

次世代シーケンサを用いた海棲哺乳類の飼育水中細菌叢の基礎的群集解析

若松小百合¹⁾, 中村美里¹⁾, 松代真琳¹⁾, 角川雅俊²⁾, 嶋本良則³⁾, 遠藤大二⁴⁾, 郡山尚紀^{1)*}

1) 酪農学園大学獣医学群獣医保健看護学類動物行動生態研究室 〒069-8501 北海道江別市文京台緑町 582

2) おたる水族館 〒047-0047 北海道小樽市祝津 3-303

3) 酪農学園大学獣医学群獣医保健看護学類動物疾病治療研究室 〒069-8501 北海道江別市文京台緑町 582

4) 酪農学園大学獣医学群獣医学類獣医放射線学ユニット 〒069-8501 北海道江別市文京台緑町 582

(2019年12月4日受領, 2020年3月2日採択)

要約

海棲哺乳類の排泄物は海洋環境において重要な栄養源となっているが、飼育下の海棲哺乳類はその水質によって健康を損なう可能性がある。本研究ではその水質に着目し、細菌の群集解析を行うことで、それぞれの動物種の飼育水の細菌学的特徴を明らかにすると共に感染症を引き起こす原因菌のスクリーニングを行うことを目的とした。おたる水族館で飼育されている鰭脚類と鯨類を含む計10の飼育水と元の海水について次世代シーケンサにて細菌の塩基配列を調べ、細菌の群集解析を行った。その結果、飼育水の特徴としては、Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutesが元海水と共通して見られたが、Fusobacteria および OD1・GNO2 といった培養不能細菌門は飼育水に特徴的であった。各動物の飼育水細菌叢は鯨類や鰭脚類においてそれぞれ特徴的であったが、鰭脚類においてワモンアザラシは他との類似性が低かった。飼育水には環境中に存在する日和見菌がわずかに見つかったが、伝染性細菌やその他公衆衛生上特に注意すべき細菌は認められなかった。今後、他の水族館の飼育水についても調べることで、より理想的な海棲哺乳類の飼育環境づくりに繋がることを期待される。

キーワード：海棲哺乳類, 細菌群集解析, 飼育水, 次世代シーケンサ, 水族館

— 日本野生動物医学学会誌 25(2) : 71-80, 2020

序論

近年、次世代シーケンサを用いた研究が様々な分野で行われており、特にヒトの常在菌と疾患の関係性について盛んに調べられている [1]。その中で食性の違いは腸内フローラに影響を与えるため、国や人種によって腸内細菌叢が大きく異なることもわかっている。野生動物についても同様に腸内細菌叢と食性の関係について調べられている [2, 3, 4]。また、近年の研究から海棲哺乳類の糞に含まれる細菌は栄養成分を内部に蓄積し、海洋環境中に放出することで植物性プランクトンなどの重要な栄養源となると考えられている [5, 6]。しかしながら海水中には培養不能菌や難培養菌が含まれており、培養せずに菌を同定できる次世代シーケンサを用いた手法は細菌叢を把握する上で有用である [7]。

海棲哺乳類は、主にアシカやアザラシのように陸上で休息をとることができる鰭脚類と、クジラやイルカに代表される上陸しない鯨類に分かれる。Bikら [8] の報告によれば、野生ハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) および野生あるいは再放獣

したカリフォルニアアシカ (*Zalophus californianus*) において、その口腔内、消化管内、噴気孔および噴気 (イルカのみ) と直腸の細菌叢はそれぞれ異なる組成を持つことがわかっている。また、このハンドウイルカとカリフォルニアアシカは魚食性であるが、それぞれの消化管における細菌叢は異なっており、食性以外にも動物種の違いや生活環境要因も腸内環境に影響を与えることがわかっている [8]。

