

野生動物由来大腸菌の薬剤耐性

小川恵子

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)

1. はじめに

近年、一般の人々のアウトドア活動の増加に伴い、野生動物の活動域と人・家畜の利用域が重複する機会が増加している。野生動物による農林業被害報告も多数見られる。このような人と野生動物の活動域の重複が、人・家畜・野生動物間の関係性にもたらす変化として、病原体の伝播動態の変化が予想される。これまで、野生動物における薬剤耐性菌の拡散は、人間活動との直接的・間接的接触によると考えられてきた [16]。

これまでに、様々な環境にある野生動物の薬剤耐性菌保有状況に関する研究が行われている。多くの研究は人 [2]、家畜 [12]、あるいは人や家畜の排泄物 [1] と隣接して生息する野生動物からの耐性菌の分離を報告している。しかし、我々が青森県下北半島の野生ニホンザル（以下サル）に対して行った先行研究では、農業被害や住居付近を通過するなどの人との間接的接触があるにもかかわらず、薬剤耐性 *Escherichia coli* 保有率は低いという結果が得られている [15]。人間活動の影響が最も少ないと考えられる極地に生息する鳥類から、多剤耐性 *E. coli* が分離されたという報告もある [18]。これらの報告から、野生動物における薬剤耐性菌の拡散メカニズムは、従来考えられていたように人間活動の影響だけでなく、様々な要因に影響される複雑なものだと思われる。

そこで、本研究では、野生動物における薬剤耐性菌の拡散に重要な要因の推定を目的とし、その基礎データとして、日本各地の野生動物の薬剤耐性 *E. coli* 保有状況とその伝播動態を調べた。

2. 材料及び方法

(1) 調査地概要及び採材

2008年から2009年にかけて、北海道知床半島南部、青森県下北半島西部、岐阜県、鹿児島県屋久島西部の4地域で野生動物の糞便350検体を採取した(表1)。これらの調査地は国有林、公有林・民有林、一般道、林道・登山道、集落、市街地を含み、国有林以外の地域では一般人の利用がある。路上や林内の落下糞便を採取し、糞便の外見から動物種を推定した。落下糞便の他、岐阜大学応用生物科学部野生動物医学研究室、青森県下北郡佐井村役場から、狩猟もしくは有害鳥獣駆除で捕獲された個体の直腸便の提供を受けた。また、岐阜大学人獣共通感染症学研究室で凍結保存されていたイノシシ捕獲個体の糞便懸濁液の上清の提供を受けた。凍結保存されていた糞便懸濁液上清を除く糞便検体は、細菌分離に供するまで常温もしくは4°Cで保存した。

ア. *E. coli* の分離・同定

糞便を滅菌リン酸緩衝液(PBS)で懸濁した10%及び1%希釈液をDHL寒天培地に塗布し37°Cで16-24時間培養した。一部の糞便検体は

共同研究者：大屋賢司，富士秀人

連絡責任者：富士秀人（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）

本稿は平成23年11月19日に開催された第38回動物用抗菌剤研究会シンポジウムにおける講演の概要である。

表 1 各調査地で採取した糞便検体数及びおよび *E. coli* 菌株数

調査地	動物種	検体数	大腸菌陽性 (分離率)	菌株数
知 床	シカ	45	29 (64.4%)	139
下 北	哺乳類 (サル, カモシカ, タヌキなど 8 種 ^a)	142	69 (48.6%)	253
	ヤマドリ	3	1 (33.3%)	4
	計	145	70 (48.3%)	257
岐 阜	哺乳類 (サル, シカ, イノシシなど 14 種 ^a)	108	73 (67.6%)	373
	鳥類 (サギなど 4 種 ^a)	7	5 (71.4%)	20
	計	115	78 (67.8%)	393
屋久島	サル	30	29 (96.7%)	109
	シカ	13	12 (92.3%)	48
	タヌキ	2	1 (50.0%)	3
	計	45	42 (93.3%)	160
合 計		350	219 (62.6%)	949

