

## 飼育ペンギンの糞便からのサルモネラ分離および分離株の性状

岩下亜季・田原口智士・高瀬公三<sup>†</sup>

(家畜微生物学研究室)

平成17年6月30日 受理

### 要 約

西日本の動物園および水族館で飼育されているペンギン（合計144羽）から、2002年8月～2004年5月にかけて採取された糞324検体についてサルモネラの分離を試みた。その結果、2002年8月にA動物園由来の16検体中8検体（50%）からサルモネラが分離され、すべて*Salmonella* Senftenberg (SS)と同定された。また、2003年12月にC水族館由来の糞15検体中1検体（6.7%）からサルモネラ（O4群、血清型不明）が分離された。市販の12薬剤に対する薬剤感受性試験の結果、分離SS株はクロラムフェニコールに対して耐性を獲得していると思われた。O4群血清型不明株は耐性を獲得しているとは考えにくかった。SSの7株およびO4群血清型不明1株を用いて、侵入遺伝子*invA*の検索を行ったところ、全て*invA*を保有していることがわかった。

キーワード：サルモネラ、飼育ペンギン、薬剤感受性、*invA*

### 緒 言

サルモネラは約2,400種にも及ぶ血清型に型別されるグラム陰性通性嫌気性桿菌で、ヒトおよび家畜・家禽に感染し、重篤な食中毒・下痢および敗血症を引き起こす。

サルモネラ属は腸内細菌科に属し、現在2菌種6亜種に分けられている。多くのサルモネラは、ズーノーシスの原因菌として取り扱われている。特に近年のわが国では、サルモネラを原因としたヒトの食中毒の増加は著しく、1992年以降はそれまで細菌性食中毒原因の1位を占めていた腸炎ビブリオを抜き、首位を占めている。

世界的にサルモネラによる食中毒が増加している原因のひとつとして、サルモネラの宿主域の広さがある。牛、馬、豚および鶏などの産業動物のみならず、犬、猫、小鳥などのコンパニオンアニマル、さらにはハト、ネズミ、さらにはカメなどの爬虫類にまで広く分布している。著者らの研究室でも、渡り鳥のツルから高率にサルモネラを分離している[5, 7]。

ところで、ペンギンのサルモネラ感染に関する報告はいくつかあるが、南極大陸に生息する野生のペンギンからのものであり[9, 10, 11]、飼育ペンギンに関する報告は見当たらない。

筆者らは、動物園の飼育ペンギンからサルモネラの分離を試みたところ、フンボルトペンギン (*Spheniscus humboldti*) の糞便からサルモネラを分離したので、その概要を報告する。

### 材料および方法

#### 1. 供試材料

西日本のA動物園およびB, C水族館で飼育されている5種類のペンギンの糞便を供試材料とした。採取は、2002年8月から2004年5月にかけて、各施設のペンギン舎において2～4回に分けて実施した。新鮮な糞便を選びながら、1検体あたり約0.5～1.0gを滅菌ピンセットあるいは薬匙を用いて24穴マイクロプレートに無菌的に採取した。各施設における採取年月毎の検体数はTable 1に、分離結果と共に示

<sup>†</sup>：連絡責任者：高瀬公三（鹿児島大学農学部獣医学科 家畜微生物学研究室）

Table 1. No. of samples of feces collected from penguins and isolation-positive no. for *Salmonella* spp.

Penguins	Zoo-A				Aquarium-B		Aquarium-C			
	'02,8 <sup>1)</sup>	'03,2	'03,8	'03,9	'03,5	'03,12	'03,6	'03,8	'03,12	'04,5
<i>S. humboldti</i>	8/16 <sup>2)</sup>	0/10	0/24	0/30	0/24	0/20	0/15	0/15	1/15	0/15
<i>S. magellanicus</i>	NT <sup>3)</sup>				NT		0/5	0/5	0/5	0/5
<i>S. demersus</i>							0/10	0/10	0/10	0/10
<i>A. patagonicus</i>							0/10	0/10	0/10	0/10
<i>P. papua</i>							0/10	0/10	0/10	0/10
Total	8/80				0/44		1/200			