飼育下の海棲哺乳類はその行動範囲が極端に制限されているため、自身や他の動物が排泄した糞尿に暴露される頻度は野生の個体に比べて高くなる。飼育水の清浄度は海棲哺乳類の健康状態に影響を与えるため、水族館では過装置の設置や塩素の添加が行われている。しかし、こういった対策は各水族館に任せられており、動物たちの飼育環境は異なる。特に、海棲哺乳類の中でも鰭脚類は眼球が大きく突出しているため、野生・飼育下個体問わず外傷部位からの感染による眼科疾患を顕著に発症することが分かっている [7, 9, 10, 11]。海棲哺乳類における細菌感染による眼科疾患はその原因菌が特定されておらず、その対策が難しい。近年、次世代シーケンサを用いた網羅的な病原体の検出ができるようになり、その原因菌を一挙に調べ上げることが可能となってきた。そこで、本研究ではこの手法

* 責任著者：郡山尚紀 (E-mail: kooriyam@rakuno.ac.jp)

表 1 8種の海棲哺乳類の10カ所の飼育水の詳細

飼育プール	飼育動物	頭数	ろ過装置 ¹⁾	塩素添加量 (リットル)	プール 容積 ²⁾	餌の種類 ³⁾
ネズミP	ネズミイルカ	4	有	5	327.91	ホ, イ, サ
ハンドウP	ハンドウイルカ	5	有	10	592	ホ, イ, ニ, サ
アゴヒゲP	アゴヒゲアザラシ	4	有	無	85.5	ホ, イ, ニ, サ
	ゴマフアザラシ	2				
	ゼニガタアザラシ	1				
ワモンP	ワモンアザラシ	2	有	0.35	11.23	イ
セイウチP	セイウチ	3	有	5	247.5	ホ, イ, ニ, サ, ス
トドP	トド	8	無	無	414	ホ, イ, ニ, サ, ス, カ
ゴマフP	ゴマフアザラシ	4	有	2	79.2	ホ, イ, ニ, サ, ス
獣舎①	ゴマフアザラシ	1	無	無	0.83	ホ, イ
獣舎②	ゴマフアザラシ /	3	無	無	22.18	ホ, イ, ニ, サ
	ゼニガタアザラシ					
越冬P	ゴマフアザラシ	12	無	無	276	ホ, イ, ニ, サ, ス

¹⁾ 有：開放式強制ろ過，無：海水掛け流し ²⁾ 立方メートル

³⁾ ホ：ホッケ，イ：イカナゴ，ニ：ニシン，ス：スケトウダラ，カ：カレイ，サ：サケ
飼育プール略は以下の通りである。

ネズミP：ネズミイルカプール，ハンドウP：ハンドウイルカプール，アゴヒゲP：アゴヒゲアザラシプール，ワモンP：ワモンアザラシプール，セイウチP：セイウチプール，トドP：トドプール，ゴマフP：ゴマフアザラシショープール，獣舎①：獣舎①プール，獣舎②：獣舎②プール，越冬P：ゴマフアザラシ越冬プール

を用いて海棲哺乳類の飼育水中に含まれる細菌の群集解析を行い細菌叢の特徴を明らかにするとともに、動物に眼科疾患のような健康被害を与える菌の検出に有用か検討した。

材料と方法

海棲哺乳類と飼育水

本研究では、2018年1月22日おたる水族館で飼育されている鰐脚類3科のうち、アシカ科のトド (*Steller sea lions/ Eumetopias jubatus*)、アザラシ科のゴマフアザラシ (*Spotted seals/ Phoca largha*)・ゼニガタアザラシ (*Harbor seals/ Phoca vitulina*)・アゴヒゲアザラシ (*Bearded seals/ Erignathus barbatus*)・ワモンアザラシ (*Ringed seals/ Phoca hispida*)、セイウチ科のセイウチ (*Walrus/ Odobenus rosmarus*)に加え、鯨類のネズミイルカ (*Harbor porpoise/ Phocoena phocoena*)とハンドウイルカ (*Bottlenose dolphins/ Tursiops truncatus*)の8種が飼育されている計10のプールの飼育水を調べた(表1)。また、全ての飼育水の元になっているおたる水族館沿岸の海水(元海水)についても調べた。各飼育水の表層から1リットル採水し、元海水は取水口からパイプに取り込まれたものを同量用いた。各飼育プールは、屋外もしくは屋内、ろ過槽の有無および塩素添加の有無が異なる。さらに、プール容積と飼育頭数も異なっており、加えてプールの飼育水がいくつかの動物と共通している場合もある。また、与えられる餌(魚種)の種