^a 糞便の外見から動物種を推定できなかった落下糞便は、不明哺乳類または不明鳥類とした。不明哺乳類・鳥類の糞便のうち、外見が類似しているものは 1 種として扱った。

調査地で直接 DHL 寒天培地に塗布し、常温で最大 2 週間培養した。細菌の増殖が見られない場合は、Luria-Bertani (LB) ブロスでの増菌培養及び DHL 寒天培地と普通寒天培地の混合培地での培養を試みた。1 検体あたり最大 20 コロニーの乳糖分解菌または優勢な細菌を釣菌し、DHL 寒天培地に 2~3 回継代後、単コロニーを普通寒天培地で培養した。オキシダーゼ試験、TSI 培地及び LIM 培地での培養による生化学性状試験後、*E. coli* と生化学性状が一致する分離株に対して、ID テスト EB-9 (日水、東京) 及び EB-20 (日水) を用いて菌種を同定した。ID テストにより *E. coli* と同定された 949 株 (表 1) を凍結保存し、以下の実験に供した。

イ. 薬剤感受性試験

全分離株に対し、ディスク拡散法もしくは抗菌剤含有ミュラーヒントン寒天培地での培養によるスクリーニングを行った。ディスク拡散法は SN ディスク (日水) を使用し、*E. coli* ATCC 25922 及び *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 により精度管理を行った。抗菌剤含有ミュラーヒントン寒天培地での培養によるスクリーニングは次のように行った。大腸菌株を抗菌剤含有培地及び非含有培地に接種し、37

°C で 16-24 時間培養した。抗菌剤含有培地上で増殖した菌株を耐性とした。

上記のいずれかの方法により耐性と判定された菌株と、一部の感受性株に対して、微量液体希釈法 (動物用抗菌剤研究会 2003 年改定標準法) を実施し [8]、最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。薬剤耐性は臨床検査標準協会 (CLSI) の基準に従い判定した [6]。それぞれの薬剤感受性試験で検査した抗菌剤を表 2 に示した。

ウ. 薬剤耐性遺伝子の検索

OTC 耐性株及び同一地域で採取された感受性株の一部に対して、5 種類のテトラサイクリン耐性 (*tet*) 遺伝子 (*tet* (A), *tet* (B), *tet* (C), *tet* (D), *tet* (M)) の PCR を実施した [14]。菌体を 1xTris-EDTA (TE) バッファーに懸濁し、加熱した上清を DNA 鋳型として用いた (以下同様)。また、ABPC 耐性株及び同一地域で採取された感受性株の一部に対して、4 種類のβ-ラクタマーゼ (*bla*) 遺伝子 (*bla*_{PSE}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}) の PCR を実施した [3, 7]。

キノロン系抗菌剤耐性株及び耐性株と同一地域で採取された感受性株の一部に対して、*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* のキノロン耐性決定

表2 薬剤感受性試験で検査した抗菌剤

試験方法	抗菌剤 ^{a)} (含有量・濃度)
ディスク拡散法	ABPC (10 μ g), CEZ (30 μ g), CTX (30 μ g), CAZ (30 μ g), SM (10 μ g), KM (30 μ g), GM (10 μ g), OTC (30 μ g), NA (30 μ g), NFLX (10 μ g), OFLX (5 μ g), CP (30 μ g), ST (23.75/1.25 μ g)
抗菌剤含有培地によるスクリーニング	ABPC (32 μ g/mL), CEZ (32 μ g/mL), SM (32 μ g/mL), OTC (16 μ g/mL), NA (32 μ g/mL), ERFX (4 μ g/mL), CP (32 μ g/mL), TMP (16 μ g/mL)
微量液体希釈法	ABPC, CEZ, DSM, OTC, NA, ERFX, CP, TMP (0.0625-128 μ g/ml)

a) ABPC: アンピシリン, CEZ: セファゾリン, CTX: セフトキシム, CAZ: セフトジジム, SM: ストレプトマイシン, KM: カナマイシン, GM: ゲンタマイシン, OTC: オキシテトラサイクリン, NA: ナリジクス酸, NFLX: ノルフロキサシン, OFLX: オフロキサシン, CP: クロラムフェニコール, ST: スルファメトキサゾール・トリメトプリム, ERFX: エンロフロキサシン, TMP: トリメトプリム, DSM: ジヒドロストレプトマイシン

