

# 東京都下に生息するネズミ類から分離された薬剤耐性大腸菌

草野友子 中村 満\* 林谷秀樹\*\* 小川益男\*\*  
(\* 現建設局 \*\* 東京農工大学)

## 要 旨

東京都下に生息する野生動物における薬剤耐性菌の分布状況を明らかにする目的で、都内5地域で捕獲されたクマネズミ52匹、アカネズミ15匹から分離された大腸菌について寒天平板希釈法による薬剤感受性試験を行った。

薬剤感受性試験において、供試検体数に占める耐性菌検出個体の割合は、クマネズミが28%、アカネズミが13%であった。薬剤耐性大腸菌の検出状況については、生息場所および薬剤種による差が認められた。

キーワード：薬剤耐性大腸菌、環境汚染、野生動物

## Drug Resistant *Escherichia coli* Isolated from Wild Rodents Inhabiting in Tokyo Metropolitan Area

Tomoko Kusano, Mitsuru Nakamura\*, Hideki Hayashidani\*\*, and Masuo Ogawa\*\*

\* Bureau of Construction

\*\* Tokyo University of Agriculture and Technology

### Summary

For the purpose of clarifying the distribution of drug resistant strains isolated from wild animals inhabiting in Tokyo Metropolitan area, the susceptibility to antimicrobial drugs of *Escherichia coli* isolated from 52 *Rattus rattus* and 15 *Apodemus speciosus* captured in 5 areas were examined by using the methods for agar dilution tests in Muller-Hinton agar.

From the results, 28% of *Rattus rattus* and 13% of *Apodemus speciosus* were found to be drug resistant. From the detection of drug resistant *Escherichia coli*, the differences among areas of inhabitation and drugs were observed.

Keywords : drug resistant *Escherichia coli*, environmental pollution, wild animals

### 1 はじめに

20世紀に開発された種々の抗菌製剤によって多くの感染症が制圧されたが、一方ではMRSA（メチシリン耐性ブドウ球菌）等に代表される薬剤耐性菌（抗菌製剤に耐性を持つ細菌）が出現し、公衆衛生上大きな問題となっている。その問題点としては、耐性菌の数の増加と耐性の広がりがある。

耐性菌の分布域はヒトや家畜の体内、医療施設等のみならず自然界にも拡大しつつあり、野生動物、魚類、河川等からも耐性菌が分離されている。これらの耐性菌は、みな抗菌薬剤を使用するヒトや家畜由来菌に起因するものが多いと考えられ、再びヒトへの汚染源となっていく。以上のことから、自然界における薬剤耐性菌の分布調査を行うことは公衆衛生上の意義があるだけでなく、生物の生息環境がいかに人間活動による汚染の影響を受けているかを知る手がかりの一つになると思われる。

薬剤耐性菌の分布状況調査は以前から家畜を中心に詳しく行われており、現在でも種々の細菌、薬剤について調査が行われている<sup>2),3),4)</sup>が、環境中あるいは抗菌製剤に接触のない野生動物での調査例は少ない。

野生動物における薬剤耐性菌の分布状況を調査した事例としては、金井が群馬県で日本カモシカについて耐性菌を分離した例<sup>5)</sup>、金城が沖縄県において家畜、ヒトとともに、野生のハトについて調査を行った例<sup>6)</sup>等がある。その後、金城らは、野生生物の種類をさらに増やして調査を行い、耐性菌の検出状況から生物の生息環境と人間活動との関わりについて検討を行っている<sup>7)</sup>。

著者らは、東京都下に生息する野生動物における薬剤耐性菌の分布実態を把握し、生息環境への人間活動による影響について考察する目的で、今回、自然界に普遍的に生息するネズミ類の保持する大腸菌における薬剤耐性の出現状況を調べた。

薬剤感受性試験に大腸菌を選んだ理由としては、第一に、大腸菌がサルモネラと並んでR因子による耐性の伝達という点で公衆衛生上重要であるからであり、第二に大腸菌が動物の腸内に腸内細菌として通常存在し、また、分離同定手法も確立しているためである。