類が異なる。

細菌の回収と総DNAの抽出

採水した水は、一旦氷冷し、採取後2時間以内に孔径0.2μm直径75mmのニトロセルロースフィルター(Thermo Fisher Scientific社, USA)でろ過した。フィルターは酪農学園大学の実験室に到着するまで同じく氷冷状態で持ち帰り(約2時間)、すぐに-80℃で保存した。後日、飼育水中の細菌をトラップしたフィルターを滅菌されたメスの刃を使って2~3mmに裁断し、DNA抽出キットZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (ZYMO Research社, USA)を用いてプロトコールに従いDNA抽出を行った。抽出したDNAは1.5%アガロースゲル電気泳動で濃度を測定した後、DNase/RNase除去済み水で希釈し5ng/μlに調整した。

16S rRNAの次世代シーケンサ解析と細菌群集解析

細菌16S rRNA遺伝子のV3およびV4領域をターゲットとし、得られたDNAをPCRで増幅するとともに、シーケンサプライマー配列およびアダプターとインデックス配列(Index)を2度のPCRで付加した。最初のPCRはAmplicon PCR Forward PrimerとReverse Primerの2つのプライマーを用いて行った。PCR反応液は、1サンプルあたりPrimeSTAR Max Premix (Takara Bio. Inc, Japan)を12.5μl、2種類のプライ

表2 海棲哺乳類において公衆衛生に関わる細菌と病原性細菌

細菌属名または細菌種名	公衆衛生上重要な感染症	疾患部位または疾患名	飼育水 ¹⁾
<i>Actinomyces</i> spp.	放線菌症	—	ア, ワ, 獣①, 越
<i>Clostridium perfringens</i>	ウェルシュ菌感染症	消化器系	全て
<i>Corynebacterium</i> spp.	—	敗血症, 皮膚病	ハ, ワ, セ, ト, ゴ, 獣①, 獣②, 越
<i>Helicobacter</i> spp.	—	消化器	ト, ゴ, 獣①
<i>Moraxella</i> spp.	—	皮膚病	獣①
<i>Mycobacterium</i> spp.	抗酸菌症	抗酸菌症	ネ, ハ, ワ, セ, ト, ゴ, 獣①, 越
<i>Mycoplasma</i> spp.	マイコプラズマ感染症	—	獣①, 越
<i>Neisseria</i> spp.	敗血症	—	越
<i>Pasteurella</i> spp.	—	敗血症	獣①
<i>Plesiomonas</i> spp.	—	消化器	ネ, ハ, ア, ワ, ト, ゴ, 獣①, 獣②, 越
<i>Proteus</i> spp.	プロテウス感染症	—	ハ
<i>Burkholderia</i> spp.	シュードモナス感染症	敗血症, 皮膚病	ハ, ワ, セ, ゴ, 獣①, 越
<i>Rhodococcus</i> spp.	—	皮膚病	ワ, ト, 獣①
<i>Staphylococcus</i> spp., <i>S. aureus</i>	黄色ブドウ球菌感染症	敗血症, 呼吸器, 皮膚病	ネ, ハ, ワ, セ, ゴ, 獣①, 越
<i>Streptococcus</i>	—	敗血症, 泌尿器系	ハ, ア, セ, ト, ゴ, 獣①, 越
<i>Vibrio</i> spp.	ビブリオ症	—	ハ, ア, ト, 獣①, 越

—: CRC Handbook に掲載がない。

(CRC Handbook of Marine Mammal Medicine を参照 [12, 13])

¹⁾ ネ:ネズミ P, ハ:ハンドウ P, ア:アゴヒゲ P, ワ:ワモン P, ゴ:ゴマフ P, セ:セイウチ P, ト:トド P, 獣①:獣舎①, 獣②:獣舎②, 越:越冬 P

