

出水平野に飛来するツルの糞便から分離された
サルモネラおよび大腸菌

北代 典幸

2011

目 次

序 文	(頁)
出水平野に飛来するツル	1
第 1 章	
出水平野に飛来するツル糞便からのサルモネラ分離調査 (2000－2008)：血清型、薬剤感受性および PFGE 型別	
1-1 緒 言	6
1-2 材料および方法	7
1-3 結 果	11
1-4 考 察	12
1-5 小 括	15
第 2 章	
出水平野に飛来するツル糞便から分離された大腸菌の薬剤 感受性	
2-1 緒 言	16
2-2 材料および方法	18
2-3 結 果	20
2-4 考 察	21
2-5 小 括	24
総 括	26
謝 辞	29
引用文献	30
写真および図表	37
Summary (英文要旨)	46

序 文

出水平野に飛来するツル

はじめに、本研究対象となる出水平野に飛来するツルについて、その飛来状況、給餌、農作物への関与、傷病および死亡、保護活動および今後の課題を、文献資料[16-22, 38, 43, 44]を参考にしながら概説する。

飛来状況： 国の特別天然記念物に指定されているツルが 1927 年（昭和 2 年）から鹿児島県北部の出水平野に飛来している記録が「鹿児島県鶴保護会資料」の中に残っている。1960 年頃までの飛来羽数は 1,000 羽に満たなかったが、その後は徐々に増え、1990 年（平成 2 年）以降には毎冬約 10,000 羽以上のツルが飛来している。ツルの約 70%がナベヅル(*Grus monacha*)であり、残り約 30%をマナヅル(*G. vipio*)が占め、そのほか少数ではあるが、クロヅル(*G. grus*)、アネハヅル(*Anthropoides virgo*)、ソデグロヅル(*Balearica leucogeranus*)、カナダヅル(*G. canadensis*)、およびタンチョウヅル(*G. japonensis*)なども飛来してくる。特に、出水平野に飛来するナベヅルは、世界のナベヅルの約 9 割を占めるとされている（写真 序-1）。

ナベヅルおよびマナヅルの繁殖地は中国の東北部あるいはロシアの一部とされているが詳細は不明である。これらの繁殖地から韓国等を経て、数千キロにも及ぶ長旅の末日本に到着する。日本以外の越冬地として中国および韓国があげられるが、最近ではこれらの国で冬を越すツルは少なくなっているようである。

日本での越冬地は、出水平野以外に山口県熊毛町八代の水田地帯があるが、山口県での羽数は20羽前後と少なく、しかもナベヅル一種である。これに比べて出水平野には1997年度以降1万羽以上にも及ぶツルが集中的に飛来している。ツル博物館[14]の報告によれば、2007年度はナベヅルが10,973羽、マナヅルが1,059羽、クロヅルが3羽、カナダヅルが2羽、ナベクロヅルが2羽、合計12,039羽のツルが越冬したとある。「鹿児島県レッドデータブック」[22]では、出水平野で越冬する国指定の特別天然記念物のツル類について、ナベヅルとマナヅルを絶滅危惧Ⅱ類に、その他のクロヅル、カナダヅル、ソデグロヅル、アネハヅルを準絶滅危惧にして、生物の多様性を見地からも重要な生態系の構成種として位置付けている。

出水平野にツルが滞在するのは、毎年、10月中旬から翌年の3月中旬までの約5カ月間である。この間1万羽以上のツルが大群を形成し集団生活をす。ツルの滞在する地域は荒崎の休遊地、東干拓地、西干拓地およびそれ以外の分散地に分けられるが、荒崎の休遊地に最も多く集まる。この休遊地には、ツルが滞在する間に所有者より借り受けた水田に人工的に水位15cmほどに水を張った「ねぐら」が設けられ、ツルは夜間ここで眠る。

給 餌： 本来ツルはドジョウ、カニ類、タニシ、イナゴ、ヤゴ、ガの幼虫などの動物質や、イネ（飛来する季節には水田に二番穂が実る）や麦の実、クログワイ、ヒメホタルイなど水田に成育する多年生草本の根塊、サツマイモやジャガイモなどの植物質を食して越冬している。この季節には出水平野では水稻収穫後の水田で、ソラマメ、エンドウ、麦などの作物が耕作されているが、しばしばこれらの農作物がツルによってついばまれて収穫が減少し、農家にとっての経済的被害となっていることがある。これらの農作物の被害

(食害)を防ぐためおよびツルの保護も含めて、この休遊地内にある観察センター前の農道には、毎早朝、小麦を中心に粃、玄米、オートミール、大豆、パンくず、および落ち穂などの餌が人為的に撒かれ、また北帰行前には長旅に備えて近くの阿久根港で水揚げされた新鮮なイワシが給餌される(写真 序-2)。この人工給餌は、ツルが出水平野に集中して集まるようになった大きな要因の一つと考えられている。

農作物等への関与： 出水平野に飛来する羽数が増え、出水市の大きな観光資源となっている反面、いくつかのマイナス面もある。そのひとつが農作物の被害であるが、農作物の被害はツルに限定されるものではない。農家においては、ツル以外の渡り鳥である、カモやカラス、あるいは留鳥のハトによる被害のほうがツルの被害よりも大きいとの見方もある。他方、これらのツル以外の野鳥はツルの給餌を求めてこの出水平野に集ってきているという一面もあり、複雑な状況でもある。生息する小動物(ドジョウ、カニ類、タニシ、ヤゴなど)を捕食するために田圃やあぜ道を嘴で掘り起こすため、たちまち田圃は荒らされてくる(写真 序-3)。このため、毎春、田植えの前には田圃の補修作業が必要になっている。

休遊地周辺の畑地にも舞い降り、農作物に被害が生じているが、農家は案山子、網、ヒモ、テープを張るなどで被害を最小限に止めるよう努めている。

傷病および死亡： 出水平野で越冬中に死亡するツルの数も少なくない。正確な数は不明であるが、ツル保護会の監視員が確認できる死亡個体の数は毎冬、十数羽から50羽に達することもある。また、稀に衰弱あるいは傷病のため捕獲され、荒崎休遊地の傍に設けられた保護ケージ内で飼育される個体

もある（写真 序-4）。保護されたツルが元気に回復した場合には、北帰行に合わせて放鳥される。死亡個体として発見されたツルのうち、死因究明のための解剖が出来る個体は鹿児島大学に搬入され検査されるが、その数は毎冬約 20～25 羽程度である。死亡個体の中には、死亡後に他の野生生物から襲われほとんど残骸の無い状態のものもある。安田らの調査[43, 44]によれば、検査された死亡個体の推定死亡原因には、墜落死・失血死（高圧電線に追突などによると見られる骨折、脱臼、部分欠失など）、内臓コクシジウム症、寄生虫症、衰弱などがあるが、死亡原因不明も多い（写真 序-5）。

保護活動：出水市は重要な観光資源として、ツル保護活動に取り組んでいる。平成 7 年 4 月に、出水市文化町 1000 番地に「ツル博物館 クレインパークいづみ」が建設され、ツルに関する保護、研究活動、それらの情報発信基地となっている。出水市長を会長とする「出水市ツル保護会」が設けられ、監視員による飛来後のツルの観察が毎日続けられ、異状を見つければすぐに関係機関に連絡し、対応できるようになっている。

鹿児島県教育委員会では、平成 6 年以降、国の補助を受け「長期的ツル保護環境調査事業」を実施し、農作物への被害と防護、死亡原因調査、行動および餌付けの影響などが調査され、その成果は報告書にまとめられている。飛来羽数の調査には、荒崎地区にある荘中学校の生徒たちが、行動調査には（財）鹿児島県環境技術協会が、また死亡原因調査には鹿児島大学（獣医学科）が協力し行なわれている。

今後の課題：平成 22 年 12 月 20 日に死亡したナベヅル 2 羽が鹿児島大学（獣医学科）に持ち込まれ、検査の結果、高病原性鳥インフルエンザ（HPAI）

であることが判明した。さらに翌年 2 月 13 日までに合計 7 羽のナベヅルが HPAI であると診断された。この間の平成 23 年 1 月 25 日に、ツルの休遊地に近いところに位置する A 採卵養鶏場においても HPAI が発生した。この出水平野の一連の HPAI 発生は、同季節に全国各地で発生した養鶏場での HPAI あるいは野鳥の HPAI の流行のひとつに過ぎなかったが、ツルでの集団発生は初めてのことであり、注目されることになった。幸い、ツル群内での大きな集団発生には至らなかったが、ツルに病原性の高い病原体が侵入した場合には、ツルが全滅する恐れがあるという、これまでの心配がより現実的なものとして受け止められるようになった。ツルは他の野鳥から HPAI ウイルスの感染を受けたと思われるが、ツルがこのウイルスの増幅動物（アンプリファイヤー）あるいは汚染源になりうるとすれば、周辺養鶏場あるいは人への感染源として対応しなければならない。

出水平野というごく限られた場所に世界に生息するナベヅルの 9 割以上が集まるという状況は、悪性伝染病の発生などを考えれば、望ましいことではない。ツルが越冬できる自然環境が減少している現状ではあるが、ツルの種の保存や感染症対応に配慮したツルの分散化は今後の大きな課題となっている。

