

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651270

研究課題名(和文) 沖縄島における侵略的外来生物グリーンアノールのサルモネラ保菌とリスク評価

研究課題名(英文) Prevalence of Salmonella from green anoles (*Anolis carolinensis*), an invasive species on Okinawa Main Island

研究代表者

村田 浩一 (MURATA, Koichi)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：00339285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)： 沖縄島で捕獲されたグリーンアノール(*Anolis carolinensis*)608個体のSalmonella保菌実態を調べた。2009年、2010年、2012年および2013年の捕獲個体からは、それぞれ3.9%、1.0%、2.0%および4.0%の率で分離されたが、2011年捕獲の130個体からは分離されなかった。Salmonellaの血清型は、沖縄島において食中毒原因菌として頻繁に分離されるS. WeltevredenとS. Enteritidisであった。分離株の14.3%がオキシテトラサイクリン耐性を示した。

研究成果の概要(英文)： We surveyed the rate of Salmonella carriage in 608 green anoles (*Anolis carolinensis*), an invasive alien species on Okinawa Main Island. The overall carriage rate in the year of 2009, 2010, 2012 and 2013 was 3.9%, 1.0%, 2.0% and 4.0% respectively. None was detected from the 130 samples collected in 2011. Serovar of the microbial isolate were S. Weltevreden and S. Enteritidis. Prevalence rate for Oxytetracycline-resistant Salmonella of 14.3% was found for the total isolates.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：資源保全学・資源保全学

キーワード：グリーンアノール 外来種 サルモネラ 沖縄島

1. 研究開始当初の背景

グリーンアノール(*Anolis carolinensis*)は、北米南東部から中米に自然分布する爬虫類であるが、1970年代に小笠原諸島の父島へ、その約10年後には母島に侵入して著しく増殖し、島の生態系攪乱要因となっている。更に2009年には、沖縄本島での定着が確認された。この侵略的外来生物であるグリーンアノールが島の固有種に与える影響に関しては研究がなされているが、本種が保有する病原体に関する研究は、我々の先行研究以外行われていない。

そこで、グリーンアノール(宿主)と同等もしくはそれ以上に問題が大きいと考えられる病原体のうち、とくに爬虫類で感染報告例の多い病原性細菌のサルモネラ(*Salmonella* spp.)を指標微生物として、外来生物と共に分布拡大する病原体の侵入リスクを環境側面から評価し、保全医学的視点からの新たな外来種対策を構築することで、野生動物とヒトと生態系の健全な関係維持を図ることを着想した。

2. 研究の目的

沖縄島で新たに定着が確認されたグリーンアノールおよび環境中のサルモネラ保菌状況および血清型別を解明する。また、各種細菌性状および血清型の情報を、先行研究で得られた小笠原諸島の同情報と比較検討する。更に、これらの解析結果を総合し、侵略的外来生物が運搬もしくは増幅する病原体が生態系およびヒトの健康に与えるリスクを評価すると共に、保全医学的視点を組み込んだ新たな外来種対策の構築を本研究の最終目標とする。

3. 研究の方法

サルモネラ検査対象としたグリーンアノールは、2009年から2013年の間に、環境省の特定外来生物防除等推進事業により粘着トラップまたは的手法により捕獲され、那覇自然環境事務所まで冷凍保存されていた個体の一部である。本個体の捕獲地点は、聞き取り調査で目撃情報が多かった沖縄島南部那覇市周辺(北緯26度13分、統計127度41分)の5か所の地域であった。グリーンアノールは当研究室に冷凍状態で輸送し、検査を行うまで-30℃で保存した。検査に供した個体は比較的損傷が少なく状態の良い608個体分で、2009年から2013年まで採取された個体数の内訳はそれぞれ178個体、100個体、130個体、100個体、100個体であった。冷凍保存状態のグリーンアノールを室温解凍後、SVL(吻-クロアカ間長)を測定し、安全キャビネット内で解剖し、腸内容物を採取して検査試料とした。

グリーンアノールの腸内容物約0.1g、腸内容物が採取できなかった場合は腸管を摘出し、前培養に供した。腸内容物もしくは腸管全体を5mlの緩衝ペプトン水(日水製薬株式会社)に混和し、インキュベーター内(37℃)