以下に今回の調査結果を報告する。

### 2 実験材料および方法

#### (1) 供試動物

東京都下に生息するネズミ類で、主に都心部に生息するクマネズミ (*Rattus rattus*)と森林部に生息するアカネズミ (*Apodemus speciosus*)である。クマネズミは1996年6月から11月に台東区、新宿区内で駆除会社によって主にビル内で捕獲されたものを、アカネズミは1996年6月から1997年1月までに三鷹市国際基督教大学学有林および町田市、八王子市内の東京都保全林内で捕獲したものを供試動物とした。

#### (2) 大腸菌の分離と同定

供試動物からの大腸菌の分離方法を図1に示した。

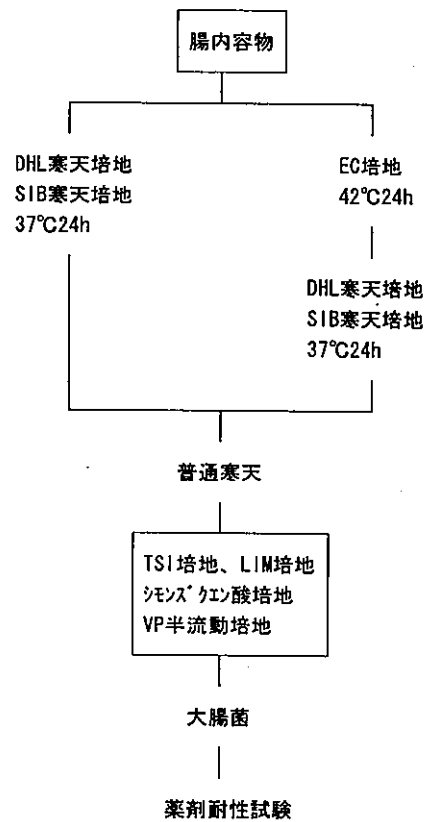


図1 大腸菌の分離方法

供試動物の直腸または盲腸内容物を採取し、DHL寒天培地（栄研）、SIB寒天培地（極東）に接種し、37°C24時間培養した。また、同時にEC培地にも（極東）接種し42°C24時間増菌培養後、その増菌培地の1白金耳をDHL寒天培地、SIB寒天培地に接種し37°C24時間培養した。DHL寒天培地、SIB寒天培地から大腸菌と思われる集落を1平板あたり各5株ずつ釣菌し純培養した後、次の生化学的性状試験に供した。すなわち、TSI、LIM寒天培地（栄研）による乳糖分解、硫化水素産生、ガス産生、リジン産生、インドール産生、運動性の確認、シモンズクエン酸寒天培地（栄研）による、クエン酸利用

についての試験、VP半流動培地（栄研）によるVP反応試験を行い、大腸菌の性状を示したものについて保存培地で保存した。

(3) 薬剤感受性試験

各検体より分離された大腸菌について1検体あたり3から8株について薬剤感受性試験を行った。薬剤は、アンピシリン (ABPC), カナマイシン (KM), オキシテトラサイクリン (OTC), ナリジクス酸 (NA), コリスチン (CL), セファゾリン (CEZ), ストレプトマイシン (ST), ゲンタマイシン (GE), クロラムフェニコール (CP) の9薬剤であり、いずれも生化学用原末 (和光製薬) を使用した。試験は、日本化学療法学会標準法 (1981)<sup>8)</sup>に準拠し、寒天平板希釈法により実施した。すなわち、MIC測定用感受性ブイヨン培地 (栄研) で37°C24時間培養の菌液を生菌数10<sup>6</sup>/mlに調整し、これをマイクロプランター (MIT-P, 東洋測器) を用いて、100μg/mlから0.025μg/ml濃度まで2倍段階希釈した薬剤を添加したミューラーヒントンS寒天培地 (栄研) に接種した。薬剤感受性は37°C24時間培養後、寒天平板上における接種菌の発育が完全に阻止された最低濃度、すなわち最小発育阻止濃度 (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) で表し、MIC値が50μg/

ml以上のものを耐性菌とした。なお、対照菌株として *E. coli* JCM5491と *Staphylococcus aureus* 209Pを使用した。

3 結果

(1) 採取した検体数と大腸菌分離状況 (表1)

採取したネズミ類の検体数と大腸菌の分離状況を表1に示した。クマネズミでは、検体数に対する大腸菌分離個体は2カ所共に70~80%であった。アカネズミについては、採取できた検体数が少ないために分離率にばらつきがみられた。今回、ネズミ類の約30%からは大腸菌が分離されなかった。