本研究の目的： 動物種の保存および人との共生を考える時、その動物の諸性状のひとつとして、どのような病原体に感染し、また保有しているかを調査することは重要なことである。ツルの病原微生物感染に関する研究はほとんど行なわれていない。本研究は、人および野生動物の病原微生物として最もよく知られているサルモネラおよび大腸菌を取り上げ、それらのツルでの感染実態を調査したものである。

第 1 章

出水平野に飛来するツル糞便からのサルモネラ分離調査 (2000—2008) : 血清型、薬剤感受性および PFGE 型別

1-1. 緒 言

出水平野に飛来するツルの現状については序文に記載したとおりである。毎年、10 月～翌年 2 月までの約 5 ヶ月間、10,000 羽を越すツルが中国東北部やシベリアから朝鮮半島経由で飛来し、集団で越冬する。ツルだけではなく、その他カモなどの渡り鳥も同じ場所で生活する。これらの野鳥は種々の病原微生物に感染し、保有しているであろうことから、異なる野鳥がこの場所で集団生活する間に、お互いの病原体を直接あるいは間接的に伝播させていることは容易に想像できる。

この出水平野はわが国の中でも有数の養鶏地域として知られ、多くの採卵鶏あるいはブロイラー農場が密集して存在している。

ツルは水禽類とはいえ、鶏と同様に鳥類であることから、いくつかの病原微生物においては両者の間による相互感染は十分に起こりえるだろう。しかしながら、ツルの病原微生物に関する調査研究は少なく、病原微生物に関することはほとんど分かっていない。鹿児島大学獣医学科微生物学分野（研究室）では、1990 年代後半から、ツルの糞便を用いて病原微生物に関する調査を開始した。その結果、2001 年度までの調査で *Salmonella* Typhimurium (ST) が比較的高頻度で分離されることが分かった[15, 27]。

そこで、筆者らはさらに 2002 年 11 月～2008 年 2 月の長期に渡り、ツル

糞便からのサルモネラ分離を試みたところ、毎年度高率にサルモネラが分離されることがわかった。ここでは、2000 および 2001 年度の既報告[15]の成績を含めて、2000～2008 年の長期にわたって分離されたサルモネラの血清型、薬剤感受性ならびにパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）による菌株間の関連性について検討、考察した。

1-2. 材料および方法

1) 糞便材料

ツルの新鮮糞便は出水平野のツル休遊地において、2000 年 11 月から 2008 年 2 月の毎冬、10 月から翌年 3 月までに 3～5 回（1 回／月の頻度）にわたり、2,593 検体（20～141 検体／回）の糞便が滅菌シャーレに採取された（表 1-1）。ツルの糞便はその他の野鳥に比べ大きいため識別は容易である（写真序-6）。糞便の一部はナベヅルおよびマナヅルを区別して採取した。すなわち、休遊地周辺の田圃に 2～4 羽の家族構成でいるナベヅル又はマナヅルを数時間待機観察し、ツルが移動後にその場所に行き、排泄されている糞便を採取した。しかし、サルモネラの分離成績に両ツル間で大きな差のなかったこと [15]、および糞便の大半はツルの種別での識別は不能であったため、成績はツル混合（種別なし）としてまとめられた。

2) サルモネラの分離および同定方法

ツル糞便の 1g を、ハーナ・テトラチオン酸塩（HTT）培地（栄研化学：東京）10ml の入った試験管内に移し、40℃で 24～48 時間増菌培養した。その後、この試験管内から 1 白金耳量を取り、選択培地である DHL 寒天培地

(栄研化学) に接種し、37°Cで24時間培養した。DHL 寒天培地上に発育してきた黒色コロニーを釣菌し、普通寒天培地でクローニングのため純培養を2回繰り返した。クローニングされた菌は TSI 寒天培地 (栄研化学) でブドウ糖利用、乳糖・白糖非利用、および硫化水素産生を、SIM 確認培地 (ニッスイ製薬) で硫化水素産生、インドール非産生、および運動性有りを、またリジン脱炭酸試験用培地 (栄研化学) でリジン脱炭酸酵素産生を確認し、これらの性状を示したものをサルモネラの疑われる菌とし、市販 (デンカ生研) の O 抗原および H 抗原に対する抗血清を用いて血清型別試験を行い同定した。

O 群型別試験： O 抗原の同定にはまず O 多価および O1 多価血清を使用した。分離株をトリプトソイ寒天培地 (栄研化学) で好氣的条件のもと 37°C、24 時間培養し、マッチ棒の頭 3~5 倍程度の菌体を掻き取り、小試験管に入れた 0.5ml の生理食塩液に均一に浮遊させたものを O 群型別用抗原液とした。この抗原液 1 白金耳をスライドグラスに取り、その上方に O 多価および O1 多価血清 30 μ l を滴下し、それらをよく混和して、スライドグラスを前後に傾斜させながら凝集の有無、濃度、時間などを観察した。多価血清で凝集陽性と判定された場合、その多価血清を構成する単価血清を用いて上記と同様に試験した。

H 型別試験： H 抗原の型別には、これまでの報告[15, 27]を考慮し、H1,2 および a,b,G, i ,r 抗血清を使用した。ブイヨン培地 (ニッスイ製薬) 2ml に分離菌を接種し、37°C、24 時間培養した。増殖により混濁した培養液に等量の 1%ホルマリン加生理食塩液を加えて混和し、H 型別用抗原液とした。小試験管に抗原液 0.3ml を移し、H1、2 および a、b、G、i、r 抗血清をそれぞれ 2 滴加えてよく混和し、50°C恒温槽中で 1 時間反応させた後、凝集の有無を肉眼で観察した。各血清との反応で、綿状の凝集が観察されたものを陽

性、均一な浮遊液のままのものを陰性とした。

H 血清型で一つの血清型が陽性になった場合、逆相の誘導を行った。小試験管に 0.5%寒天加ブイオン培地 3ml を分注し、陽性となった H 型の相誘導用血清を 0.1ml 添加・混和し、50°C で保温した。これに滅菌したクレイギー管を試験管の中央に立てた状態で寒天を固まらせ、クレイギー管の上部の穴から白金線を用いて菌を接種した。翌日、クレイギー管の外側に増殖してきた菌を釣菌し、ブイオン培地に接種して、上記に示した試験管凝集法により、逆相の H 型別を行った。

3) 薬剤感受性試験

供試菌株： 分離された 423 株のうち、156 株 (ST:131 株、*S. Hvitvingfoss*/II : 9 株、*S. Abaetetuba* : 4 株、*S. Enteritidis* : 1 株、*S. Konstanz* : 2 株、*S. Pakistan* : 1 株および型別不能 : 8 株) を用いた。これら菌株のコロニーから一白金耳を取り、ブイオン培地に接種し、37°C、20 時間培養した。培養後、菌は通常約 10^8 個/ml に増殖しているので、希釈用に準備しておいた滅菌リン酸緩衝食塩液 (Phosphate Buffered Saline : PBS) で希釈を行い、接種菌量を約 10^6 個/ml になるように調整し、接種用菌液として供試した。

供試薬剤： 供試薬剤は市販のアンピシリン (ABPC)、オキシテトラサイクリン (OTC)、コリスチン (CL)、ゲンタマイシン (GM)、カナマイシン (KM)、ホスホマイシン (FOM)、ナリジクス酸 (NAL)、オキシリン酸 (OXA)、ノルフロキサシン (NRFX)、ジヒドロストレプトマイシン (DSM)、クロラムフェニコール (CP)、およびセファゾリン (CEZ) の 12 薬剤を使用した。これらの薬剤をそれぞれに適した溶媒を用いて 1mg (力価) /ml の濃度になるように調整し、供試薬剤原液とした。

最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) の測定 :
各薬剤に対する MIC の測定には、日本化学療法学会標準法[32]に準拠した寒天平板希釈法を用いた。滅菌シャーレに調整した薬剤の希釈液 2ml を入れ、このシャーレに、滅菌し 50°Cに保持したミューラーヒントン寒天培地 (Becton, Dickinson and Co.) 18ml を入れ、薬剤と十分混和した後に固化させ薬剤含有平板培地とした。また、薬剤を含まない対照平板培地を用意した。接種用菌液を、マイクロプランターに取り、静かに薬剤含有平板培地および対照平板培地にスポットした。平板表面の菌液が完全に乾いた後、シャーレを反転し、37°C、20 時間培養し、菌の発育の有無を判定した。接種菌の発育が完全に阻止された薬剤の最低濃度をもって MIC 値とした。

4) PFGE による ST の DNA 解析

試験に用いた ST は、2000 年度分離の 9 株、2001 年度の 21 株、2002 年度の 12 株、2003 年度の 8 株、2004 年度の 13 株、2005 年度の 22 株、ならびに 1997 年に分離された ST[15]の 3 株、合計 88 株である。これらの菌株を 5ml の LB 培地にて 37°Cで 18 時間振盪培養したのち、50 μ l をマイクロチューブにとり 30 秒間煮沸、直ちに氷冷した。次に遠心後の上清を除去し、100 μ l の EET (100mM EDTA、10mM EGTA、10mM Tris、pH8.0) に懸濁後、同量の 1.6%クロモゾーマルアガロース (Bio-Rad Laboratories, USA) を加えプラグを作成した。その後、プラグを 37°Cで 3 時間リゾチーム処理し、50°Cで一夜プロティナーゼ K を用いて処理した。さらに、40ml の TE(10mM Tris、1ml EDTA、pH8.0) で洗浄を行った後、プラグ中の DNA を 37°Cで 18 時間、XbaI (25U) で切断し、1%アガロースゲルを用い PFGE 装置 (Bio-Rad Laboratories, USA) で泳動 (14°C、6 V/cm、5~50 秒、22 時間) した。