領域 (QRDR) の塩基配列解読を実施した [9, 19]。塩基配列解読はタカラバイオ株式会社(三重)に委託した。得られた塩基配列は既報の *gyrA* (GenBank accession no. X06373), *gyrB* (X04341), *parC* (M58408 及び L22025 の修正), *parE* (M58409 及び M37833 の修正) の塩基配列と比較した。

エ. 血清型別

全菌株に対して、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研, 東京)を用いた O 群別試験を実施した。

オ. 系統グループ分類

全菌株に対して、マルチプレックス PCR による 4 系統グループ (グループ A, B1, B2, D) への分類を実施した [5]。

カ. ランダム増幅遺伝子多型 (RAPD) 解析

耐性株及び耐性株と同一地域で採取された感受性株の一部に対して RAPD 解析を実施した [11, 20]。PCR には GoTaq® Green Master Mix, 2x (Promega, Wisconsin, USA) を用い、PCR 反応液中の DNA 鋳型濃度は 4 ng/ μ l に統一した。PCR は M13 及び DAF4 の 2 種類のプライマーそれぞれについて 2 回ずつ実施し、2 回とも増幅された再現性のあるバンドを用いて無荷重平均距離法 (UPGMA 法) により系統樹を作成した。

キ. 統計解析

野生動物の薬剤耐性 *E. coli* 保有率を、フィッシャーの直接確率検定により地域間で比較した。P<0.05 を統計的に有意とした。

3. 結果

(1) 野生動物由来 *E. coli* の薬剤耐性

知床半島のニホンジカ (以下シカ) 糞便 1 検体から OTC 耐性株を 1 株分離した。また、下北半島のタヌキ糞便 1 検体から ABPC, NA, ERFX の 3 剤耐性株を 4 株分離した。狩猟個体, 有害鳥獣駆除個体からは耐性株は分離されなかった。*E. coli* 陽性検体あたりの薬剤耐性菌保有率は、4 地域合計で 0.91% (2/219) だった。各地域の薬剤耐性菌保有率はそれぞれ知床で 3.45% (1/29), 下北で 1.43% (1/70), 岐阜と屋久島で 0% だった。地域間で薬剤耐性菌保有率に有意差はなかった (フィッシャーの直接確率検定, P = 0.19, n = 219)。

耐性株及び同一検体・同種動物から分離された感受性株の性状を表 3 に示した。シカ由来 OTC 耐性株からは *tet* (B) 遺伝子が検出された。タヌキ由来 3 剤耐性株からは *bla*_{TEM} 遺伝子が検出された。また, QRDR の塩基配列には, *gyrA* に 2 カ所 (S83L, D87N), *parC* に 2 カ所 (S80I, E84V), 計 4 カ所のアミノ酸置換が認められた。*gyrB* 及び *parE* には変異は認められなかった。感受性株からは *tet* 遺伝子, *bla* 遺伝子は検出されず, QRDR の変異も認められなかった。