で20~24時間培養した。

前培養後の緩衝ペプトン水0.5mlを、10倍量(4.5ml)のラポポートバシリアディス培地(日水製薬株式会社)と混和し、37℃で20~24時間培養した。

選択増菌培養後の培地から1白金耳量を採取し、SS寒天培地(日水製薬株式会社)に画線塗抹した。37℃で20時間~24時間培養後、サルモネラの特徴である中心部黒色、周辺部が無色透明なコロニーまたは無色半透明なコロニーを1または2コロニーずつ釣菌し、TSI培地(日水製薬株式会社)およびLIM培地(日水製薬株式会社)に接種して37℃で18~24時間培養した。サルモネラの性状を示した菌株は、簡易同定キット(IDテストEB-20、日水製薬株式会社)に添付されたプロトコールに従い菌液を作成し、37℃、16~20時間培養後、20種の生化学性状の陽性・陰性のパターンにより菌種同定を行った。簡易同定検査でサルモネラと判定された分離株については、O抗原およびH抗原の凝集反応により判定した。

生化学的検査と並行してTSI培地およびLIM培地でサルモネラの性状を示した菌株をDNeasy Blood and tissue Kit(株式会社キアゲン)によりDNA抽出を行った。精製DNAをテンプレートとし、PCR法を用いてサルモネラ細胞侵入性因子(*invA* 遺伝子)増幅の有無を確認した。

大腸菌検査対象としたグリーンアノールは、上記と同様に冷凍保存されたグリーンアノール200個体であり、2010年7月2日から2011年11月7日の間に捕獲されたものである。環境試料としては、2013年5月と7月に沖縄県那覇市内のグリーンアノールの生息が確認されている公園13か所と未確認の公園4か所において、土壌22検体、環境水3検体(側溝の水、池の水、溜まり水)、公園内の公衆トイレの拭き取り試料15検体、哺乳類(種不明)糞3検体の計43検体を採取した。公園内土壌は、滅菌済み薬匙を用いて、滅菌済み50mlコニカルチューブ(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)に採取した。環境水は、滅菌済み50mlコニカルチューブに採取した。公園内の公衆トイレ拭き取り試料および哺乳類糞は、シードスワブ(栄研化学株式会社)を用いて採取した。全ての試料は、冷蔵保存状態(4℃)で研究室に輸送後、1週間以内に検査を行った。

土壌については、試料20gに滅菌PBSを30ml加え、1時間室温静置した。その後、上清20mlを採取し滅菌DWを加えて計100mlとしたものを試験水とした。試験水はQuanti-Tray/2000(アイデックスラボラトリーズ株式会社)のプロトコールに従い、試験水と試薬の混合液をトレーに入れシーラーを用いて密封し、37℃、24時間培養を行った。大腸菌と大腸菌群は、黄色を呈したウェルを紫外線照射し淡青色~青紫色の発色の有無で判別した。環境水(側溝の水、池の水、溜

まり水)については、試料 20ml に滅菌 PBS を加え計 100ml にしたものを試験水とした。大腸菌の有無の判定は土壌サンプルと同様の方法で行った。公衆トイレ拭き取り試料および哺乳類糞については、シードスワブに付属された綿棒を用いて MacConkey 寒天培地に塗抹した。その後は、グリーンアノールの腸内容物と同様のプロトコルで検出した。

薬剤感受性試験については、米国臨床検査標準委員会 (CLSI) 抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づき、ディスク拡散法により行った。プロンプトキット (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を用いてマクファーランド 0.5 に相当する菌液を作成し、滅菌綿棒 (メンティップ; 日本綿棒株式会社) を用いてミュラーヒントン寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) に塗抹した。ABPC (アンピシリン)、PIPC (ピペラシリン)、CZOP (セフォゾプラン)、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)、OFLX (オフロキサシン)、CP (クロラムフェニコール)、NA (ナリジクス酸)、FOM (ホスホマイシン)、ST (ST 合剤)、SM (ストレプトマイシン)、CAZ (セフトジジム)、CTR (セフトリアキソン)、CTX (セフトキサシム)、CXM (セフロキサシム)、CET (セファロチン) (日本 BD 株式会社) の 17 薬剤ディスクを用い、35、16~20 時間培養した。なお、対照菌として、*E. coli* ATCC 25922 を用いた。