泳動終了後、エチジウムブロマイドで染色し、トランスイルミネーター上でポラロイドカメラを用いて撮影後、バンドパターンを観察した。

1-3. 結 果

1) ST の分離成績

各年度および各月別のサルモネラ分離成績をまとめて示した（表 1-1）。2000 年度はツル糞便 171 検体中 43 株のサルモネラが分離され、25.1%の分離率であった。同様に 2001～2007 年度は 12.3%、43.5%、20.4%、20.6%、16.8%、7.4%および 6.4%から分離され、多少のばらつきはあるものの、毎年度分離された。この 8 年間の年度別分離率の平均は 19.1%であるが、全 2,593 検体からの分離率は 16.3%（423 株）であった。月別にみると、飛来直後よりも北帰行前の方が高い分離率であった。

分離されたサルモネラの血清型は、*S. Typhimurium*(ST)(O4:Hi:H1、2)が 396 株(93.6%)で大部分を占め、毎年分離された（表 1-2）。その他に分離された血清型として、2006 年度に *S. Hvittingfoss* または *S. II*（以後 *S. Hvittingfoss/II* とする）(O16:Hb:He、n、x)が 9 株(2.1%)、2006 年度と 2007 年度に型別不能 (O4) のものが 8 株 (1.9%)、2007 年度に *S. Abaetetuba*(O11:Hk:1、5)が 4 株(0.9%)、2003 年度および 2004 年度に *S. Enteritidis* (O9:Hg:H-)が 3 株(0.7%)、2006 年度に *S. Konstanz* (O8:Hb:He、n、x)が 2 株(0.5%)、2005 年度に *S. Pakistan* (O8:H1、v:H1、2)が 1 株(0.2%)分離された。ST 以外の血清型は一過性に分離され、継続して分離される傾向にはなかった。

型別不能株について、2006 年度に分離された 6 株はいずれも O 抗原が 4、

H 抗原の I 相が i、II 相が既存の抗原では同定できないものであり、また 2007 年度に分離された 2 株は、O 抗原が 4、H 抗原が既存の抗原では同定できないものであった。なお、これらの型別不能株の異同については不明である。

2) 薬剤感受性試験成績

供試した 156 株の薬剤感受性試験の結果を示した (表 1-3)。各薬剤の MIC 値は、2000 年度に分離された *S. Typhimurium* 1 株が GM で 50 μ g/ml という高い MIC 値を示したこと、および 2003 年度に分離された *S. Enteritidis* の 1 株が ABPC で >100 μ g/ml という高い MIC 値を示したことを除けば、各薬剤の MIC は血清型に関わらずほぼ一様な分布をとり、ABPC : 6.25 ~ 0.39 μ g/ml、DSM : >100 ~ 25 μ g/ml、CEZ : 6.25 ~ 0.78 μ g/ml、KM : 12.5 ~ 0.78 μ g/ml、OTC : 6.25 ~ 0.78 μ g/ml、CL : 6.25 ~ 0.39 μ g/ml、NRFX : 0.78 ~ <0.1 μ g/ml、OXA : 3.13 ~ 0.1 μ g/ml、CP : 25 ~ 0.78 μ g/ml、NAL : 25 ~ 1.56 μ g/ml、GM : 6.25 ~ 0.39 μ g/ml、および FOM : 50 ~ 3.13 μ g/ml であった。

3) PFGE の結果

供試したツルの糞便由来 ST 88 株のうち 3 株はバンド形成不能あるいは不明瞭で判定不能であった。明瞭なバンドが形成された 85 株のうち 84 株はほぼ同じ泳動パターン (パターン I) を示し、1 株 (2004 年に分離) のみが異なる泳動パターン (パターン II) を示した。泳動パターンの一例は図に示した (図 1-1)。

1-4. 考 察

出水平野では、約 5 カ月間 1 万羽を超えるツルが集団生活をし、夜には水田に水を張った“ねぐら”に身を寄せ合うようにして眠る。カモやカラスなどの渡り鳥も多く飛来する。周辺にはブロイラーおよびレイヤーの養鶏場も多く存在する。このような環境下で病原体が侵入した場合は、ツル群内に留まらずに、ツルから他の野鳥あるいは鶏群への伝播が懸念される。

著者らの 8 年間に及ぶ調査から、毎年度、ツルの糞便から ST が高率に分離され、稀に ST 以外のサルモネラの血清型も分離されることがわかった。サルモネラは多くの哺乳類、鳥類、および爬虫類などから分離される菌であり、近年における野鳥からの分離報告も海外[2, 11, 33, 36]および国内[42]でいくつかみられ、ツルから分離されたことは不思議ではない。しかしながら、今回のような渡り鳥（ツル）の飛来地における長期にわたる分離報告はみあたらない。

近年の全国的な調査によれば、わが国の家畜・家きんから分離された ST のほとんどが耐性菌であり、またその中に多剤耐性菌も多く認められたと報告されている[12]。今回のツルから分離されたサルモネラ 156 株の薬剤感受性試験の結果では MIC 値の分布に明らかな二峰性の認められる薬剤はなかったが、ST1 株と SE 1 株の 2 株のみが GM と ABPC に対し薬剤耐性菌と思われた。これらの耐性菌はその後分離されないことから、一過性のものでありツル群内に薬剤耐性のサルモネラ汚染はほとんどないものと思われる。

既報[27]においてはプラスミドプロファイルテストにより、分離した ST 8 株が同じ性状を示したと報告された。今回は株数を増し、また既報[27]の分離株 3 株も加え、分離株間での遺伝的関連性について PFGE で解析した。その結果、1997 年および 2000～2007 年に分離された ST は 1 株を除き、全て同じ泳動パターンを示した。Tenover ら[39]の PFGE 泳動パターンの解釈を

参考にすれば、出水平野のツル群内には起源を同じにする ST が感染している可能性が高い。

既報[27]の結果も考慮すると、出水平野に飛来したツル群から約 10 年間、毎年同一性状の ST が分離されることは極めて興味深い。この休遊地は春から夏には水田として利用されるため、排泄された ST が土壌中に維持され翌年の感染源になることは考えにくい。鶏の場合、サルモネラは持続感染し糞便中への排菌が検出されなくなった時期に、鶏の抵抗力が低下あるいは制限給餌等のストレスが加わると再び排菌されるようになる[13, 14]。ツルの場合も同様に考えると、出水平野で感染したツルの一部が保菌状態のまま繁殖地であるシベリアあるいは中国北部へ帰行し、翌年再びひな鳥と共に飛来する中、長旅などの疲れやストレスが加わり排菌するようになる。その排菌された ST はひな鳥たちに感染し、さらに多くが排菌される。この排菌された ST によりさらに汚染が拡大する。このような感染を毎年繰り返しているのではなかろうかと推察される。このような推察は、飛来直後から北帰行に向け分離率が高くなる成績[27]と矛盾しない。

ST 以外の血清型が稀に分離されたが、分離率は非常に低く、また継続して分離されることもなかった。これは、ST 感染が先行しているため、ST による自然感染免疫が成立することで他のサルモネラ感染の成立が困難になっているためかもしれない。

出水平野に飛来する他の野鳥あるいは周辺で飼育される鶏から分離される ST に、ツルから分離される ST と同じ PFGE パターンをもつものが存在するかどうか、興味深い。別途、このツルの休遊地に近い川岸から採取したカモの糞便から分離された ST1 株が、ツル由来 ST と同じ PFGE パターンを示したことがある（未発表）。カモとツルの間で ST の伝播が起きているのかもしれない。

れない。

1-5. 小 括

鹿児島県出水平野に 2000 年 11 月から 2007 年 2 月までに飛来したツルから採取した糞便 2,593 検体のうち 423 検体 (16.3%) からサルモネラが分離された。サルモネラは毎年 6.4%~43.5% (平均 19.1%) の割合で分離された。分離菌の血清型は ST が 396 株(93.6%)、*S. Hvittingfoss/II* が 9 株、*S. Abaetetuba* が 4 株、*S. Enteritidis* が 3 株、*S. Konstanz* が 2 株、*S. Pakistan* が 1 株および型別不能が 8 株であった。ST は毎年分離されたが、その他の血清型は一過性に分離された。このうち、156 株について、12 薬剤に対する薬剤感受性試験を行なったところ、ABPC に対して 1 株 (*S. Enteritidis*) および GM に対して 1 株 (ST) のみが耐性菌と考えられた。なお、ST の 85 株について、PFGE で DNA 切断パターンを実施したところ、84 株がほぼ同じ泳動パターンを示し、残り 1 株は異なる泳動パターンを示した。これらのことからツル群内には毎年同一性状を持つ ST が感染を繰り返し、時折異なる血清型あるいは遺伝子型が侵入し感染していることがわかった。