表1 大腸菌分離状況

動物種	採取場所	検体数	大腸菌陽性 検体数 (%)
クマネズミ	台東区	33	24 (73)
	新宿区	19	15 (79)
アカネズミ	八王子市	9	3 (33)
	町田市	4	3 (75)
	三鷹市	2	2 (100)
合計		67	47 (70)

表2 薬剤耐性試験結果

動物種 生息場所	供試 検体数	耐性菌検出個体数									* 耐性菌 検出個体
		ABPC	KM	OTC	NA	CL	GEZ	SM	GM	CP	
クマネズミ											
台東区	24	5	0	1	0	0	1	1	0	0	6
(%)		(21)	(0)	(4)	(0)	(0)	(4)	(4)	(0)	(0)	(25)
新宿区	15	3	1	3	0	1	2	2	0	0	5
(%)		(20)	(7)	(20)	(0)	(7)	(13)	(13)	(0)	(0)	(33)
合計	39	8	1	4	0	1	3	3	0	0	11
(%)		(21)	(3)	(10)	(0)	(3)	(8)	(8)	(0)	(0)	(28)
アカネズミ											
八王子市	3	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
(%)		(0)	(0)	(33)	(0)	(0)	(0)	(33)	(0)	(0)	(33)
町田市	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(%)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
三鷹市	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(%)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
合計	8	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
(%)		(0)	(0)	(13)	(0)	(0)	(0)	(13)	(0)	(0)	(13)

ABPC:アンピシリン      KM:カナマイシン      OTC:オキシテトラサイクリン  
 NA:ナリジクス酸      CL:クロラムフェニコール      GEZ:セファゾリン  
 SM:ストレプトマイシン      GM:ゲンタマイシン      CP:クロラムフェニコール

(2) 薬剤耐性試験結果

分離された大腸菌について薬剤感受性試験を行った結果を表2に示した。クマネズミの場合、検出された大腸菌がいずれかの薬剤1つ以上に耐性を持つ検体の割合は、台東区で25%、新宿区で33%であった。また、薬剤別の耐性パターンをみると、台東区では、検出された大腸菌がABPCに耐性を持つ検体が21%と最も多く、ついでOTC、CEZ、SMに耐性が各4%であった。新宿区では、ABPC、OTCに耐性を持つ検体が各20%で、ついでSM、CEZ耐性が各13%であった。また、台東区では検出されなかったKM、CLに耐性を持つ検体が各7%みられた。

アカネズミでは、耐性菌の検出率は低かった。しかし、八王子の保全林で採取した検体においてOTC、SMに耐性を持つ個体が1例認められた。

また、今回、分離された薬剤耐性大腸菌の耐性のパターンを表3に示した。供試薬剤のいずれかに耐性を示したものは、供試大腸菌248株中29株であった。台東区で捕獲されたクマネズミ由来大腸菌においては、ABPCのみ耐性が8株、ついでOTCのみ耐性が3株であった。2剤耐性株はABPC-SM耐性が1株、ABPC-CEZ耐性が1株であった。新宿区で捕獲されたクマネズミ由来大腸菌においては、OTCのみ耐性が3株、2剤耐性株は、ABPC-CEZ、OTC-SM耐性が各1株、ABPC-CL-CEZの3剤耐性が1株、ABPC-KM-OTC-

SMの4剤耐性が5株認められた。

八王子市で捕獲されたアカネズミ由来大腸菌においては、OTC-SMの2剤耐性が5株検出された。

(3) 供試大腸菌におけるMIC値の分布

薬剤耐性試験に供試した大腸菌のMICについて各薬剤別、動物種類別に分布曲線を表した(図2、図3)。

クマネズミにおけるMICの分布曲線を、図2に示した。ABPC、OTC、SMが2区ともに二峰性であった。CEZの耐性株が2区ともに1、2株あったがここでは耐性のヤマとして表れていない。KM、CLは、新宿区のみが二峰性であった。それ以外は薬剤耐性菌が認められず、薬剤感受性菌のみの一峰性の曲線であった。各薬剤のピーク濃度、分布曲線はほとんど同じであり2区間での差は、認められなかった。