1) Year and month when samples were collected

2) *Salmonella* spp. positive/Tested

3) Not tested

Photo 1. Penguins (*Spheniscus humboldti*) in zoo-A

した。A動物園ではフンボルトペンギン (*Spheniscus humboldti*: 15羽飼育) (Photo 1) から80検体, B水族館でもフンボルトペンギン (17羽飼育) から44検体, またC水族館ではフンボルトペンギン (54羽飼育) の他に, キングペンギン (*Aptenodytes patagonicus*: 20羽飼育), ジェンツーペンギン (*Pygoscelis papua*: 10羽飼育), マゼランペンギン (*Spheniscus magellanicus*: 7羽飼育) およびケープペンギン (*Spheniscus demersus*: 21羽飼育) の5種から合計200検体の糞便が採取された。

## 2. サルモネラの分離・同定

### (1) 分離方法

サルモネラの分離は既報[5]に準じて行った。すなわち, 採取した糞便の0.5~1.0gを, ハーナテラチオン酸塩培地 (栄研) 10mlの入った試験管内に

入れ, 40℃, 24時間増菌し, 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) に接種, 培養した。DHL寒天培地上にできた黒色コロニーを釣菌し, さらにトリプトソイ寒天培地 (栄研) に画線培養, クローニングされた分離菌を得た。クローニング後の菌について, TSI寒天培地 (栄研) でブドウ糖利用, 乳糖および白糖非利用, 硫化水素産生, ガス産生を, SIM確認培地 (ニッスイ) では硫化水素産生, インドール非産生, 運動性を, リジン脱炭酸試験用培地 (栄研) ではリジン脱炭酸性を確認し, これらの性状を示したものをサルモネラの疑われる株とし, OおよびH群型別試験を行った。

### (2) O群型別試験

分離株をトリプトソイ寒天培地 (栄研) で好気性条件のもと, 37℃, 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の生理的食塩液に均一に浮遊させたものをO群型別用の抗原液とした。その抗原液1白金耳をスライドに取り, その横に市販のO多価血清 (デンカ生研) 30 $\mu$ lを滴下し, それらをよく混和後, スライドグラスを前後に傾斜させながら凝集の有無を観察した。O多価血清との凝集反応で陽性と判定された場合, その抗原液はさらにO3, O4, O7, O8, あるいはO9群血清 (いずれもデンカ生研) との反応が実施された。

### (3) H型別試験

O群型別試験で陽性を示した分離株はさらに市販のH群型別用抗血清 (デンカ生研) を使用した。ブイオン培地 (ニッスイ) 2mlに分離株を接種し, 37℃, 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水液を加えて混和し、H型別用抗原液とした。小試験管に抗原液0.3mlを移し、抗血清を2滴加えてよく混和し、50℃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、均一な浮遊のままのものを陰性とした。陽性になった場合には逆相の誘導を行った。すなわち、0.5%寒天加ブイオン培地3mlを小試験管に分注し、陽性となったH型の相誘導用血清を0.1ml添加・混和し、50℃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に固まらせ、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

#### (1) 薬剤の希釈

供試薬剤はTable 2に示す市販の12薬剤(SIGMA)を使用した。これらの薬剤をそれぞれの溶媒で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。この薬剤原液を滅菌精製水により2倍段階希釈し、1,000~1.0  $\mu$ g/mlの希釈列を作成した。

#### (2) MIC測定用寒天平板の調整

各薬剤に対する最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) の測定には、日本化学療法学会標準法に準拠した寒天平板希釈法を用いた。まず、ミューラーヒントン寒天培地(栄研)を溶解、滅菌し52℃に保持した。各滅菌シャーレに調整した薬剤の希釈液1mlを入れ、このシャーレ

に、ミューラーヒントン寒天培地9mlを入れ、薬剤と十分混和した後、固化させた。

#### (3) 接種用菌液の平板接種法

被検菌株のコロニーから一白金耳量を取り、ブイオン培地に摂取し、37℃、20時間培養した。培養後、菌は通常約 $10^8$ 個/ml程度に増殖していることから、希釈用に準備しておいた滅菌リン酸塩緩衝液(Phosphate Buffered Saline: PBS)で100倍希釈を行い、接種菌量を約 $10^6$ 個/mlになるように調整した。上記の接種用菌液を、マイクロプランターもしくは白金耳に取り、静かに薬剤含有平板もしくは対照平板にスポットした。平板表面の菌液が完全に乾いた後、シャーレを反転し、37℃、20時間培養し、判定を行った。

#### (4) 判定

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。また、50%の菌株の発育を阻止する薬剤濃度をMIC<sub>50</sub>、90%菌株の発育を阻止する薬剤濃度をMIC<sub>90</sub>とした。