第2章

出水平野に飛来するツル糞便から分離された大腸菌の薬剤感受性

2-1. 緒言

薬剤耐性菌の出現は、今日多くの感染症の治療を困難にしている。特に多剤耐性菌は、ひとつの社会問題ともなっている。近年、薬剤耐性菌は人以上に牛、豚および鶏などの家畜で検出され、その保有率は非常に高く[10, 25]、さらに人工的な薬剤と全く無縁である野生動物も薬剤耐性菌を保有していることが様々な動物種で報告されており[4, 9, 24, 31]、薬剤耐性菌は今や人医療のみの問題とは言えなくなっている。さらに社会問題にもなったバンコマイシン耐性腸球菌の出現原因は人医療に起因するものか、養鶏現場に起因するものかが疑われた経緯がある[29]。薬剤耐性菌の出現には抗菌性薬剤の使用頻度に由来することが Asai ら [3] により明らかにされている。すなわち我が国の薬剤別販売使用量と我が国の家畜糞便由来の薬剤別耐性大腸菌の保有率には高い相関性が示されることから、獣医療現場での抗菌性薬剤の使用が耐性菌を出現させていることは今や否定はできない。2003年「人以外への抗菌性薬剤の使用と薬剤耐性に関する専門家会議」がジュネーブで開催され、産業動物における抗菌性薬剤の使用が人の健康に影響する明らかな根拠があることが勧告され、動物用抗菌剤のリスク管理へ向けた取り組みに大きな影響を与えた。

わが国では 1999 年度に家畜衛生分野における耐性菌のモニタリング体制 (Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System;

JVARM)が開始され[25]、獣医療における抗菌剤の慎重使用喚起と薬効の確保および家畜由来株の人医療におよぼす影響を明らかとするデータが集積されてきている[3, 25, 26]。

先に述べた通り、治療経歴を有さない野生動物からも耐性菌が検出され、この保有率はその動物種や生息する場所により様々である[4, 9, 10, 24]。前章でも述べた通り野生ツルに、同じ腸内細菌科目のサルモネラ属菌はほとんど耐性菌が存在しないことが示されている[15]。一方、野生コウモリには80%を超える耐性菌の保有が[1]、また有害動物駆除のために地域に導入され、強い繁殖力と生存力によりその生息域を拡大していく沖縄本島のマングースには薬剤耐性菌はほとんど保有していないが、同様の侵略的外来哺乳類のニホンイタチには高い割合で薬剤耐性菌が保有されていることが知られている[30]。おそらく耐性菌の蔓延の拡がりにはプラスミド等のベクターを介したものであると推測されているが、その詳細は明らかとされていない。唯一耐性菌および伝達性プラスミドの保有状況とその野生動物の食性と生息環境が指摘されている[23]程度であり、動物が薬剤耐性菌を保有するメカニズムはあまり明白にされていない。野生動物の糞便由来大腸菌の薬剤耐性調査はその動物種の種特異性を示す生物学とも考えられている[30]。

ところで、既に序文において述べたように、鹿児島県出水野には、10月中旬から3月中旬までシベリアあるいは中国北部より、ツルが越冬のために飛来する。飛来するツルのほとんどは、ナベヅルとマナヅル種であり、両ツル種は環境省の絶滅危惧種にも指定されている。ナベヅルのように、一種類の動物が一か所に集まるタイプの動物種にとっては、どのような細菌や病原体を保有しているかを捉えていくことはその動物種の特異性を知るという観点、あるいは種の保存という観点から、生物学上重要である。一方、鹿児島

県はわが国屈指の一大畜産地域であり、出水平野周辺においても多くの家畜・家きんが飼養・生産されている。もし、ツルが多くの薬剤耐性菌を有するとすれば周辺の家畜や人間に与える影響は無視できないと思われる。大腸菌は多くの動物種の腸管に共生するグラム陰性桿菌であり、性線毛を介した情報の伝達が可能な細菌であり、腸管のみならず土壌・地水等にも存在する。それ故、大腸菌の特性を調査することは、さまざまな環境汚染等を知るための指標としての優位性がある。

本章の目的は出水平野に飛来するツル糞便由来大腸菌の薬剤感受性の調査を行い、耐性菌の検出頻度を明らかにすると共に、その代表的耐性遺伝子の保有状況の調査を行い、他の野生動物あるいは家畜・家きんのそれらと比較考察を行なうものである。

2-2. 材料および方法

1) 糞便材料および菌分離

ツルの新鮮糞便は出水平野のツル休遊地において、2007年11月および2008年1月に採取された192個を採取後24時間以内に試験に供した。すなわち、糞便材料は滅菌水に約10%になるように懸濁し、マッコンキー寒天培地に塗抹し、37°Cで24時間培養した後、大腸菌と思われるコロニーを1検体あたり1～2個釣菌し、トリプトソイ寒天培地（栄研化学）にてクローニングを2回実施した。その後、一般的な生化学試験（グラム染色、インドール、メチルレッド、VP、クエン酸利用能）およびグラム陰性桿菌同定用キットAPI20E（BioMérieux, France）により同定した。

2) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験はミュラーヒントン寒天培地 (Mueller Hinton agar, Becton, Dickinson and Co.) を用い、寒天平板希釈法を米国臨床検査基準 (Clinical and Laboratory Standards Institute : CLSI) の推奨する方法[6] に準拠し、最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。調べられた薬剤は次の 13 薬剤 : ampicillin (ABPC; Sigma Chemical Co.: Sigma), cefazolin (CEZ; Sigma), chloramphenicol (CP; Sigma), oxytetracycline (OTC; Sigma), minocycline (MINO; Sigma), kanamycin (KM; Sigma), gentamicin (GM; Sigma), nalidixic acid (NAL; Sigma), orbifloxacin (OBFX; Dainippon Sumitomo Pharma. Co. Ltd), oxolinic acid (OXA; Sigma), enrofloxacin (ERFX; Sigma), colistin (CL; Wako Pure Chemical Industries Ltd), および fosfomycin (FOM; Sigma) である。ブレイクポイント (耐性の限界値) は、OXA、OBFX、ERFX、CL 以外は CLSI[6]が規定する濃度を、ERFX、CL および OTC は Kojima ら[26]により使用され報告された値を使用した。OXA および OBFX のブレイクポイントは利用可能な既報値が見当たらず、判定外として処理された。

なお、薬剤感受性試験の対照菌として、*E. coli* ATCC 25922 および *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 の 2 株を用いた。

3) 薬剤耐性遺伝子の検査

薬剤耐性遺伝子の特性は PCR 法を用いて調べた。耐性遺伝子は、ABPC 耐性に対して *blaTEM*, *blaSHV* および *blaOXA-1* 遺伝子が、OTC 耐性に対して *tetA-E* および *tetM* 遺伝子が、KM 耐性に対しては *aphA1* 遺伝子が調べられた。PCR の条件およびプライマーは、*blaTEM*, *blaSHV*, *blaOXA-1* ,

tetA, *tetC*, *tetE* および *aphA1* 遺伝子は Maynard ら [28] の方法を、*tetB*, *tetD* および *tetM* 遺伝子は Costa ら [7] の方法を使用した。キノロン系薬剤に高い MIC 濃度を示した大腸菌株においては、*gyrA* および *parC* 遺伝子の耐性に関与する部分を PCR により増幅し [34, 45]、PCR と同じプライマーを使って両鎖の塩基配列を自動シーケンサーで決定した。得られた塩基配列は既知の *gyrA* の塩基配列 (GeneBank accession number X06373) および *parC* の塩基配列 (同 M58408) と比較した。

2-3. 結 果

検査した 192 個の糞便から計 138 株 (71.9%) の大腸菌が分離され、そのうちの 26 株 (18.8%) が耐性菌であり、最も多く耐性の認められた薬剤は OTC で、22 株であった (表 2-1, 2-2)。さらに MINO 耐性が 7 株、NAL 耐性が 4 株、ABPC 耐性が 4 株、ERFX 耐性が 2 株、さらに KM 耐性が 1 株認められた。MINO 耐性株の 2 株は同じテトラサイクリン系薬剤である OTC に耐性を示していた。フルオロキノロン剤 (ERFX) 耐性株はキノロン剤 (NAL) にも耐性を示した。ABPC、OTC、MINO および KM の多剤耐性株、さらに ABPC、OTC および NAL の多剤耐性株がそれぞれ 1 株ずつ認められた。

ABPC 耐性の 4 株には *blaTEM* が、また OTC 耐性株は *tetA* 遺伝子を 68% の割合で、*tetB* 遺伝子を 32% の割合で保有していた (表 2-3)。*tetB* 遺伝子を有していた株と MINO 耐性株は一致しており、MIC 値は 32~64 mg/l であった。KM 耐性株は *aphA1* を保有していた。

NAL 耐性を示した株はすべて GyrA タンパク質でひとつのアミノ酸が置換

(83番目のセリンがロイシンに置換)しており、キノロンおよびフルオロキノロン系薬剤に耐性を示した株は GyrA タンパク質で二つのアミノ酸置換(83番目のセリンがロイシンに、87番目のアスパラギン酸がアスパラギンに置換)と ParC タンパク質でひとつのアミノ酸置換(80番目のセリンがイソロイシンに置換)が認められていた。