マーを 5µl ずつ, さらに 5ng/µl に調整した DNA を 2.5µl 混合して最終的に 25µl に調整した。反応液を T100 サーマルサイクラー (Bio-Rad 社, USA) にセットし, 95°C 3 分を 1 サイクル, 95°C 30 秒の熱変性反応 / 55°C 30 秒のアニーリング / 72°C 30 秒の伸長反応を 25 サイクル, 72°C 5 分 1 サイクルの工程で PCR を行った。この PCR 産物を DNA Clean & Concentrator (ZymoResearch, USA) で精製し, さらに Nextera XT Index Primer を用いて同条件で 8 サイクル PCR を行った。精製した PCR 産物は濃度を測定し, これ以降の分析は北海道システムサイエンス (北海道) に依頼した。以降の手順を簡単に説明すると, まず次世代シーケンサ (MiSeq: illumine, USA) にて得られた 16S rRNA の 300 塩基 / リードで配列を約 30 万リードペア取得した。次に, FASTQ 形式の Raw リードデータを対象に, アダプター配列や低 QV 領域のトリミング, およびリードペアの連結を行った。その後, 微生物群集解析用プログラム「QIIME」を使用し, 得られた各 OTU (operational taxonomic unit) の代表配列について, 16S rRNA 配列に基づく微生物群集解析を行った。

各飼育水の細菌門・細菌綱の特徴の比較

まず, 細菌群集解析の結果から明らかになった全飼育水および元海水の細菌門および細菌綱について全体像を可視化するために棒グラフで示した。また, 各飼育水の細菌叢の類似性に

ついて分析するために, 細菌門および細菌綱について, 統計ソフト R ver. 3.5.3 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) にて Bray-Curtis 指数を用いた非軽量多次元尺度 (NMDS) の作図を行った。統計処理は Mantel Test (統計ソフト R) を行い, $p < 0.05$ で統計学的有意差ありとした。また, 特に同じ種類の動物 (ゴマフアザラシ) が飼育されている 2 つのプール (ゴマフ P と越冬 P) についてその細菌門と細菌綱の種類を詳細に比較した。この 2 つのプールでは餌の種類および 1 頭あたりの飼育水量が近かったため比較を行なったが, 他の動物種については, 条件を合わせる事が難しかったため行わなかった。

飼育水中に含まれる病原性細菌の探索

次世代シーケンサにより検出された細菌のうち, 眼科疾患やその他の感染症を引き起こす可能性のある細菌と公衆衛生上重要な細菌が含まれていないか確認を行った。細菌群集解析結果から明らかになった細菌の属名あるいは種名について, CRC Handbook of Marine Mammals [12, 13] に掲載されている病原菌名と照らし合わせ探索した (表 2)。また, 海棲哺乳類における眼科疾患の原因菌についてはよくわかっていないため, 人や動物において眼科疾患を引き起こす原因菌を参考にし, 表 3 にまとめた (標準微生物学 [14], メルクマニュアル [15], およびメルク獣医マニュアル [16])。

表3 人と動物の眼科疾患原因菌

菌名	疾患名	飼育水 ¹⁾
<i>Acholeplasma</i> spp.	角結膜炎	ア, ゴ, 獣②, 越
<i>Actinomyces</i> spp.	涙小管炎	ア, ワ, 獣①, 越
<i>Bacteroides</i> spp.	眼窩隔膜前蜂窩織炎, 眼窩蜂窩織炎	ネ, ア, ワ, セ, ト, ゴ, 獣①, 獣②, 越
<i>Haemophilus</i> spp.	角膜炎, 急性細菌性結膜炎	ハ, ゴ, 獣①
<i>Moraxella</i> spp.	角結膜炎	獣①
<i>Mycoplasma</i> spp.	角結膜炎	ネ, 獣①, 越
<i>Neisseria</i> spp.	急性細菌性結膜炎	越
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	眼窩隔膜前蜂窩織炎, 眼窩蜂窩織炎	ア, セ, 獣①, 獣②, 越
<i>Pseudomonas</i> spp.	角膜炎	ハ, ワ, セ, ゴ, 獣①, 越
<i>Serratia marcescens</i>	角膜炎	ハ
<i>Streptococcus</i> spp.	角膜炎, 眼瞼炎, 急性細菌性結膜炎, 涙嚢炎	ハ, ア, セ, ト, ゴ, 獣①, 越
<i>Staphylococcus aureus</i>	角膜炎, 急性細菌性結膜炎, 涙嚢炎	ネ, ハ, ワ, セ, ゴ, 獣①, 越
<i>Treponema</i> spp.	角膜炎	ア, ゴ, 獣①, 越