アカネズミにおけるMICの分布曲線を、図3に示した。八王子で捕獲されたアカネズミのみがOTC、SMにおいてのみ二峰性の曲線を示した。その他は、薬剤感受性菌のみの一峰性の曲線であった。各薬剤におけるピーク濃度および分布曲線は都心部に生息するクマネズミに比べると生息場所による差が認められた。

4 考察

今回、東京都内に生息するネズミ類において、増菌培養後でも大腸菌が分離されない個体がクマネズミで30~20%、アカネズミで約50%認められ、ネズミ類では腸内常在菌の中に大腸菌を持たない個体がいるものと推察された。アカネズミからの大腸菌検出率は捕獲数が少ないために捕獲場所によって差があり、今後調査数を増やして検討していく必要があると思われる。

次に薬剤耐性試験の結果、区部で捕獲されたクマネズミでいずれか一つ以上の薬剤に耐性を示した個体が約30%程度認められた。野生の動物は投薬等の治療を受けることはなく、クマネズミが保有する薬剤耐性大腸菌は環境由来のものと思われる。ネズミ類における薬剤耐性菌の調査事例は野生動物の中でも少なく、クマネズミに関する文献はみられなかった。金城らは、名古屋市内のドブネズミにおける耐性菌の分布を調べた結果、耐性菌検出個体は27.7%であったことを報告しており<sup>7)</sup>今回クマネズミで得た結果と同様な数値であった。同じく金城らは、野生の日本カモシカの2.5%のみから薬剤耐性大腸

表3 ネズミ類由来大腸菌の薬剤耐性パターン

動物種 採取場所	薬剤耐性 パターン	薬剤の 種類	* 菌株数(個体数)
クマネズミ 台東区	1剤耐性	ABPC	8(3)
		OTC	3(1)
	2剤耐性	ABPC-SM	1(1)
		ABPC-CEZ	1(1)
新宿区	1剤耐性	OTC	3(2)
	2剤耐性	ABPC-CEZ	1(1)
		OTC-SM	1(1)
	3剤耐性	ABPC-CL-CEZ	1(1)
4剤耐性	ABPC-KM-OTC-SM	5(1)	
アカネズミ 八王子市	2剤耐性	OTC-SM	5(1)

ABPC:アンピシリン KM:カナマイシン  
OTC:オキシテトラサイクリン CL:クロラムフェニコール  
CEZ:セファゾリン SM:ストレプトマイシン

\*検出された個体数

菌が検出<sup>7)</sup>、高橋らは小笠原の野生の豚、牛、山羊から薬剤耐性大腸菌が検出されなかったことを報告しており<sup>9)</sup>、これらの成績と比較すると、今回得られたクマネズミの大腸菌における薬剤耐性菌の出現割合は高いものと思われる。

クマネズミ全体ではABPC、OTC、CEZ、SMに対する耐性菌の検出率が高かった。東京都23区内には家畜等を飼育する農家はほとんどなく、これらの耐性菌は大部分がヒト由来のものであると思われる。日本におけるヒトでの経口抗菌剤の年間販売額推移によると、経口セフェム薬が最も多く、次いでニューキノロン系、経口ペニシリン、マクロライドの順になっている<sup>10)</sup>。今回、CEZ耐性菌が比較的高率に分離されたが、ヒトでの使用を反映している結果であり興味深い。一方、SMは1969年にはその耐性菌が最も多く分離されたが副作用のためその後使用は少なくなり1976年以降は大病院検査室においてもディスク法での検査も行われていない<sup>11)</sup>。そのSM耐性菌がクマネズミから分離されていることは、いまだに環境中に本耐性菌が広く分布しているものと考えられる。

また、同じクマネズミでも台東区と新宿区のものを見ると全検体に比する耐性菌検出検体の割合は新宿区のほうが高い割合を示した。また、各薬剤別の耐性菌検出個体の割合でもABPCを除く各薬剤に対して新宿区の方が高い検出率を示していた(表2)。これは表3に示したように新宿区における多剤耐性菌検出率が高いためであり、全体的に新宿区におけるクマネズミの方が汚染度は高いものと思われた。