### 4. PCRによる侵入遺伝子*invA*の検索

#### (1) 検査材料

A動物園由来の7株およびC水族館由来の1株、合計8株を用いた。さらに比較材料としてA動物園フンボルトペンギン由来の*Escherichia coli* (*E. coli*) 1株および本研究室において野生ツルから分離した*Salmonella* Typhimuriumの1株[5]を用いた。

#### (2) OligonucleotideプライマーおよびPCR

菌株をTSAに接種し、37℃、24時間培養後、単コロニーを爪楊枝でピックアップし、50  $\mu$ l PCR mixture[1xPCRバッファー(TAKARA), 200  $\mu$ M dNTPs, 0.25  $\mu$ M プライマー, 2.5units *Taq* DNA polymerase (TAKARA), 1.25mM MgCl<sub>2</sub>]に接種した。プライマー(5'-GTG-AAA-TTA-TCG-CCA-CGT-TCG-GGC-AA-3'および5'-TCA-TCG-CAC-CGT-CAA-AGG-AAC-C-3')は*invA*遺伝子の配列に基づいて作成されたもの(北海道システムサイエンス)を用いた。PCR反応は、72℃、7分間でインキュベーションをしたのち、熱変性を94℃、1分間、アニーリングを53℃、2分間、伸張反応を72℃、3分間(35サイクル)行い、最後に72℃、7分間のインキュベーションを行った。

Table 2. Antibiotics and solvents used in sensitivity test

Antibiotics	Abbreviation	Solvents	Conc.
Ampicillin	ABPC	distilled water (DW)	1mg
Gentamicin	GM	ditto	1mg
Kanamycin	KM	ditto	1mg
Oxytetracycline	OTC	ditto	1mg
Oxolic acid	OA	a little NaOH + DW	1mg
Nalidixic acid	NA	ditto	1mg
Norfloxacin	NRFX	ditto	1mg
Chloramphenicol	CP	a little ethanol + PBS	1mg
Dihydrostreptomycin	DSM	PBS	1mg
Colistin	CL	DW	1mg
Cephazolin	CEZ	a little acetone + PBS	1mg
Phosphomycin	PM	DW	1mg

## (3) ゲルの作成と電気泳動

アガロース (ナカライデスク) 0.45gをTAE溶液 30mlに溶解し, 70℃以下まで冷却, 1.5  $\mu$ g/10mlのエチジウムブロマイドを加え, トレーに注ぎゲルを作成した。泳動装置に泳動バッファ (1  $\times$  TAE) と固化したゲルをセットし, 色素液と混ぜたサンプル 5  $\mu$ lをゲルにのせ, 20分間, 電気泳動を行った。泳動終了後のゲルを, UVトランスイルミネーターを用いて観察し, 写真に記録した。

## 結 果

## 1. サルモネラの分離成績

表1に示すように, A動物園において4回にわたり採取されたペンギンの糞便, 合計80例のうち, 8月に採材したフンボルトペンギンの糞便8例からサ

ルモネラが分離され, 血清型別の結果, すべて *Salmonella* Senftenberg (SS) (O:1, 3, 19, H:g,s,t:-) と同定された。B水族館の材料からは分離できなかった。C水族館の12月に採材したフンボルトペンギンの糞便15検体中1検体からサルモネラが分離された。O抗原はO4群であり, H抗原の1相はiであったが, 相誘導による2相菌が得られず, 最終同定は出来なかった (以下この分離株はF38株とする)。

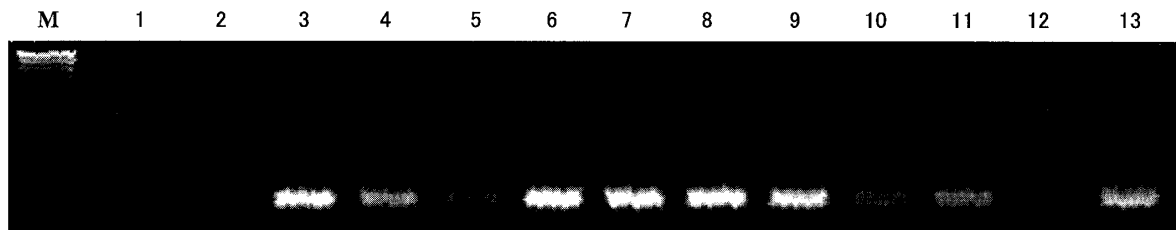
## 2. 分離サルモネラの薬剤感受性試験

A動物園由来SSおよびC動物園由来血清型不明F38株の薬剤感受性試験の結果をTable 3に示した (表中の\*印はF38株)。SSの7株のMIC値はいずれの薬剤に対しても一峰性を示したが, F38のMIC値はSSと異なる感受性を示す薬剤が認められた。