(2) 知床及び下北半島の野生動物由来 *E. coli* の伝播動態

知床由来株 48 株及び下北由来株 83 株に対して

表 3 野生動物由来耐性株と同一検体・同種動物由来感受性株の性状

菌株 No.	検体 No.	動物種	耐性 パターン ^{a)}	系統 グループ	<i>tet</i>	<i>bla</i>	QRDR 変異 ^{o)}	
							<i>gyrA</i>	<i>parC</i>
HOK-92	北-22	シカ	OTC	B1	<i>tet</i> (B)	NT ^{b)}	NT	NT
HOK-90				A				
HOK-91	北-22	シカ	感受性	D	—	NT	NT	NT
HOK-93				B2				
SHIM-166 ~ 169	下-77	タヌキ	ABPC, NA, ERFX	B2	NT	<i>bla</i> _{TEM}	S83L, D87N	S80I, E84V
SHIM-274				B1				
SHIM-278	下-117	タヌキ	感受性	D	NT	—	wt	wt
SHIM-282				B2				

a) OTC: オキシテトラサイクリン, ABPC: アンピシリン, NA: ナリジクス酸, ERFX: エンロフロキサシン

b) NT: 未実施

c) QRDR: キノロン耐性決定領域, S: セリン, L: ロイシン, D: アスパラギン酸, N: アスパラギン, I: イソロイシン, E: グルタミン酸, V: バリン, wt: 野生型

RAPD 解析を実施した。知床由来株では、M13 プライマーを用いた RAPD 解析（以下、M13-RAPD 解析）により、42 タイプの RAPD 型が認められた。DAF4 プライマーを用いた RAPD 解析（以下、DAF4-RAPD 解析）により、30 タイプの RAPD 型が認められた。下北由来株では、25 タイプの M13-RAPD 型、及び 23 タイプの DAF4-RAPD 型が認められた。より多くの RAPD 型に識別することができた M13-RAPD 解析に基づいて作成した下北由来株の系統樹を、図 1 に示した。

知床のシカ由来 OTC 耐性株 (HOK-92) と、同一検体から分離された感受性株 (HOK-90, 91, 93) とは系統グループが異なった (表 3)。同様に、これら 4 株の M13-RAPD 型、DAF4-RAPD 型は異なった。

下北のタヌキ由来 3 剤耐性株 (SHIM-166 ~ 169) は M13-RAPD 解析により感受性株とは識別された (図 1)。DAF4-RAPD 解析でも同様の結果が得られた。下北由来株は M13-RAPD 解析により 4 つのクラスター (クラスター I ~ IV) に分類された (図 1-A)。サル以外の野生動物由来株は主にクラスター I と II に、サル由来株は主にクラスター III と IV に分類された。異なる動物種から分離された菌株間で M13-RAPD 型、DAF4-RAPD 型、系統グループ、血清型がすべて一致する例は

認められなかった (図 1-B)。サル由来株では、異なる検体由来にもかかわらず、今回実施した遺伝子型別及び血清型別で互いに識別できない菌株が多数認められた (図 1-B)。一方、サル以外の動物由来株では、いずれかの型別方法で異なる検体由来株を識別することができた (図 1-B)。また、知床由来株と同様、同一検体由来の菌株間で遺伝子型及び血清型に多様性がある例が認められた。

4. 考 察

本研究の調査地のうち、国有林以外の地域は一般人の利用があるにもかかわらず、野生動物の薬剤耐性菌保有率は 4 地域のいずれも低かった。また、頻繁に人里に出没する有害鳥獣駆除個体から耐性菌は検出されなかった。したがって、野生動物における耐性菌拡散には、人間活動の有無よりも重要な影響要因が存在する可能性が示唆された。

OTC 耐性株が知床のシカから分離された。テトラサイクリン系抗菌剤 (TC_s) は獣医領域で最も広く使用されている抗菌剤であり [10]、TC_s 耐性は日本の食用動物で最も多く検出される耐性である [10]。本研究の調査地に大規模な畜産地帯は含まれていないものの、知床半島では野生の