一方、多摩の森林部で捕獲されたアカネズミでは全体的に耐性菌の検出率が低かった(表2)。金城らの報告でもアカネズミにおける耐性菌の検出率は低く<sup>7)</sup>、このことから森林地帯に生息するアカネズミにおける薬剤耐性菌の汚染度は低いものと考えられた。しかし、今回著者らが行った調査では、八王子市で捕獲された検体でOTC、SMの2剤耐性菌が検出された(表3)。このことから、多摩地区の3つの森林内のうち八王子市の保全林内の耐性菌の分布が広がっている可能性が示唆された。東京都の多摩地区には畜産農家も存在するため、これらの耐性菌がヒト由来のものか家畜由来のものかは、今回の結果だけではわからないが、今後はさらに調査数を増やして、周辺環境調査等もしていく必要があると思われる。

MICの分布曲線を見ると、多摩森林部に生息するアカネズミにおいて、非耐性菌の薬剤濃度に対する分布状況に差が認められた(図2)が、検体数の少なさによるばらつきの可能性も考えられた。

今回、東京都下に生息するネズミ類から分離された大腸菌における薬剤耐性の実態について調査した。その結果、多摩の森林内に生息するアカネズミよりも都心部に生息するクマネズミが、また同じクマネズミでも台東区内に生息するものより新宿区内に生息するものの方が薬剤耐性大腸菌の検出率が高かった。このように、生息場所によって薬剤耐性大腸菌の検出率に差が認められており、野生に生息する動物から分離される薬剤耐性菌の分布状況が、人間活動による汚染の指標となり得ることを示唆している。

また、薬剤耐性菌が現実にはヒトの体内に入った場合には、2つの公衆衛生上の問題点が、特に家畜由来の耐性菌について指摘されている<sup>11),12)</sup>。第一に、ヒトに病原性をもつ微生物が薬剤耐性を持つ場合であり、この代表的なものとしてサルモネラがある。サルモネラ菌はヒトに食中毒を起こさせるが、このような細菌が薬剤耐性を持つ場合にはその治療が困難となる。第二に、薬剤耐性菌自体に病原性がなくても、ヒトの体内で病原性をもつ微生物に耐性を伝達させることがある。この場合も同じく、治療が困難となる。

実際に今回調査を行ったネズミ類等の野生動物、特に多摩地区に生息するアカネズミは家畜等に比べるとヒトへの汚染の可能性は低いかもしれない。しかし、薬剤耐性菌の環境への拡散を考える場合、都市下水、河川、野生生物等における汚染状況を総合的に把握していく必要がある。今後は、さらに動物種を変えた検討、都市下水、河川等での耐性菌の動態調査等の必要があると思われる。また、使用薬剤についても、種類を変えた調査が必要であらう。