2-4. 考 察

ツル糞便由来大腸菌において、耐性が最も多く認められた薬剤は OTC であったが、テトラサイクリン系薬剤は家畜および野生動物から分離される大腸菌において最も多く耐性を示す薬剤として知られている[3]。この要因として、前述したとおりテトラサイクリン系薬剤の販売量および使用量は抗菌性薬剤の中で一番多く使用されていることが挙げられよう。家畜・家きんへの耐性菌の蔓延は野生動物にも影響を及ぼしていることが予想されるが、その具体的な事例は分かっていない。今回検出された耐性菌に耐性伝達能力を有するプラスミドが保存されているか否かを調べる必要があると思われる。

OTC 耐性株に認められた *tetA* 遺伝子および *tetB* 遺伝子は世界中の人、家畜および野生動物で頻繁に検出される耐性遺伝子である。この両遺伝子の耐性機序は薬剤の細胞外への能動輸送で説明されている。*tetB* 遺伝子を有していた株と MINO 耐性株は一致しており、MIC 値は 32-64 mg/l であったが、*tetA* 遺伝子を有していた株の MINO における MIC 値は 1-2 mg/l であり、当薬剤に低感受性を示した。Tuckman ら[41]は *tetB* を有した MINO の MIC は *tetA* のそれよりも低い傾向を示すことを報告しており、筆者らの試験結果と類似していた。MINO およびチゲサイクリンを代表とするグリシルサイク

リン系薬剤はテトラサイクリンに変わる薬剤として開発され、その幅広い抗菌性スペクトルは信頼が高く、人の医療用域において多用される薬剤である。今回の成績では、*tetB* 耐性遺伝子はグリシルサイクリン耐性を調節している遺伝子の可能性が示唆されたが、このような成績を支持する報告はこれまでほとんどみあたらない。この耐性遺伝子の蔓延は人の医療に負の影響を及ぼす可能性が考えられ、*tetB* 遺伝子とグリシルサイクリン耐性の関係を追求する必要があると考えられた。

また、今回検出された ABPC 耐性の 4 株には *blaTEM* が検出されたが、TEM β -ラクタマーゼは食品、動物および人から分離される ABPC 耐性大腸菌に多く関与していることが報告[5]されている。また、最近の研究により、基質拡張型 β ラクタマーゼ(ESBL)を有する大腸菌が人のみならず野生動物や健康な犬猫からも分離されることが示されている[7]。しかし、本試験で分離された ABPC 耐性株はセファゾリンに感受性を示したことから、本試験で検出された TEM β -ラクタマーゼに ESBL は関与していないと考えられた。今回出水野のツルにおいて ESBL 産生菌の存在が否定されたことは幸いであった。しかしながら、OTC の次に ABPC 耐性菌が多く認められたことから、今後 ESBL 産生菌がツルから分離されないかの監視は必要である。

KM 耐性株から *aphA1* 遺伝子が検出されたことから、本耐性の主要機序はフォスフトランスフェラーゼの発現によるものであることが示唆された。これらの耐性遺伝子は染色体上 DNA だけでなくプラスミドやトランスポゾン中にも存在することが知られており[37]、これらの遺伝子による腸内細菌科間での受け渡しが行なわれている可能性がある。しかし、これまでツルから分離されるサルモネラに薬剤耐性がほとんど認められないことが報告され[15]、筆者らもさらにツル由来サルモネラを検査し、OTC、ABPC および

KM の各薬剤耐性は全く認められていないことを前章で示した。今回検出された大腸菌の耐性遺伝子はプラスミドやトランスポゾンのようなベクター上にないのかもしれない。接合性 R プラスミド試験を行いさらに検査する必要があるだろう。

キノロン系薬剤の NAL とフルオロキノロン系薬剤の OBFX および FRFX の耐性は染色体 DNA 上の *gyrA* および *parC* (DNA 巻き戻しに関連する蛋白をコードしている部分) の変異によることが示されている [34, 45]。今回分離した NAL 耐性株はすべて GyrA タンパク質でひとつのアミノ酸が置換し、キノロンおよびフルオロキノロン系薬剤に耐性を示した株は GyrA タンパク質で二つのアミノ酸置換と ParC タンパク質でひとつのアミノ酸置換が認められていた。また最近キノロンおよびフルオロキノロン系薬剤耐性も伝達性プラスミドにより耐性が伝達されることが知られており [37]、ツル由来耐性菌にもこのような耐性機序が関与しているかを検討する必要がある。

本試験で耐性を示した薬剤は我が国の家畜でよく認められる薬剤であったが、その耐性率は家畜のものに比べて低い割合であった。Costa ら [8] はポルトガルの野生動物において ABPC, NAL およびテトラサイクリンに耐性を示す大腸菌が高率に分離されることを報告しているが、本試験の耐性率はこれらの報告に比べると低い。一方、15 年前ではあるが、Tsubokura ら [40] はアメリカコハクチョウ、カモおよびウミネコの薬剤耐性菌の調査を行い、アメリカコハクチョウはカモおよびウミネコに比べ薬剤耐性率が高いことを報告している。今回、筆者らが得た結果はカモおよびウミネコの耐性率に近似していた。

今回の試験では、大腸菌の分離の際に抗菌性薬剤無添加の腸内細菌選択用の分離培地を使用した。抗菌性薬剤を添加した選択分離用培地を使用すれば、

耐性菌の検出率は上昇した可能性はある。

抗菌性薬剤は病原菌のみならず正常な腸内細菌叢にも作用するため、共生菌での薬剤耐性の蔓延は獣医学および医学領域において益々共通な問題となってきた。人および家畜等に対して、広範におよぶ抗菌性薬剤の使用がこの問題の主原因と考えられている。しかし、野生動物がどのような選択圧に曝されているかはよく解っていない[35]。一般的に考えれば、野生動物に人為的な薬剤選択圧はあってはならないものである。しかし動物種によっては高率に耐性菌を保有している場合がある。薬剤選択圧がないのであれば多くの耐性菌を保有する動物からの伝播以外は考えにくい。特にシベリアあるいは中国北部から飛来するツルが年間を通じてどのような動物と接触し、大腸菌が伝搬されていくかを解明することは困難である。ツルが越冬する季節に出水平野に生息する他の鳥類の薬剤耐性菌の分布についても調査する必要があるだろう。

2-5. 小 括

2007年11月および2008年1月に出水平野に飛来していたツルから、糞便192個を採取し、大腸菌を138株分離した。これらの大腸菌の薬剤感受性試験を、米国臨床検査基準(Clinical and Laboratory Standards Institute : CLSI)の推奨する方法に準拠し、寒天平板希釈法にて実施し、最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。用いた薬剤はABPC、CEZ、CP、OTC、MINO、KM、GM、NAL、OBFX、OXA、ERFX、CLおよびFOMの13薬剤である。

その結果、大腸菌の26株(18.8%)が耐性菌であり、最も多く耐性の認め

られた薬剤は OTC で 22 株であった。MINO 耐性が 7 株、NAL 耐性が 4 株、ABPC 耐性が 4 株、ERFX 耐性が 2 株、さらに KM 耐性が 1 株認められた。MINO 耐性株の 2 株は同じテトラサイクリン系薬剤である OTC に耐性を示していた。フルオロキノロン剤 (ERFX) 耐性株はキノロン剤 (NAL) にも耐性を示した。ABPC、OTC、MINO および KM の多剤耐性株、さらに ABPC、OTC および NAL の多剤耐性株がそれぞれ 1 株ずつ認められた。

薬剤耐性遺伝子は PCR 法を用いて、ABPC 耐性に対して *blaTEM*, *blaSHV* および *blaOXA-1* 遺伝子が、OTC 耐性に対して *tetA-E* および *tetE* 遺伝子が、KM 耐性に対しては *aphA1* 遺伝子が調べられた。その結果、ABPC 耐性の 4 株には *blaTEM* が、また OTC 耐性株には *tetA* 遺伝子および *tetB* 遺伝子がそれぞれ 68% および 32% の割合で保有されていた

抗菌性薬剤は病原菌のみならず正常な腸内細菌叢にも作用するため、広範におよぶ抗菌性薬剤の使用による共生菌での薬剤耐性の蔓延は、獣医学および医学領域において益々共通の問題となってきている。ツルの保有する耐性菌の調査を引き続き行うとともに、ツルが越冬する季節に出水平野に生息する他の鳥類の薬剤耐性菌の分布についても調査する必要があるだろう。

総 括

鹿児島県出水野には、10月中旬から3月中旬までシベリアあるいは中国北部より、ツルが越冬のために飛来する。飛来するツルのほとんどは、絶滅危惧種に指定されているナベヅルとマナヅル種である。両ツルがどのような病原体を保有しているかを捉えていくことはその動物種の特異性を知り、種の保存を考えるという観点から重要である。一方、鹿児島県はわが国屈指の一大畜産地域であり、出水野周辺においても多くの家畜・家きんが飼養・生産されている。このような環境下で、ツルの保有する病原体が、周辺の家畜や人に病原体を伝播する可能性が危惧される。しかしながら、ツルの病原微生物の感染・保有状況についてはほとんど知られていない。

そこで、病原体としてサルモネラおよび大腸菌を取り上げ、サルモネラについては分離状況、分離株の血清型別、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）型別および薬剤感受性を、また大腸菌については薬剤感受性の調査を行い、家畜・家きんあるいは他の野生動物などへの影響について考察を行った。

序文においては、研究の背景として、出水野に飛来するツルの飛来状況、給餌、農作物などへの関与、傷病および死亡状況、保護活動および今後の課題について、いくつかの文献資料をもとに概説した。