(標準微生物学 [14], メルクマニュアル [15], メルク獣医マニュアル [16] を参照)

¹⁾ ネ: ネズミ P, ハ: ハンドウ P, ア: アゴヒゲ P, ワ: ワモン P, ゴ: ゴマフ P, セ: セイウチ P, ト: トド P, 獣①: 獣舎①, 獣②: 獣舎②, 越: 越冬 P

結果

各飼育水に含まれる細菌の門レベルの特徴

全プールの飼育水および元海水の細菌叢には、いろいろな細菌門が認められ、その割合は飼育水によって異なっていた (図1)。元海水および鯨類の飼育水においては、Proteobacteria と Bacteroidetes が主要な細菌門であった。元海水ではその他に Planctomycetes (5.7%), Cyanobacteria (5.2%) や Verrucomicrobia (3.0%) などが含まれており、後述の鰭脚類の飼育水で多く見られた、Firmicutes (2.6%) や Fusobacteria (0.8%) は少なかった。ネズミイルカプール (以下、ネズミ P) では、2つの主要な細菌門以外に培養不能菌の OD1 (3.1%) などが見られたが、Fusobacteria (4.2%) や Firmicutes (0.3%) は少なかった。ハンドウイルカプール (以下、ハンドウ P) でも、主要な2つの細菌門の他に Planctomycetes (7.9%), 培養不能菌の OD1 (7.2%) や TM7 (3.0%) などが見られたが、やはり Firmicutes (0.7%) や Fusobacteria (0.7%) はわずかな量であった。次に、鰭脚類の飼育水は Proteobacteria と Bacteroidetes に加え、Firmicutes と Fusobacteria の4つの主要な細菌門で構成されていた。アゴヒゲアザラシプール (アゴヒゲ P) では、4つの主要な細菌門で約8割を占めていた。ワモンアザラシプール (以下、ワモン P) では、Proteobacteria および Bacteroidetes で約6割を占めていたが、Fusobacteria (3.0%) と Firmicutes (2.5%) は少なかった。また、その他には培養不能菌の GN02 (5.3%) や OD1 (5.2%) に加えて、Planctomycetes (3.3%) や Actinobacteria (2.3%) が小さな割

合で含まれていた。セイウチプール (以下、セイウチ P)、トドプール (トド P)、ゴマファザラシヨープール (以下、ゴマフ P)、獣舎①プール (以下、獣舎①)、獣舎②プール (以下、獣舎②) およびゴマファザラシ越冬プール (以下、越冬 P) では、主要な細菌門が約9割を占めていた。獣舎②においては、Verrucomicrobia (6.3%) が他のプールに比べて最も多く含まれていた。越冬 P では、Actinobacteria (4.1%) が他のプールに比べて多く見られた。

各飼育水に含まれる細菌の綱レベルの特徴

次に、主要な細菌門に含まれる細菌綱の特徴を示す (図2)。元海水においては、Proteobacteria 門の Gammaproteobacteria および Alphaproteobacteria に加えて、Bacteroidetes 門の Flavobacteriia が3つの主要な細菌綱であった。その他、Planctomycetes 門の Planctomycetia (4.3%), Cyanobacteria 門の Chloroplast (2.6%), Proteobacteria 門の Deltaproteobacteria (2.6%), Cyanobacteria 門の Synechococcophycideae (2.5%) などが見られた。鯨類のネズミ P においては、Alphaproteobacteria (1.9%) はあまり含まれておらず、Gammaproteobacteria と Flavobacteriia が主要な細菌綱であり、加えて Fusobacteria 門の Fusobacteriia (4.2%) と培養不能菌の OD1 門の ZB2 (2.9%) が次に多く見られた。同じ鯨類のハンドウ P では、元海水と同様に3つの主要な細菌綱で占められており、加えて Planctomycetia (5.7%), Deltaproteobacteria (5%) および ZB2 (7%) が多く見られた。また、この Deltaproteobacteria は飼育水全般に含まれてはいる