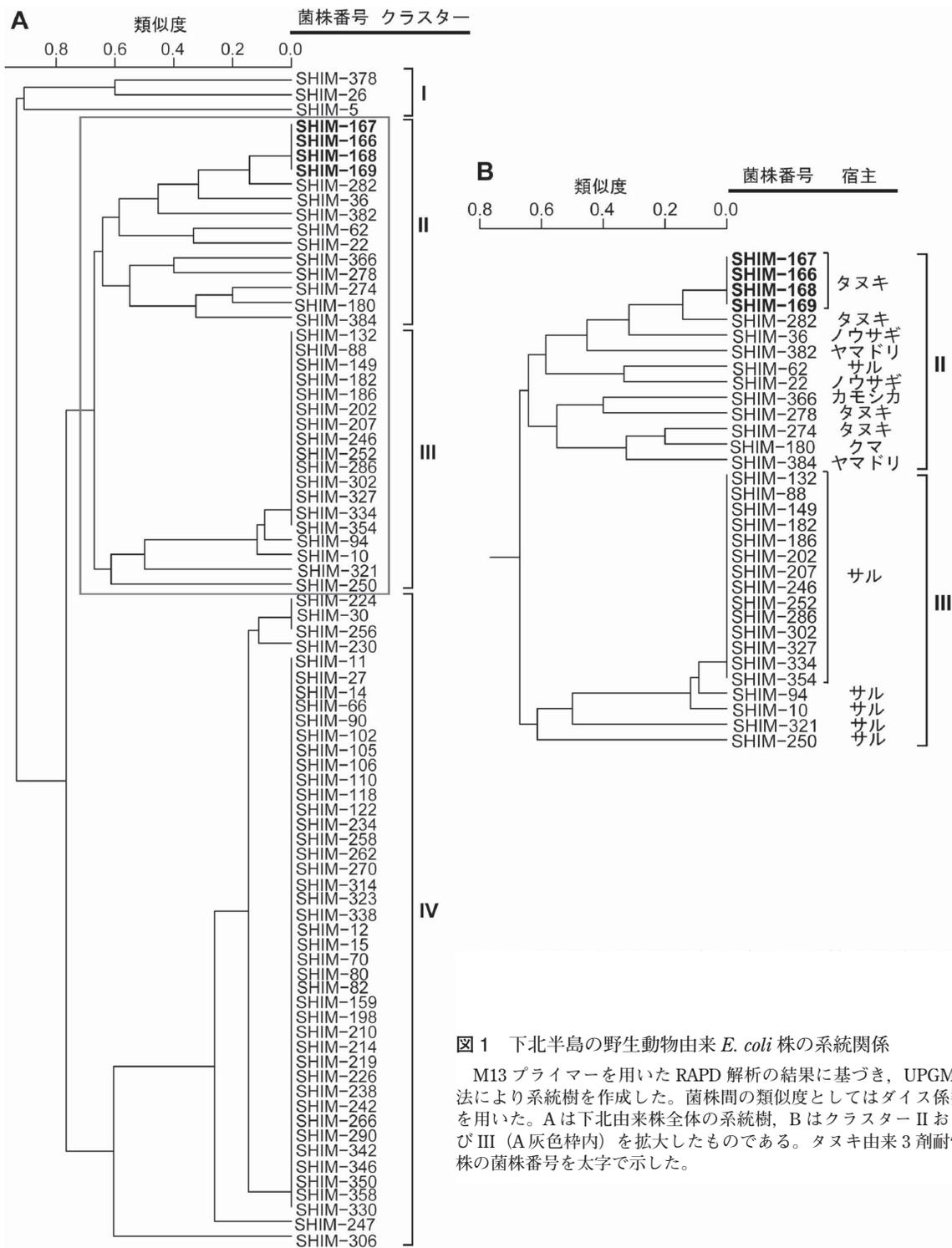


図1 下北半島の野生動物由来 *E. coli* 株の系統関係

M13プライマーを用いたRAPD解析の結果に基づき、UPGMA法により系統樹を作成した。菌株間の類似度としてはダイス係数を用いた。Aは下北由来株全体の系統樹、BはクラスターIIおよびIII(A灰色枠内)を拡大したものである。タヌキ由来3剤耐性株の菌株番号を太字で示した。