Table 3. Antibiotic sensitivity test against *Salmonella* Senftenberg derived from penguins

Antibiotics	MIC ( $\mu$ g/ml)											MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	
	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	1.95	0.98 < 0.98			
ABPC						2	4	1				1*	15.6	31.3
GM									4	3		1*	3.9	3.9
KM							1	6				1*	7.8	15.6
OTC						7						1*	31.3	31.3
OA								1*	7				3.9	3.9
NA					1*	7							31.3	31.3
NRFX									4	3*	1		3.9	3.9
CP			3	2	1	1						1*	125	250
DSM				1*	7								62.5	62.5
CL								7	1*				7.8	7.8
CEZ					1	5	1					1*	31.3	62.5
PM			3	5*									62.5	125

Figure shows the No. of strains. The figure with mark (\*) contains a strain of serotype-unknown *Salmonella* sp.

Photo 2. Detection of *invA* gene by PCR

M: Marker ( $\lambda$ -HindIII)

1, 2: Negative control (Mock and tooth-stick)

3-9: *Salmonella* Senftenberg isolated in zoo-A

10, 11: *Salmonella* sp. isolated in aquarium-C

12: *Escherichia coli*

13: *Salmonella* Typhimurium

### 3. サルモネラ分離菌株の遺伝子*invA*検索

PCRの結果を図3に示した。レーン1はネガティブコントロール、レーン2はネガティブコントロールとして菌を接種せずに爪楊枝のみをPCR mixtureに付けたもの、レーン3~9はA動物園由来SS、レーン10~11はC水族館由来未血清型別F38株、レーン12は*Escherichia coli*(陰性対象)、レーン13は*Salmonella* Typhimurium (S.T;陽性対象)を示している。SS(レーン3~9)およびF38株(レーン10~11)のいずれもS.T同様に*invA*遺伝子と思われる増幅産物が検出された。

## 考 察

SSは家禽、飼料、環境などから広く分離される血清型である。食中毒例の他に人の火傷から分離[8]されてはいるが、その起病性は他の血清型に比べ高くないようである。ペンギンから*S. Havana*, *S. Typhimurium*, および*S. Enteritidis*が分離されており[9, 10], SSのペンギンからの分離例は初めてと思われる。

A動物園のフンボルトペンギンの糞便から分離されたSSは、継続して分離を試みたにも関わらず、それ以降は分離することができなかった。今回の感染は一過性であったと考えられる。しかしながら、サルモネラは排菌されなくなった後も潜伏感染し、ストレスなどにより再度排菌するようになることが鶏などで知られており[6], 今回のペンギンの場合も今後排菌される可能性は否定できない。なお、検体数は少量であったが、ペンギン舎の水およびペンギンの飼料となっていた魚(アジ, キビナゴ)からのサルモネラ分離を試みたが菌は分離されず(未報告), SSの侵入経路を特定することは出来なかった。

C水族館のペンギンの糞便から分離されたサルモネラは1株(F38株)であったが血清型を同定できなかった。本事例についても、侵入経路については明らかには出来なかった。

A動物園由来分離SS株は全ての薬剤で一峰性を示した。農林水産省 動物医薬品検査所が発表したH14年のサルモネラの薬剤感受性試験の結果では、クロラムフェニコールに対するサルモネラのブレイクポイントは $32 \mu\text{g/ml}$ であった[1]。今回の分離株は、全てその値より高い値を示したことから、クロラムフェニコールに対して耐性を獲得していることが疑われた。他の薬剤に関しては、ブレイクポイン

トより高い値を示したものもあったが、ごく近い値であり、耐性を獲得しているとは考えにくかった。また、C水族館由来の未血清型別F38株もブレイクポイントより高い値を示す薬剤はあったものの、ごく近い値であること、および検体数が1株であったことから、耐性を獲得しているとは断定できなかった。

*invA*遺伝子は、細胞内侵入に関与するサルモネラ特有の遺伝子であり、菌の病原性に関係していると考えられている[2, 3, 12]。SSおよび*Salmonella* Litchfieldの一部においては、*invA*遺伝子の欠損している株が環境から分離されており、それらの株は培養細胞へ侵入することが出来ず、病原性は低いようである[4]。しかし、著者らが分離したSSは*invA*遺伝子の検索を行ったところ、全株が*invA*を保有していることがわかった。これらの分離株の病原性については今後の検討が必要である。