## 5 謝辞

最後に、今回の研究を行うにあたり検体収集にご協力いただきました㈱イカリ消毒の皆様様に深謝の意を表します。

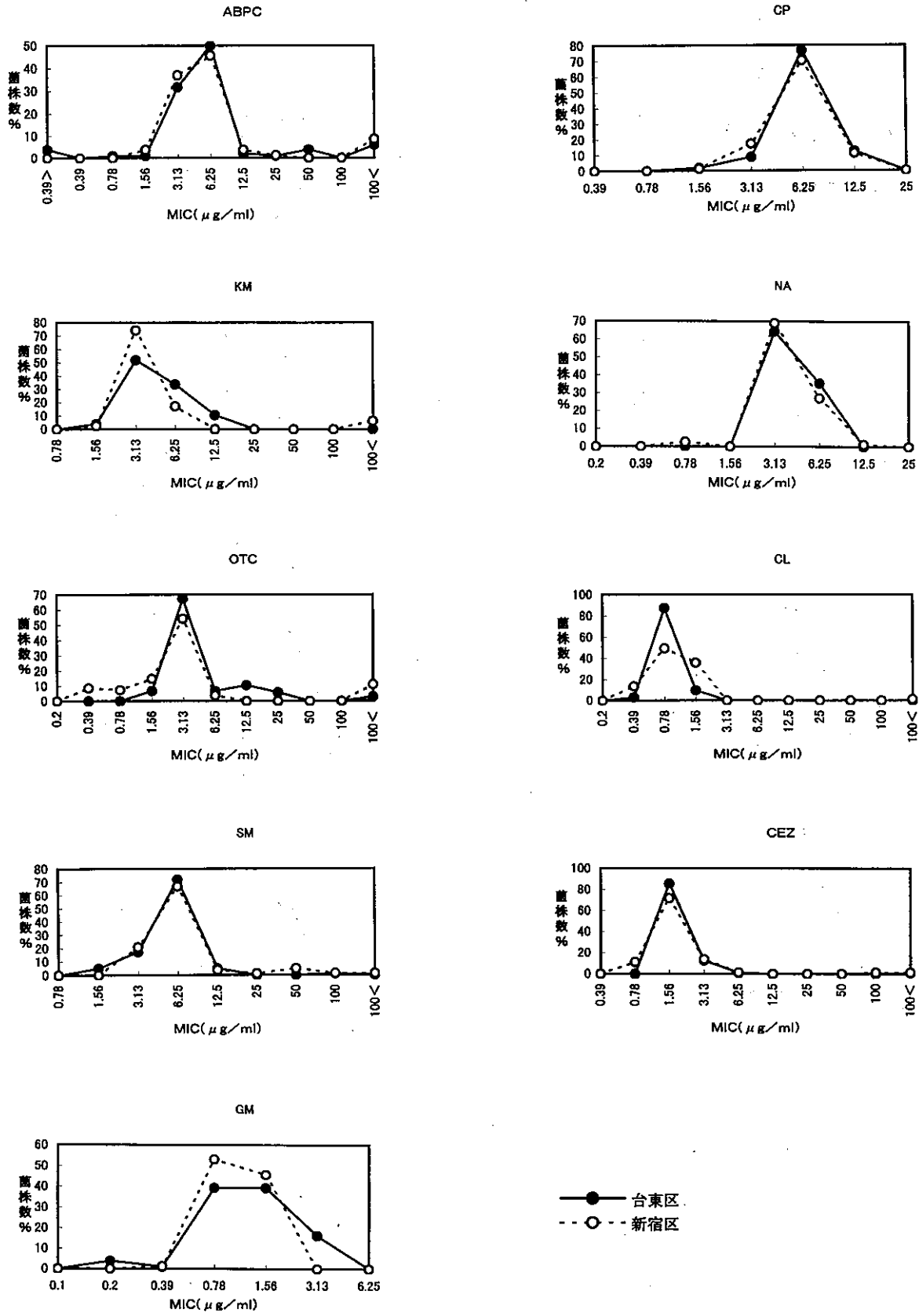


図2 クマネズミより分離された大腸菌のMIC分布曲線

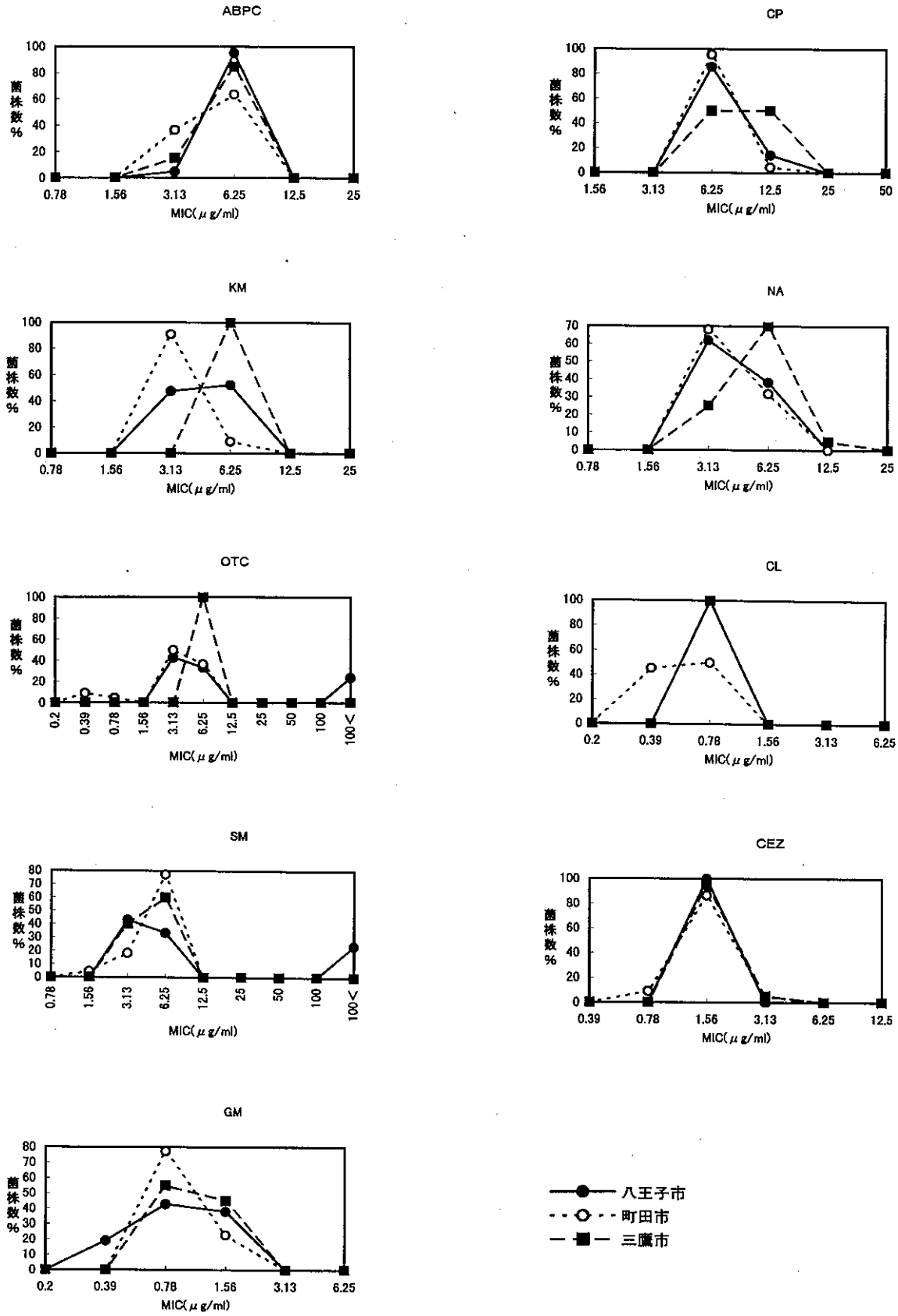


図3 アカネズミより分離された大腸菌のMIC分布曲線

## 引用文献

- 1) 三橋進ら：薬剤耐性菌による環境汚染、初版、学会出版センター、p1~5(1985)
- 2) Bottner, A. *et al.* : *In vitro* efficacy of cefquinorecin and other antiinfective drugs against bovine bacterial isolates from Belgium, France, Germany, the Netherlands, and the United Kingdom, *J. Vet. Med. B*, **42**, p.377~383(1996)
- 3) Frigeris, C. *et al.* : Antibiotic resistance of Staphylococcus isolates from 3 dairy herds in Cordoba, Argentina, *Revista de Med. Vet.*, **76**, 5, p.288~292(1995)
- 4) Salmon, S. *et al.* : Comparison of MICs of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the United States, Canada, and Denmark, *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 9, p.2435~2444(1995)
- 5) 金井久：野外の動物における薬剤耐性菌の調査、畜産の研究、**33**, 3, p.383~388(1979)
- 6) 金城俊夫：沖縄における各種動物および人糞由来大腸菌の薬剤耐性とRプラスミド、日畜会報、**50**, 8, p.542~548(1979)
- 7) 金城俊夫ら：薬剤耐性菌の環境汚染指標としての応用、昭和62年科学研究費補助金(試験研究)研究成果報告書、p.1~24(1988)
- 8) 三橋進ら：最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改定について(1968年制定、1974年改定)、*Chemother.*, **29**, p.76~79(1981)
- 9) 高橋勇ら：第80回日本獣医学会講演要旨集、**21**, (1975)
- 10) 副島林造：抗生物質・抗菌薬の歴史、現況と展望、臨床成人病、**24**, 11, p.1531~1535
- 11) J. P. Lafont, *et al.* : Antibiotic-resistant bacteria in animal wastes : a human health hazard?, *BULL. INST. PASTEUR*, **79**, 3, p.213~231(1981)
- 12) A. H. Linton : Antibiotic resistance in bacteria associated with animals and their importance to man, *J. ANTIMICROB. CHEMOTHER.*, **15**, 4, p.385~386(1985)