培養後、阻止円の直径をデジタルノギス (株式会社ミットヨ) で測定し、付属の判定表を用い感性 (S)、中間 (I)、耐性 (R) に判定した。

最小発育阻止円濃度 (MIC) の測定は、ハートインヒュージョン寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) に純培養した大腸菌を用いた。プロンプトキットを用いてマクファーランド 0.5 に相当する菌液を調整し、滅菌綿棒を用いてミュラーヒントン寒天培地に塗抹した。E-test® (シスメックス・ピオメリュー株式会社) を用いて、ABPC、CET の計 2 剤の MIC 測定を行った。OTC に関しては、Microbial Viability Assay Kit-WST (株式会社同仁化学研究所) を用い、付属のプロトコルに従い測定した。

グリーンアノールの SVL 別薬剤耐性大腸菌分離の解析については、検体の年齢による感染率を知るため、大腸菌分離率を比較した。年齢別を SVL から推測するため、42mm 以上を成体、42mm 以下を幼体と区分し孵化後週齢を推測した。

薬剤耐性大腸菌の分布実態を明確にするため、地理情報ソフトウェア (Quantum GIS Ver. 1. 8. 0) を使用し、薬剤耐性大腸菌が分離されたグリーンアノールの捕獲地点、分離されなかったグリーンアノールの捕獲地点、環境試料の薬剤耐性菌分離地点の緯度経度を電子地図上に展開した。また、分離地点を中心とした半径 100m および 500m に存在する

病院およびヒトと接触機会のある公園も同様に展開した。病院および公園の位置情報については、国土地理院の国土数値情報ダウンロードサービスから入手した。

グリーンアノールの成体と幼体の大腸菌分離率をカイ二乗検定で統計解析した。また、グリーンアノールの捕獲地点から病院および公園間の距離を捕獲地点別に一元配置分析を行った。どちらも有意水準を 5% とした。

4. 研究成果

サルモネラが検出されたのは、2009 年と 2010 年および 2013 年に捕獲された 14 個体からで保菌率は 2.3% であった。小笠原諸島の保菌率 (>30%) に比較すると極めて低率である。沖縄島と同様に本種が生息し、移入から約 60 年経過したグアム島では、長期的な調査によりグリーンアノールの高率なサルモネラ保菌が報告されている。グアム島では野良犬や野生トカゲのサルモネラ保菌が明らかにされており、その糞便が土壌のサルモネラ汚染源となることや、糞便に引きつけられるハエが野生トカゲの餌となることで感染拡大するなど、生息環境や他の野生動物を通したサルモネラの感染環が示唆されている。また、グリーンアノールの定着から 30~50 年が経過した小笠原諸島の父島および母島では、周辺に生息するノヤギや野鳥、公衆トイレの拭き取り試料からサルモネラが分離されており、本種とその生息環境および他の野生動物との間に感染環が成立していると推測されている。このように、本種の保菌するサルモネラの伝播には様々な感染経路が関与しているが、沖縄島においてグリーンアノールのサルモネラ保菌率が低率であるのは、同所的に生息する野生動物の保菌率が同様に低いためか、もしくは他の保菌動物からの感染機会が少ないためではないかと考えた。グリーンアノールは他の爬虫類と同じくサルモネラに高い感受性を示すが、本研究結果から、沖縄島への移入時には保菌しておらず、その後も感染機会が少なかったためにグアム島や小笠原諸島のような高率感染を示していないと推察した。

分離されたサルモネラの血清型別は、*S. Weltevreden* と *S. Enteridis* が中心であり、小笠原諸島で大半を占めていた *S. Oranienburg* は検出されなかった。沖縄県において食中毒原因菌として頻りに分離される血清型である。また、サルモネラが分離された個体はそれぞれ民家付近および基地付近で捕獲されており、ヒト生活環境からグリーンアノールへのサルモネラ伝播の可能性が示唆された。一方、本血清型のサルモネラを保菌するグリーンアノールが民家や飲食店内へ侵入し、その糞便に汚染された食品や調理器具から本食中毒菌をヒトへ伝播することも危惧されるため、外来種対策としてのみならず公衆衛生対策として本種の防除が大切であると考えられる。分離された *S. Weltevreden* は本州では稀だが、沖縄県では *S. Enteritidis* および *S.*

Typhimurium に次いで食中毒患者や原因食品から頻りに分離される血清型であることから、低保菌率の結果と併せて考えると沖縄島へグリーンアノールが移入した後に環境や他の野生動物から感染を受けたと推察される。しかし、父島のグリーンアノールやグアム島のヒトからも僅かながら *S. Weltevreden* が分離されている。さらに、本種が移入したハワイ島での小児下痢症の原因菌においても *S. Weltevreden* が分離されていることから、移入前すでにサルモネラを保菌していた可能性も皆無ではない完全には否定できない。グリーンアノールにサルモネラが随伴して沖縄島へ持ち込まれたか否かを明らかにするためには、本種とその生息環境から分離されたサルモネラの遺伝子型を他の地域の個体や分離株型別と比較するなど、さらに詳細な分子生物学的調査が必要であると考えた。