謝辞：分離されたサルモネラ血清型別にご協力いただいた、独立行政法人動物衛生研究所 中澤宗生博士、および採材を許可していただいた動物園および水族館の関係各位に深謝する。

## 引用文献

- [1] 動物医薬品検査所, 肥飼料検査所: 平成15年度家畜由来細菌の抗菌性物質感受性実態調査. 家畜衛生週報, No.2819, 282-286 (2004)
- [2] Fidelma Boyd, E., Jia Li, Ochman, H., Selander, R.K.: Comparative genetics of the *inv-spa* invasion gene complex of *Salmonella enterica*. J. Bacteriol., 179, 1985-1991 (1997)
- [3] Ginocchio, C.C., Galan, J.E.: Functional conservation among members of the *Salmonella* Typhimurium *InvA* family of proteins. Infec. Imm., 63, 729-732 (1995)
- [4] Ginocchio, C.C., Rahn, K., Clarke, R.C., Galan, J.E.: Naturally occurring deletions in the centisome 63 pathogenicity isolates of *Salmonella* spp. Infec. Imm., 65, 1267-1272 (1997)
- [5] 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. 日本獣医師会誌, 58, 411-414 (2005)
- [6] Holt, P.S., R.E. Porter, Jr.: Effect of induced molting on the course of infection and transmission of *Salmonella* Enteritidis in white leghorn hens of different ages. Poult. Sci., 71, 1842-1848 (1992)
- [7] Maeda, Y., Tohya, Y., Nakagawa, Y., Yamashita, M., Sugimura, T.: An occurrence of *Salmonella* infection in cranes at the Izumi plains, Japan. J. Vet. Med. Sci., 63, 943-

- 944 (2001)
- [8] Nair, D., Gupta, N., Kabra, S., Ahuja, Rajeev B., Prakash, S.K.: *Salmonella* Senftenberg: a new pathogen in the burns ward. *Burns*, 25, 723-727 (1999)
- [9] Oelke, H., Steiniger, F.: *Salmonella* in Adelie penguins (*Pygoscelis adeliae*) and South Polar Skuas (*Catharacta maccormicki*) on Ross island, Antarctica. *Avian Dis.*, 17, 568-73 (1973)
- [10] Olsen, B., Bergstrom, S., McCafferty, D.T., Sellin, M., Wistrom, G.: *Salmonella* Enteritidis in Antarctica: zoonosis in man or humanosis in penguins? *Lancet*, 348 (9037), 1319-1320 (1996)
- [11] Palmgren, H., McCafferty, D., Aspan, A., Broman, T., Sellin, M., Wollin, R., Bergstrom, S., Olsen, B.: *Salmonella* in sub-Antarctica: low heterogeneity in *Salmonella* serotypes in South Georgia seals and birds. *Epidemiol. Infect.*, 125, 257-262 (2000)
- [12] Rahn, K., De Grandis, S.A., Clarke, R.C., McEwen, S.A., Galan, J.E., Ginocchio, C., Curtiss III, R., Gyies, C.L.: Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell Probe*, 6, 271-279 (1992)

---

## Isolation of *Salmonella* spp. from the Feces of Housed Penguins

Aki IWASHITA, Satoshi TAHARAGUCHI and Kozo TAKASE<sup>†</sup>

(Laboratory of Veterinary Microbiology, Department of Veterinary Medicine ,  
Faculty of Agriculture, Kagoshima University)

### Summary

Fecal samples were collected from housed penguins reared in zoo-A and aquarium-B, -C in 2002-2004, for isolation of *Salmonella* spp. As a result, *Salmonella* Senftenberg (O:1,3,19, H:g,s,t:-) was isolated from 8/16 (50%) samples of 1<sup>st</sup> collection from zoo-A. *Salmonella* sp. (sero-type unknown) was isolated from 1/15(6.7%) samples of 3<sup>rd</sup> collection from aquarium-C. All isolates of *S. Senftenberg* were resistant to chloramphenicol. By PCR, *invA* gene was detected from all isolates.

**Key words :** antibiotic sensitivity, *invA*, penguin, *Salmonella*

<sup>†</sup>: Correspondence to : Kozo TAKASE (Laboratory of Veterinary Microbiology)