シカによる牧草の食害が発生している。したがって、ウシ由来の TC_S 耐性株もしくは環境中のウシ由来の TC_S 残留物に野生のシカが曝露されている可能性が考えられる。しかし、OTC は土壤細菌が産生する天然由来の抗菌剤であるため [4]、野生動物由来 *E. coli* において、獣医領域での使用とは無関係に OTC 耐性が存在する可能性も考えられる。野生動物由来株における OTC 耐性の起源を解明するには、今後、畜産農家付近に生息する野生動物についても同様の疫学調査を行う必要がある。

下北半島のタヌキから、ABPC、NA、ERFX の 3 剤耐性株が分離され、*bla*_{TEM} 遺伝子が検出された。*bla*_{TEM} を保有する ABPC 耐性は人間活動の影響の少ない自然地域の野生哺乳類でも報告されているため [12]、農村部に生息するタヌキから検出されたことは驚くべきことではない。一方、ERFX は合成抗菌剤であるフルオロキノロン (FQ) の一種である。本研究で分離された耐性株では、*gyrA* 及び *parC* の QRDR に高度の変異 (4 カ所のアミノ酸置換) が認められており、ERFX もしくは他の FQ による選択圧のない状況下で、偶発的な点突然変異により耐性が出現したとは考え難い。したがって、タヌキ由来株の ERFX 耐性は、医療・獣医領域における FQ 使用と関連があると考えられる。日本のタヌキの行動範囲は 10-600 ha と言われている [17]。今回耐性株が検出されたタヌキ糞便の採材地点から 5 km 以内に 3 つの集落が位置していることから、これらの集落内で FQ の投薬治療を受けた人もしくは家畜からタヌキに耐性株が伝播した可能性が考えられる。また、キノロン系抗菌剤は人では主に尿中に [21]、動物では尿中または糞便中に排泄される [13]。したがって、もう一つの可能性として、タヌキの生息範囲内の環境が、投薬治療を受けた人・家畜から排泄された FQ によって汚染されていた可能性が考えられる。

RAPD 解析により、耐性株だけでなく感受性株も、異なる動物種由来の菌株間では遺伝的近縁性が低いことが明らかになった (図 1)。この結果から、野生動物の腸内で優勢な *E. coli* には宿主特異性があり、異なる動物種間の伝播はまれであ

ることが示唆された。同種の動物由来株間の遺伝的近縁性は、他の動物種に比べサル由来株間で比較的高かった (図 1-B)。この結果から、*E. coli* の種内伝播の可能性は動物種によって異なると考えられる。サルは、同一の群れに属する個体間でグルーミングなど直接的な接触を頻繁に行う。このような動物の習性が *E. coli* の種内伝播に影響に及ぼす可能性が考えられる。したがって、耐性菌のモニタリングを行う際の対象動物の選定、及び耐性菌伝播リスクの推定には動物の習性を十分に考慮する必要があると思われる。

RAPD 解析と系統グループ分類により、同一検体由来の菌株間に遺伝的多様性があることも明らかになった (表 3)。この結果は、今回耐性株が分離されなかった検体にも耐性株が潜在している可能性を示唆している。今後は、細菌分離の際に抗菌剤による選択を行う等、腸内細菌叢の優勢株だけでなく劣勢株も含めて野生動物の保有する薬剤耐性菌について詳細に調査する必要がある。

本研究では、日本の農村部及び山間部では、人間活動が行われていても野生動物から薬剤耐性 *E. coli* はほとんど検出されず、野生動物間で耐性菌が伝播する危険性も低いことが明らかになった。また、耐性菌に限らず、野生動物における *E. coli* の伝播動態・宿主との共生関係は複雑であることが示唆された。その一方で、合成抗菌剤である ERFX に対する高度耐性が認められたことから、医療・獣医領域における抗菌剤使用が野生動物の耐性菌保有の影響要因の一つであることは明らかである。これらの結果は、野生動物における薬剤耐性菌の拡散メカニズムの複雑さを示唆しており、今後、人間活動の有無だけでなく、その種類や頻度、あるいは対象動物の習性など様々な人為的・生態的要因との関連性について検討する必要があると考えられる。