第1章においては、サルモネラの分離、分離菌の血清型別、薬剤感受性およびPFGEによるDNA遺伝子型別を試みた。サルモネラの分離については、2000年11月から2008年2月までに飛来したツルの糞便2,593例を調査し

たところ、423 検体 (16.3%) からサルモネラが、毎年 6.4%~43.5% (平均 19.1%) の割合で分離された。分離菌の血清型は ST が 396 株(93.6%)、*S. Hvittingfoss/II* が 9 株、*S. Abaetetuba* が 4 株、*S. Enteritidis* が 3 株、*S. Konstanz* が 2 株、*S. Pakistan* が 1 株および型別不能が 8 株であった。ST は毎年分離されたが、その他の血清型は一過性に分離された。このうち、156 株について、アンピシリン (ABPC)、オキシテトラサイクリン (OTC)、コリスチン (CL)、ゲンタマイシン (GM)、カナマイシン (KM)、ホスホマイシン (FOM)、ナリジクス酸 (NAL)、オキシリン酸 (OXA)、ノルフロキサシン (NRFX)、ジヒドロストレプトマイシン (DSM)、クロラムフェニコール (CP)、およびセファゾリン (CEZ) の 12 薬剤に対する薬剤感受性試験を行なったところ、ABPC に対して 1 株 (*S. Enteritidis*) および GM に対して 1 株 (ST) のみが耐性菌と考えられた。次に、最も多く分離された ST の 85 株について、PFGE で DNA 切断パターンを実施したところ、84 株がほぼ同じ泳動パターンを示し、残り 1 株は異なる泳動パターンを示した。これらのことからツル群内には毎年同一性状を持つ ST が感染を繰り返し、時折異なる血清型あるいは遺伝子型が侵入し感染していることが明らかとなった。

第 2 章においては、薬剤耐性菌の分布状況を調査した。調査は、2007 年 11 月および 2008 年 1 月に採取されたツルの糞便 192 個を用いた。薬剤感受性試験は寒天平板希釈法を米国臨床検査基準 (CLSI) の推奨する方法に準拠し、最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。調べられた薬剤は ABPC、CEZ、CP、OTC、KM、GM、NAL、CL、FOM、ミノサイクリン (MINO)、オキシリン酸 (OXA)、オルビフロキサシン (OBFX)、およびエンフロキサシン (ERFX)、の 13 薬剤である。なお、いくつかの薬剤耐性遺伝子の保有状

況も PCR 法を用いて調べた。

検査した 192 個の糞便から計 138 株 (71.9%) の大腸菌が分離され、そのうちの 26 株 (18.8%) が耐性菌であり、最も多く耐性の認められた薬剤は OTC で 22 株であった。MINO 耐性が 7 株、NAL 耐性が 4 株、ABPC 耐性が 4 株、ERFX 耐性が 2 株、さらに KM 耐性が 1 株認められた。MINO 耐性株の 2 株は同じテトラサイクリン系薬剤である OTC に耐性を示していた。フルオロキノロン剤 (ERFX) 耐性株はキノロン剤 (NAL) にも耐性を示した。ABPC、OTC、MINO および KM の多剤耐性株、さらに ABPC、OTC および NAL の多剤耐性株がそれぞれ 1 株ずつ認められた。ABPC 耐性の 4 株には *blaTEM* が、また OTC 耐性株には *tetA* 遺伝子および *tetB* 遺伝子がそれぞれ 68% および 32% の割合で保有されていた。

本研究により、出水平野に飛来するツル群には、長期にわたりサルモネラ (ST が大半) 汚染があること、薬剤耐性サルモネラは定着していないこと、しかし多剤耐性を含む薬剤耐性大腸菌はツルに感染していることなどが明らかとなった。今後は、ツルの保有する病原微生物に関する研究に加えて、ツルが越冬する季節に出水平野に生息する他の鳥類の病原微生物あるいは薬剤耐性菌の分布についても調査する必要があるだろう。

謝 辞

本研究には多くの方々のご指導およびご協力をいただいた。本研究の計画立案、実施、論文作成にあたり、主指導として鹿児島大学農学部獣医学科病態・予防獣医学講座微生物学分野、高瀬公三教授に、また副指導として鳥取大学農学部獣医学科病態・予防獣医学講座獣医微生物学分野、村瀬敏之教授および鹿児島大学同学部獣医学科病態・予防獣医学講座獣医微生物学分野、小尾岳士准教授に、さらに麻布大学獣医学部獣医学科第二微生物学研究室、田原口智士准教授（当時：鹿児島大学農学部獣医学科准教授）の先生方にご指導いただいた。ここに謹んで感謝の意を表します。

材料採取には、鹿児島県ツル保護会の渋谷俊彦会長（出水市市長）他の皆様、出水市ツル博物館クレインパークいずみの楠元勇館長、奈良和憲前館長および他職員の皆様、(財)鹿児島県環境技術協会の塩谷克典氏および他関係者の皆様にお世話になりました。

材料採取および菌の分離・同定実験には、鹿児島大学農学部獣医学科獣医微生物学研究室の学生（当時）穂満康弘、奥野（村山）真紀、小島温子、佐藤愛および二ノ宮奈緒子氏およびその他の多くの学生の皆様のご協力を得ました。

分離菌の血清型別には、伊藤忠飼料（株）中央研究所の森腰俊亨氏に、また菌の PFGE 解析には鹿児島大学農学部獣医学科病態・予防獣医学講座公衆衛生学分野、中馬猛久准教授にご協力いただいた。

本研究を論文としてまとめることが出来たのは、このような多くの方々のご指導、ご協力のお陰であり、心からお礼申し上げます。

引用文献

1. Adesiyun, A.A., Stewart-Johnson, A., and Thompson, N.N.: Isolation of enteric pathogens from bats in Trinidad. *J. Wildlife Dis.*, 45, 952-961 (2009)
2. Alley, M.R., Connolly, J.H., Fenwick, S.G., Mackereth, G.F., Leyland, M.J., Rogers, L.E., Haycock, M., Nicol, C. and Reed, C.E.: An epidemic of salmonellosis caused by *Salmonella* Typhimurium DT160 in birds and humans in New Zealand. *N. Z. Vet. J.*, 50(5), 170-176 (2002)
3. Asai, T., Harada, K., Kojima, A., Ishihara, K., Takahashi T. and Tamura, Y.: Correlation between the usage volume of veterinary therapeutic antimicrobials and resistance in *Escherichia coli* isolated from the feces of food-producing animals in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 58, 369-372 (2005)
4. Bartoloni, A., Pallecchi, L., Rodríguez, H., Fernandez, C., Mantella, A., Bartalesi, F., Strohmeier, M., Kristiansson, C., Gotuzzo, E., Paradisi, F. and Rossolini, G. M.: Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 33, 125-129 (2008)
5. Briñas, L., Zarazaga, M., Sáenz, Y., Ruiz-Larrea, F. and Torres, C. : Beta-Lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 3156-3163 (2002)
6. Clinical and Laboratory Standards Institute.: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically;

- approved standards M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. (2006)
7. Costa, D., Poeta, P., Brinas, L., Sáenz, Y., Rodrigues, J. and Torres, C. :
Detection of CTX-M-1, TEM-52 and β -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.*, 54, 960-961 (2004)
 8. Costa, D., Poeta, P., Sáenz, Y., Vinué, L., Coelho, A.C., Matos, M., Rojo-Bezares, B., Rodrigues, J. and Torres, C.: Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from wild animals. *Microb. Drug Resist.*, 14, 71-77 (2008)
 9. Gilliver, M.A., Bennett, M., Begon, M., Hazel, S.M. and Hart, C.A.:
Antibiotic resistance found in wild rodents. *Nature*, 401, 233-234 (1999)
 10. Dahshan, H., Shahada, F., Chuma, T., Moriki, H. and Okamoto, K.:
Genetic analysis of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovars Stanley and Typhimurium from cattle. *Vet. Microbiol.*, 145, 76-83 (2010)
 11. Daoust, P.Y., Busby, D.G., Ferns, L., Goltz, J., McBurney, S., Poppe, C. and Whitney, H.: Salmonellosis in songbirds in the Canadian Atlantic provinces during winter-summer 1997-98. *Can. Vet. J.*, 41(1), 54-59 (2000)
 12. Esaka, H., Morioka, A., Ishihara, K., Kojima, A., Shiroki, S., Tamura, Y. and Takahashi, T.: Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001-2002): report from the Japanese