分離されたサルモネラ 14 株のうち 2 株 (14.3%) が OTC 耐性を示した。他の薬剤に関しては感受性もしくは中間であった。OTC を含むテトラサイクリン系抗菌薬は安価かつ広域スペクトルを有するため、ヒトや家畜の感染症治療、さらに家畜の飼料添加剤として大規模に使用された経緯があり、本抗菌薬に対する耐性菌は自然界に広く分布している。沖縄島では、家畜やハエ、野生カラスおよびヒトから分離されるサルモネラからも OTC 耐性菌が分離されている。ヒト生活環境から野生動物に伝播した薬剤耐性菌が野生動物間で様々な経路を経て感染拡大することが知られており、本種も他の保菌動物や生息環境を介して OTC 耐性サルモネラを獲得した可能性が考えられた。

環境省の報告によると、各年における捕獲個体数は 2009 年が 678 個体、2010 年が 3392 個体、2011 年が 6804 個体であり、明らかな個体数増加傾向を示しておらず、生息地も那覇市周辺の民家や公園、街路樹等の限られた場所に止まっている。これらの報告内容と本結果を併せて検討すると、沖縄島では未だグリーンアノールのサルモネラ保菌が拡大傾向にないと推察され、現時点で本種がサルモネラの増幅者もしくは運搬者となって環境や他の野生動物そしてヒトに与える影響は低いと考えられた。しかし、本種の分布拡大や個体数増加に伴い保菌率が高まることも予測されるため、グリーンアノール以外の野生動物の保菌や生息環境の汚染実態を含めて継続的に調査する必要があると考えた。

大腸菌については、42 検体 (21.0%) から検出された。分離株の薬剤耐性については、OTC 単剤耐性が 1 検体、CET 単剤耐性が 10 検体、ABPC-CET の 2 剤耐性が 1 検体認められた。幼体 1 個体からも分離され、経卵感染または局所的環境からの感染が疑われた。

本種の生息地周辺には病院および公園が多く存在していることから、耐性菌の獲得場所となっている可能性が示唆された。グリーンアノールの防除対策のみならず本種がも

たらす公衆衛生面での問題対応が必要と考えた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Sumiyama, D., Izumiya, H., Kanazawa, T., Murata, K. *Salmonella* infection in green anoles (*Anolis carolinensis*), an invasive alien species on Chichi Island of the Ogasawara Archipelago in Japan, *Journal of Veterinary Medical Science* 76, 461-465, 2014. (査読有)

村田浩二、家畜と野生動物の間を行き来する感染症、*日本野生動物医学雑誌* 18、87-91、2013. (査読有)

[学会発表](計 4 件)

清水彩子, 阿部慎太郎, 泉谷秀昌, 村田浩二: 沖縄島に生息するグリーンアノールの *Salmonella* 保菌. 沖縄生物学会四学会合同沖縄大会: May 25, 2014 (琉球大学)

石橋佐和子, 千葉暁允, 村田浩二: ヤンバルクイナが利用する農場周辺環境における薬剤耐性大腸菌の分布実態. 沖縄生物学会四学会合同沖縄大会: May 25, 2014 (琉球大学)

清水彩子, 遠藤優里, 阿部慎太郎, 千葉暁允, 田中魁, 泉谷秀昌, 村田浩二: 沖縄島における侵略的外来生物グリーンアノールのサルモネラ保菌状況および薬剤耐性 (2009 年 ~ 2011 年), 日本野生動物医学学会京都大会: August 30, 2013 (京都大学)

田中魁, 本間早紀, 阿部慎太郎, 清水彩子, 千葉暁允, 村田浩二: 沖縄島の侵略的外来生物グリーンアノールおよび生息環境における薬剤耐性大腸菌保有実態, 日本野生動物医学学会京都大会: August 30, 2013 (京都大学)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 浩一 (Murata, Koichi)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：00339285

(2) 研究分担者

泉谷 秀昌 (Izumiya, Hidemasa)
国立感染症研究所・細菌第一部・室長
研究者番号：30291123

(3) 連携研究者

()

研究者番号：