引用文献

- 1) Blanco G, Lemus JA, Grande J: Microbial pollution in wildlife : Linking agricultural manuring and bacterial antibiotic resistance in Red-billed Choughs. *Environ Res*, 109, 405-412 (2009)

- 2) Bonnedahl J, Drobni M, Gauthier-Clerc M, Hernandez J, Granholm S, Kayser Y, Melhus Å, Kahlmeter G, Waldenström J, Johansson A, Olsen B : Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France. PLoS One, 4, e 5958 (2009)
- 3) Carlson SA, Bolton LF, Briggs CE, Hurd HS, Sharma VK, Fedorka-Cray PJ, Jones BD : Detection of multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104 using multiplex and fluorogenic PCR. Mol Cell Probes, 13, 213-222 (1999)
- 4) Chopra I, Roberts M : Tetracycline antibiotics : Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev, 65, 232-260 (2001)
- 5) Clermont O, Bonacorsi S , Bingen E : Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol, 66, 4555-4558 (2000)
- 6) Clinical and Laboratory Standards Institute : Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement, M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa (2007)
- 7) Colom K, Pérez J, Alonso R, Fernández-Aranguiz A, Lariño E, Cisterna R : Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of *bla*TEM, *bla*SHV and *bla*OXA-1 genes in Enterobacteriaceae. FEMS Microbiol Lett, 223, 147-151 (2003)
- 8) 動物用抗菌剤研究会, 動物由来細菌に対する抗菌性物質の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法 (動物用抗菌剤研究会 2003 年改定標準法), 動物抗菌剤研究会報, 25, 52-63, (2004)
- 9) Everett MJ, Jin YF, Ricci V, Piddock LJV : Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals, Antimicrob Agents Chemother, 40, 2380-2386 (1996)
- 10) Harada K, Asai T : Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan. J Biomed Biotechnol, 2010, 180682 (2010)
- 11) Jonas D, Spitzmüller B, Weist K, Rüdén H, Daschner FD : Comparison of PCR-based methods for typing *Escherichia coli*. Clin Microbiol Infect, 9, 823-831 (2003)
- 12) Kozak GK, Boerlin P, Janecko N, Reid-Smith RJ, Jardine C : Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. Appl Environ Microbiol, 75, 559-566 (2009)
- 13) Martinez M, Mcdermott P, Walker R : Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. Vet J, 172, 10-28 (2006)
- 14) Ng LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M : Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. Mol Cell Probes, 15, 209-215 (2001)
- 15) Ogawa K, Yamaguchi K, Suzuki M, Tsubota T, Ohya K, Fukushi H : Genetic characteristics and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from Japanese macaques (*Macaca fuscata*) in rural Japan. J Wildl Dis, 47, 261-270 (2011)
- 16) Österblad M, Norrdahl K, Korpimäki E, Huovinen P : Antibiotic resistance. How wild are wild mammals?, Nature, 409, 37-38 (2001)
- 17) Saeki M : *Nyctereustes procynoides* (Gray, 1834), The Wild Mammals of Japan. Ohdachi SD, et al. eds, 1st ed, 216-217, SHOUKADOH Book Sellers, Japan (2009)
- 18) Sjölund M, Bonnedahl J, Hernandez J, Bengtsson S, Cederbrant G, Pinhassi J, Kahlmeter G, Olsen B : Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the Arctic. Emerg Infect Dis, 14, 70-72 (2008)
- 19) Vila J, Ruiz J, Marco F, Barcelo A, Goñi P, Giralte E, Jimenez de Anta T : Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. Antimicrob Agents Chemother, 38, 2477-2479 (1994)
- 20) Vogel L, van Oorschot E, Maas HME, Minderhoud

B, Dijkshoorn L : Epidemiologic typing of *Escherichia coli* using RAPD analysis, ribotyping and serotyping. Clin Microbiol Infect, 6, 82-87 (2000)