- veterinary antimicrobial resistance monitoring program. J. Antimicrob. Chemother., 53(2), 266-270 (2004)
13. Holt, P.S.: Effect of induced molting on the susceptibility of white leghorn hens to a *Salmonella* enteritidis infection. Avian Dis., 37, 412-417 (1993)
 14. Holt, P.S. and Porter, R.E. Jr.: Effect of induced molting on the course of infection and transmission of *Salmonella* enteritidis in white Leghorn hens of different ages. Poultry Sci., 71, 1842-1848 (1992)
 15. 穂満康弘, 室賀紀彦, 田原口智士, 中馬猛久, 高瀬公三, 塩谷克典, 毛利資郎: 出水平野に飛来するツル糞便からの *Salmonella* Typhimurium の分離および分離株の性状. 日獣会誌, 58, 411-414 (2005)
 16. 出水市ツル博物館クレインパークいずみ
(http://www.city.izumi.kagoshima.jp/izumi_crane/default.asp)
 17. 鹿児島県教育委員会: 平成 6, 7, 8 年度長期的ツル保護対策調査研究事業報告書、鹿児島県教育委員会 (1995, 1996, 1997)
 18. 鹿児島県教育委員会文化財課: 平成 12, 13, 14 年度長期的ツル保護環境調査報告書、鹿児島県教育委員会 (2001, 2002, 2003)
 19. 鹿児島県教育委員会文化財課: 平成 15, 16, 17 年度長期的ツル保護推進調査研究事業報告書、鹿児島県教育委員会 (2004, 2005, 2006)
 20. 鹿児島県教育委員会文化財課: 平成 12~20 年度長期的ツル保護対策研究調査報告書、鹿児島県教育委員会 (2007, 2008, 2009)
 21. 鹿児島県教育委員会: 平成 21 年度長期的ツル保護対策調査事業業務委託報告書、鹿児島県教育委員会 (2010)
 22. 鹿児島県自然保護課・(財)鹿児島県環境技術協会: 鹿児島県レッドデー

タブック (2010)

23. Kanai, H., Hashimoto, H., and Mitsuhashi, S.: Drug-resistance and conjugative R plasmid in *Escherichia coli* strains isolated from wild birds (Japanese tree sparrows, green pheasants and bamboo partridges). Jpn. Poultry Sci., 18, 234-239 (1981)
24. Kinjo, T., Minamoto, B., Sgiyama, M. and Sugiyama, Y.: Comparison of antimicrobial resistant *Escherichia coli* in wild and captive Japanese serows. J. Vet. Med. Sci., 54, 821-827 (1992)
25. Kijima-Tanaka, M., Ishihara, K., Morioka, A., Kojima, A. Ohzono, T., Ogikubo, K. Takahashi, T., and Tamura, Y.: A national surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in Japan. J. Antimicrob. Chemother., 51, 447-451 (2003)
26. Kojima, A., Asai, T., Ishihara, K., Morioka, A., Akimoto, K., Sugimoto, Y., Sato, T., Tamura, Y., and 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)
27. Maeda, Y., Tohya, Y., Nakagami, Y., Yamashita, M., Sugimura, T.: J. Vet. Med. Sci., 63, 943-944 (2001)
28. Maynard, C., Bekal, S. Sanchagrín, F., Levesque, R. C., Brousseau, R. Masson, L. Larivière, S. and Harel, J.: Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal

- Escherichia coli* isolates of animal and human origin. J. Clin. Microbiol., 42, 5444- 5452 (2004)
29. McDonald, L.C., Kuehnert, M.J., Tenover, F.C., and Marvis, W.R.: Vancomycin-resistant *Enterococci* outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications. Emerg. Infect. Dis., 3, 311-317 (1997)
30. Nakamura I, Obi, T., Sakemi, Y., Nakayama, A., Miyazaki, K., Ogura, G., Tamaki, M., Oka, T., Tatsuzo, O., Miyamoto, A. and Kawamoto, Y.: The prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in two species of invasive alien mammals in Japan. J. Vet. Med. Sci., 73, 1067-1070 (2011)
31. Nakamura, M., Yoshimura, H. and Koeda, T.: Drug resistance and R plasmid of *Escherichia coli* strains isolated from six species of wild birds. J. Vet. Med. Sci., 44, 465-471 (1981)
32. 日本化学療法学会 MIC 測定委員会 : Chemotherapy, 29, 76-79 (1981)
33. Pennycott, T.W., Park, A. and Mather, H.A.: Isolation of different serovars of *Salmonella enterica* from wild birds in Great Britain. Vet. Tec., 158(24), 817-820 (2006)
34. Oram, M. and Fisher, L.M.: 4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. Antimicrob. Agents Chemother., 35, 387-389 (1991)

35. Österblad, M., Norrdahl, K., Korpimäki, E. and Huovinen, P.:
Antibiotic resistance. How wild are wild mammals? *Nature*, 409, 37-38
(2001)
36. Refsum, T., VikØren, T., Handeland, K., Kapperud, G. and Holstad, G.:
Epidemiologic and pathologic aspects of *Salmonella* Typhimurium
infection in passerine birds in Norway. *J. Wildlife Dis.*, 39, 64-72
(2003)
37. Schwarz, S., Kehrenberg, C. and Walsh, T.R.: Use of antimicrobial
agents in veterinary medicine and food animal production. *Int. J.*
Antimicrob. Agents, 17, 431-437 (2001)
38. 千羽晋示： かがしま文庫・20 出水のツル, 春苑堂出版, 鹿児島 (1994)
39. Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray,
B.E., Persing, D.H., 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)
40. Tsubokura, M., Matsumoto, A., Otsuki, K., Animas, S.B. and Sanekata,
T. 1995. Drug resistance and conjugative R plasmids in *Escherichia*
coli strains isolated from migratory waterfowl. *J. Wildlife Dis.*, 31,
352-357 (1995)
41. Tuckman, M., Petersen, P.J., Howe, A.Y., Orlowski, M., Mullen, S.,
Chan, K., Bradford, P.A. and Jones, C.H.: Occurrence of tetracycline
resistance genes among *Escherichia coli* isolates from the phase 3

- clinical trials for tigecycline. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, 3205-3211 (2007)
42. Une, Y., Sanbe, A., Suzuki, S., Niwa, T., Kawakami, K., Kurosawa, R., Izumi, H., Watanabe, H. and Kato, Y.: *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection causing mortality in Eurasian tree sparrows (*Passer montanus*). *Jpn. J. Infect. Dis.*, 61, 166-169 (2008)
43. 安田宣紘, 井上美佳, 三好宣彰: 出水平野における越冬ツルの傷病調査. 鹿児島県獣医師会会報, 36, 18-21 (2005)
44. 安田宣紘, 清水 孜, 河野猪三郎: ナベヅルから得られた胃虫 (*Tetrameres grusi* Shumakovich, 1946) について, 鹿大農学術報告, 36, 171-176 (1986)
45. VilaI, J., Ruiz, J., Goñi, P. and De Anta, M.T.: Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40, 491-493 (1996)

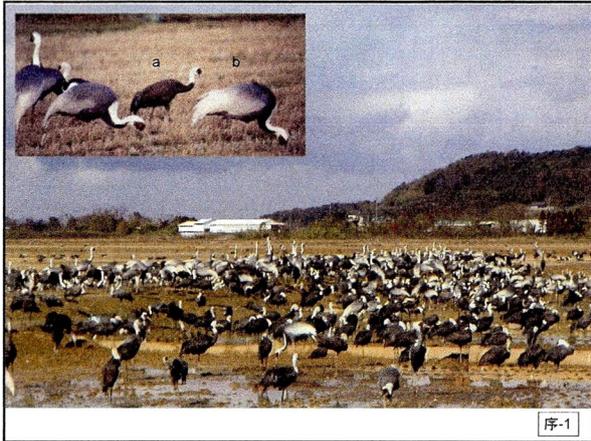


写真 序-1. 出水平野に飛来したツルの群れ (a: ナベヅル、b: マナヅル)



写真 序-2. 田圃の通路に撒かれたツルの餌 (小麦)

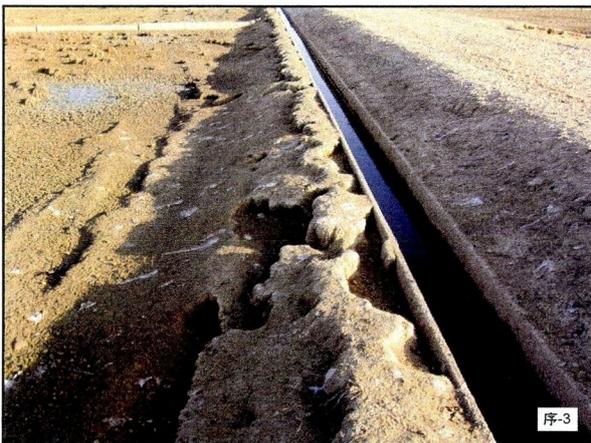


写真 序-3. 田圃のあぜ道部分 (ツルが嘴などで掘った穴、白いものはカラスなど野鳥の糞)



