとはいえ、野生のタヌキの 38%, 野生のクマの 29% から耐性菌が分離された。タヌキは、カモシカに比べ人間環境への接触が極めて高い。薬剤耐性菌に関する研究は、野生動物に関する報告は少ないものの、それらの報告と今回を比べてみると最近では野生動物の耐性菌保有率が高まってきている [2,7]。特に、今回、タヌキは人里に近い野生動物、クマは人里離れる野生動物と考えたが耐性菌の分離率から考えるとその差はなかった。人里離れた場所で生息していると思われるクマの生息場所

図1 *S. aureus* および *S. sciuri* の制限酵素 *Sma* I による DNA 断片の PFGE パターン

レーン M: λ ladders; レーン 12 ~ 16: *S. aureus*; レーン 17 ~ 24: *S. sciuri*; レーン 12 ~ 15: 野生のツキノワグマ; レーン 16: 動物園のツキノワグマ; レーン 17 ~ 21: 野生のツキノワグマ; レーン 22: 牧場のツキノワグマ; レーン 23: 動物園のツキノワグマ; レーン 24: 野生のホンダタヌキ, レーン 16 と 23 は PCG に耐性, レーン 17 と 18 は TM に中間の耐性, 他のレーンは検査した薬剤すべてに感受性あり

野生動物のブドウ球菌による環境評価

も人里近くで生息しているタヌキと同様にヒトによって汚染されていることが判明した。

食中毒などの感染源の特定に PFGE が用いられ、ブドウ球菌にも PFGE パターンによってその相同性が検討されている [8,9,10]。今回、異なるクマ個体から同じ PFGE パターンを示す 2 株の *S. sciuri* が分離された。この 2 株を保有していたクマの生息地は非常に近く、この 2 頭が直接あるいは間接的に接触したことにより一方から他方に、あるいは同じ感染源から伝播された可能性が考えられる。さらに、この菌株は TC に中間型の耐性を示していたことから、野生動物間での薬剤耐性菌の伝播、あるいは同一の汚染物質を介した耐性菌の伝播である可能性が示唆された。

タヌキから分離されたブドウ球菌では同じバンドパターンを示すものは認められなかったが、約 70% のバンドが一致した 2 株の *S. aureus* がみられた。この 2 株のバンドパターンが約 70% 一致したことは遺伝的に同一のものから分化したと考えられる [3,6]。これらを保有していたタヌキは、岐阜県と神奈川県野生のタヌキであって直接の接触は考えられない。したがって、何らかの方法でヒトが介在したタヌキに感染し変異したか、あるいは人間界で変異した後、感染した可能性が考えられる。

したがって、薬剤耐性ブドウ球菌はヒトの社会から野生動物へ伝播していることと野生動物間で伝播した可能性も示唆され、野生動物が生息する環境がますますヒトによって汚染されていることが判明した。

謝 辞

本研究は、文部科学省 21 世紀 COE プログラムによる研究助成 (E-1) によって行われた。

要 約

野生のホンダタヌキおよびツキノワグマから分離したブドウ球菌の薬剤感受性および分子疫学的調査することによって環境評価を行った。2003 年 3 月から 2004 年 9 月までに集められたホンダタヌキ 26 頭（野生 21 頭、動物園 5 頭）およびツキノワグマ 35 頭（野生 21 頭、クマ牧場 10 頭、動物園 4 頭）からブドウ球菌を分離した。材料の採取部位は、剖検を行った個体では口腔、鼻腔、耳垢および肛門とし、それ以外では糞便および耳垢、あるいは糞便のみとした。1) 分離したブドウ球菌は、ホンダタヌキからは *S. delphini* と *S. xylosus* が、ツキノワグマからは *S. shleiferi* が有意に多く分離された ($p < 0.05$)。

2) ブドウ球菌 174 株について 7 種類の抗菌剤で耐性を調べ、両動物ともに動物園動物は野生動物よりも有意に耐性菌保有率が高かった ($p < 0.05$)。これらの野生動物間では、薬剤耐性保有率に有意差はなかった。3) ツキノワグマおよびホンダタヌキから多く分離された *S. aureus* 16 菌株および *S. sciuri* 21 菌株について、制限酵素 *SmaI* を用いてパルスフィールド電気泳動法により DNA バンドパターンを調べた結果、動物種による特有のバンドパターンは検出されなかった。近い地域に生息していたツキノワグマ 2 頭から同じバンドパターンを示した *S. aureus* が分離された。これらは同じ薬剤耐性パターンを示した。したがって、薬剤耐性ブドウ球菌はヒトの社会から野生動物へ伝播していることと野生動物間で伝播した可能性も示唆された。

キーワード：環境評価、ツキノワグマ、パルスフィールド電気泳動、ホンダタヌキ、薬剤耐性

引用文献

1. Kinjo T, Minamoto N, Sugiyama M, Sugiyama Y. 1992. Comparison of antimicrobial resistant *Escherichia coli* in wild and captive Japanese serows. *J Vet Med Sci* 54: 821-827.
2. O'Rourke K. 2003. Antimicrobial resistance in wildlife: it's making a bigger splash than you think. *J Am Vet Med Assoc* 223: 756-757.
3. 満田年宏. 2002. 感染症対策のための分子疫学入門. メディカ出版. 大阪.
4. Hauschild T, Kehrenberg C, Schwarz S. 2003. Tetracycline resistance in *Staphylococci* from free-living rodents and insectivores. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50: 443-446.
5. Goering RV. 1993. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 14: 595-600.
6. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, 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.
7. 中谷林太郎. 1977. 薬剤耐性. 講談社. 東京.
8. Vautor E, Abadie G, Guibert JM, Huard C, Pepin M. 2003. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol* 96: 69-79.
9. Zadoks RN, van Leeuwen WB, Kreft D, Fox LK, Barkema HW, Schukken YH, van Belkum A. 2002. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing PFGE and binary typing. *J Clin Microbiol* 40: 3894-3902.
10. Tondo EC, Guimarases MC, Henriques JP, Ayub MA. 2000. Assessing and analyzing contamination of a dairy product processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. *Can J Microbiol* 46: 1108-1114.