21) Vree TB, Wijnands WJA, Guelen PJM, Baars AM, Hekster YA : Pharmacokinetics: metabolism and renal excretion of quinolones in man. Pharm Weekbl Sci, 8, 29-34 (1986)

Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from wildlife

Keiko OGAWA

The United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University,
1-1 Yanagido, Gifu, Gifu 501-1193, Japan

We compared the antimicrobial resistance, serotypes and genotypes of *Escherichia coli* from wildlife among four areas (Shiretoko, Shimokita, Gifu and Yakushima) to estimate factors affecting the spread of resistant bacteria in wildlife. We collected 350 fecal samples in 2008 and 2009, and obtained 949 isolates of *E. coli*. All isolates were screened for antimicrobial resistance. Resistant *E. coli* isolates and a subset of susceptible ones were examined by PCR for tetracycline-resistant (*tet*) genes and beta-lactamase (*bla*) genes and the sequencing of quinolone resistance-determining region (QRDR). They were also characterized by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, serotyping, and phylogenetic grouping to investigate their transmission. The prevalence of resistant *E. coli* isolates in Shiretoko, Shimokita, Gifu and Yakushima were 3.45% (1/29), 1.43% (1/70), 0% (0/78) and 0% (0/42), respectively. One resistant *E. coli* isolate from a deer in Shiretoko was resistant to oxytetracycline, carrying *tet* (B) gene. Four resistant *E. coli* isolates from a raccoon dog in Shimokita were resistant to ampicillin, nalidixic acid and enrofloxacin (ERFX), carrying *bla*_{TEM} gene. Two amino acid substitutions were observed in the QRDR of *gyrA* (S83L, D87N) and *parC* (S80I, E84V), respectively. Resistant *E. coli* isolates were distinguished from susceptible ones by RAPD analysis. No isolates have identical genotypes with those from different host species. These results suggest that resistant *E. coli* rarely transmits among different host species. However, the detection of ERFX-resistance implies that the use of antimicrobials in medical or veterinary fields is associated with the resistance in *E. coli* from wildlife.

討 論 (座長：澤田拓士 理事長，金井 久 群馬県家畜衛生研究所)

質問 (浅井鉄夫，動物医薬品検査所)

フルオロキノロンなどの合成抗菌薬だけでなく，*tet* (B)， β ラクタマーゼも本来大腸菌が持っているので耐性遺伝子ではないのでは。自然界の中に，天然のもので人為的に移ってきたのではと考えてよいのではないか。

答 (小川恵子)

比較対照がない。おそらく人為的な影響はあると思っ

質問 (金井 久，群馬県家畜衛生研究所)

フルオロキノロン耐性の話で，系統分類をするとB2が多いという以前の発表がありましたが，B2耐性株はあの系統図のどこに入りますか。人からは分離されるが，野生動物からどのように系統図で分類されるのか。MLSTもやってみたらいいのではないか。

答 (小川恵子)

キノロン耐性株はスライドで困ったところに示してあります。人との関連性があるのではと考えてい

る。MLSTでヒト由来株と比較したい。

質問（金井 久，群馬県家畜衛生研究所）

群の中での共通性といわれたが，逆に遺伝子により群を識別，区別することができますか？

答（小川恵子）

群としての接触がないようなサルの子孫からも遺伝子が一致した場合もあるので，RAPD法では完全に識別できないかもしれないので，PFGEの方がいいと思うので試してみたいと思います。しかし，過去にはこのPFGE法で群レベルの比較が可能でした。

発言（江崎英剛，畜産生物科学安全研究所）

まとめに示してあった畑作関連，環境影響についてですが，一見動物薬の使用と関連がなさそうに見える畑作地帯においても，薬が糞便などに残留し，堆肥化して畑にまかれるなど，動物薬が関与する可能性もあります。糞便が堆肥化処理された後も，薬剤によっては高い割合で力価を有していることもあります。抗菌薬は安定性が高いと畑にまかれても残留するのでそういうのを考えても面白いのではと思います。