写真 序-4. 傷病ツルの保護舎とケージ内のツル



写真 序-5. 解剖検査用に搬入された死亡ツル



写真 序-6. 採糞作業およびツルの糞

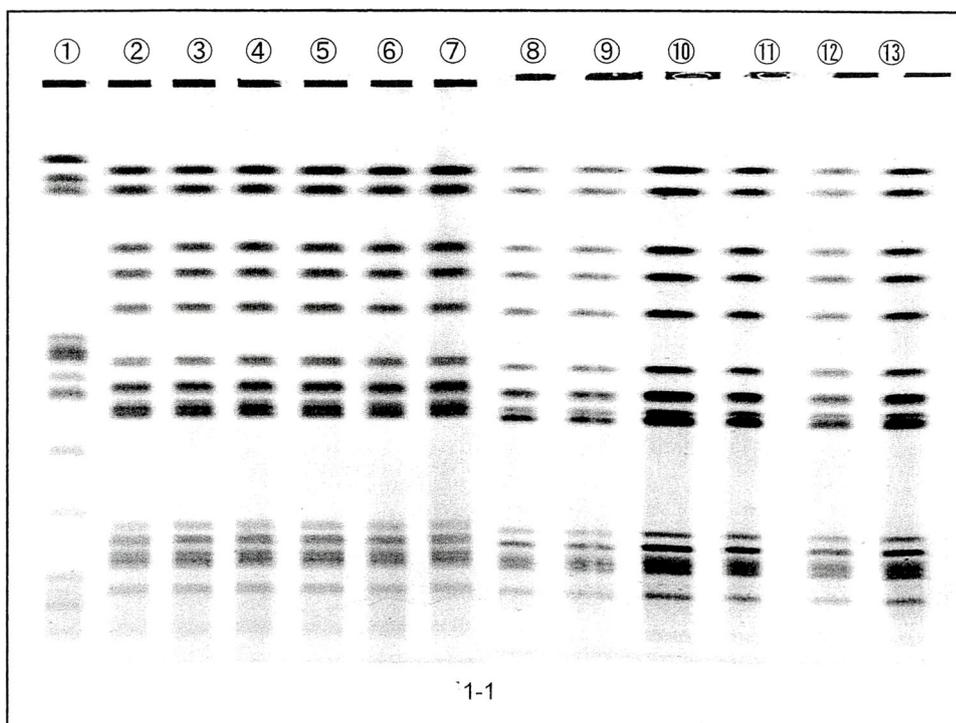


図 1-1. サルモネラ (*S. Typhimurium*) 分離株の PFGE 泳動像
 ①～⑦: 2004 年分離株, ⑧～⑩: 2002 年分離株,
 ⑪～⑬: 1997 年分離株

表 1-1. ツル糞便からの *Salmonella enterica* の分離成績

採材 年度	採材月						計 (%)
	10月	11月	12月	1月	2月	3月	
2000		6/40 ^{a)}	19/51	13/40	5/40		43/171 (25.1)
2001		1/47	0/25	2/27	18/72		21/171 (12.3)
2002		2/20	1/20	12/21	22/24		37/85 (43.5)
2003		0/84	0/62	0/107	60/141	35/72	95/466 (20.4)
2004	9/34	40/120	14/110	5/100	36/140		104/504 (20.6)
2005		1/99	0/106	16/112	52/94		69/411 (16.8)
2006			10/96	0/114	14/106		24/316 (7.6)
2007		4/128	3/120	1/113	22/108		30/469 (6.4)
Total	9/34	54/538	47/590	49/634	229/725	35/72	423/2,593
(%)	(26.5)	(10.0)	(8.0)	(7.7)	(31.6)	(48.6)	(16.3)

a) *S. enterica*陽性検体数 / 検体数 (糞便)

* 2000・2001年度成績は既報告[15]にもとづく

表 1-2. *Salmonella enterica* 分離株の血清型別

血清型	分離株数	分離年度
<i>S.</i> Typhimurium	396	2000-2007
<i>S.</i> Hvittingfoss/II	9	2006
<i>S.</i> Abaetetuba	4	2007
<i>S.</i> Enteritidis	3	2003, 2004
<i>S.</i> Konstanz	2	2006
<i>S.</i> Pakistan	1	2005
Un-typed	8	2001, 2006, 2007

* 2000・2001 年度成績は既報告[15]にもとづく

表 1-3. 2000～2008 年に分離されたサルモネラ 156 株の抗菌性薬剤に対する MIC 値の分布

供試 薬剤 ^{a)}	MIC (μ g/ml)												
	<0.1	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
ABPC				1	16	57	52	29					1
CEZ					19	71	64	2					
OTC					10	60	53	33					
CL				5	42	59	14	36					
CP					11	11	89	27	13	5			
OXA		1	13	46	75	17	4						
NAL						4	30	80	38	4			
NRFX	16	39	68	32	1								
GM				18	86	40	10	1			1		
KM					1	30	71	44	10				
DSM										6	60	66	24
FOM							1	6	58	86	5		

a) ABPC: アンピシリン, CEZ: セファゾリン, OTC: オキシテトラサイクリン, CL: コリスチン, CP: クロラムフェニコール, OXA: オキシリン酸, NAL: ナリジクス酸, NRFX: ノルフロキサシン, GM: ゲンタマイシン, KM: カナマイシン, DSM: ジヒドロストレプトマイシン, FOM: ホスホマイシン

* 2000・2001 年度成績は既報告[15]にもとづく

表 2-1. ツル糞便由来大腸菌138株の13薬剤に対する MIC値および耐性菌の分布

薬剤*	MIC値 (μg/ml) および大腸菌の株数													耐性菌株数 (%)	
	≤0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128		ブレイクポ イント**
ABPC	54	56	23				1					2	2	32	4 (2.9)
CEZ				53	85									32	
MINO				50	81				3	4				16	7 (5.1)
OTC			35	80	1					15	7			16	22 (15.9)
KM				41	90	5			1				1	64	1 (0.7)
GM				48	85	4								16	
FOM						4	41	90	5	5	75	55	3	256	
CP						4	41	90	2	1				32	
CL				115	22	1								16	
OXA		15	115	2	1	1	2					2			
NAL		30	91	9	2	2	62	46	25	1	3			32	4 (2.9)
OBFX						3				1					
ERFX	132	2	1	1	1	1			1				2	2	2 (1.4)

* ABPC: アンピシリン, CEZ: セフアゾリン, MINO: ミノサイクリン, OTC: オキシテトラサイクリン, KM: カナマイシン, GM: ゲンタマイシン, FOM: ホスファマイシン, CP: クロラムフェニコール, OXA: オキサリジン酸, NAL: ナリジクサ酸, OBFX: オルビフロキサシン, ERFX: エンフロフロキサシン

** ブレークポイントのMIC値は CLSI [6] 又はKojima *et al.* [26]の値を基準にした。OXA および OBFX. については、適切なブレークポイントのMIC値が報告されていないため判定対象外とした。

表 2-2. ツル由来大腸菌の耐性パターンによる分離株数

耐性パターン	分離株数 (%)
ABPC*	2 (1.4)
OTC	13 (9.4)
OTC-MINO	6 (4.3)
OTC-NAL	1 (0.7)
NAL-ERFX	2 (1.4)
ABPC-OTC-NAL	1 (0.7)
ABPC-OTC-MINO-KM	1 (0.7)
合計	26 (18.8)

* 薬剤の省略形は表2-1(脚注)を参照

表 2-3. ツル由来大腸菌のに検出された耐性遺伝子とその保有分離株数

耐性薬剤	検査株数	検出率	
		耐性遺伝子	分離株数 (%)
ABPC*	4	<i>blaTEM</i>	4 (100)
OTC	22	<i>tetA</i>	15 (68.2)
		<i>tetB</i>	7 (31.8)
KM	1	<i>aphA1</i>	1 (100)

* 薬剤の省略形は表2-1（脚注）を参照

(Summary)

Salmonella enterica and *Escherichia coli* Isolated from Feces of Wild Cranes Wintering on Izumi Plain, Kagoshima Prefecture

By

Noriyuki KITADAI

From the middle of October every year, more than ten thousand cranes migrate from Siberia and north China to the Izumi plain, Kagoshima prefecture in Japan for wintering. The cranes on the plain are fed rice and wheat to prevent them from intruding into nearby farms. Thus, many cranes crowd there for food. In addition, the other kind of wild birds also gather there for food given for cranes. The cranes mainly consist of the hooded crane (*Grus monacha*) and white-naped crane (*Grus vipio*) which are designated as vulnerable species by the Ministry of the Environment, Japan.

We have continued to research infectious pathogens of the migrating cranes in Izumi plain, since 1996, and some of the results has already been reported. In this study, we tried to isolate *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*, and examined some their characteristics and susceptibility to antimicrobials.

From November 2002 to February 2008, 2,593 crane feces were collected at the Izumi Plain. *Salmonella enterica* was isolated from 423

feces (16.3%), of which 396 (93.6%) were *Salmonella* Typhimurium (ST), 9 were *S. Hvitittingfoss*/II, 4 were *S. Abaetetuba*, 3 were *S. Enteritidis*, 2 were *S. Konstanz*, 1 was *S. Pakistan* and 8 were untyped isolates, respectively. Against 12 antimicrobial agents, no resistant strains were found in 156 isolates examined, but each one was found to be resistant to ampicillin and gentamicin. By pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), all but one of the 84 ST isolates tested showed indistinguishable banding patterns; one had a different pattern. The results suggest that ST strains from the same origin would spread in crane flocks during their stay at Izumi plain every winter.

Next, susceptibility to 13 antimicrobial agents was examined for 138 *Escherichia coli* isolates obtained from 192 fecal samples of wild cranes. The numbers of isolates that were resistant to the antimicrobials used in this study were as follows: oxytetracycline (OTC) , 22 isolates; minocycline, 7 isolates; ampicillin (ABPC) , 4 isolates; nalidixic acid, 4 isolates; enrofloxacin, 2 isolates; kanamycin, one isolate. Multidrug resistant isolates exhibiting 2-4 drug resistances were obtained. All of the OTC-resistant isolates carried either the *tetA* or *tetB* gene. The *blaTEM* gene was found in all of the ABPC-resistant isolates.

Further microbiological examination for migrating cranes in Izumi plain shall be continued.