もののその量は少なく、ワモンP (8%) およびゴマフP (3.5%) 以外はほとんど含まれていなかった。次に、鰭脚類においては、元海水の3つの主要な細菌綱に加えて、Firmicutes 門の Clostridia, Bacteroidetes 門の Bacteroidia および Fusobacteria 門の Fusobacteriia がこれに加わり、合計6つの細菌綱が多く占めていた。アゴヒゲPでは、主要な6つの細菌綱で約9割を占めていた。ワモンPでは他の鰭脚類プールに比べて、Clostridia (2.4%), Bacteroidia (2.1%) および Fusobacteriia (3%) が少なく、培養不能菌の ZB2 (5%) や同じく GN02 門の GKS2-174 (3.6%) が多く見られた。GKS2-174 はネズミP (1.1%) においてもわずかに見られている。セイウチPでは、Gammaproteobacteria (5.5%), Alphaproteobacteria (2.5%) および Flavobacteriia (2.1%) が他に比べて少なく、Clostridia, Bacteroidia および Fusobacteriia が主要な細菌綱であった。また、Betaproteobacteria (3.0%) が他のプールに比べて多く含まれており、ワモンP (1.5%) はその次に多く見られた。トドPでは、Alphaproteobacteria (4.1%) と Flavobacteriia (5.5%) が他のプールに比べてやや少ないが、他の4つの主要な細菌綱で約8割を占めていた。また、Proteobacteria 門の Epsilonproteobacteria (5.5%) が他のプールよりも多く見られたが、他の飼育水ではアゴヒゲP (2.7%) とゴマフP (3.5%) 以外はほとんど含まれていなかった。ゴマフP、獣舎①、獣舎②および越冬Pでは、主要な6つの細菌綱で8割以上を占めていた。獣舎①では、Erysipelotrichi (2.9%) が他よりもやや多く見られた。この Erysipelotrichi は鯨類プールでは見られず、鰭脚類の飼育水では1~3%みられているが、特にワモンP (0.1%) は最も少なかった。獣舎②において Verrucomicrobiae (6.3%) が他よりも多く見られた。越冬Pにおいては Actinobacteria (2.2%) と Bacilli (4.2%) が他よりも多く見られた。

飼育プール間の細菌叢の比較

図3および図4に示すように元海水および飼育水の細菌群集(細菌門および細菌綱)の類似度を二次元の距離で表示した。アザラシ科の飼育水の中で、ワモンPは他のアザラシ科の動物の飼育水から一番距離が遠く類似性は低かった。図3に示すように細菌門においてはアゴヒゲPと獣舎②が特に類似していたが、図4の細菌綱レベルでは獣舎①と越冬Pも距離が近く類似していた。セイウチPはワモンPおよびイルカ2種のプールとも類似性が非常に低かった。また、ハンドウPとワモンPは類似性が低かったが、他のアザラシプールとの類似性も低かった。今回 Mantel test においていずれも有意差は認められなかった。

ゴマフアザラシを飼育する2つのプールにおいて、ゴマフP

と越冬Pにはそれぞれ4頭と12頭のゴマフアザラシが飼育されている。さらにその飼育水の量も79.2立方メートル(m³)に対して276m³となり、1頭あたりの水量は19.8m³に対して23m³と近い(表1)。異なる点は、ろ過装置の設置と塩素添加がゴマフPのみ行われている点である(表1)。この状況において、越冬Pでは、Firmicutes 門がゴマフPの12%に対して27.9%と多かったが、その中の細菌綱は Clostridia 綱が多く(ゴマフPの9.8%に対して21.9%)、さらに Bacilli 綱(ゴマフPの0.1%に対して)も4.2%と割合が多かった。また、Planctomycetes 門がゴマフPに1.9%見られたが越冬Pには0.2%とほとんど見られなかった。Proteobacteria 門はゴマフP(46.5%)に対して越冬P(36.1%)がやや少なかった。しかし、細菌綱に着目すると越冬Pでは Alphaproteobacteria 綱が12.3%、Epsilonproteobacteria 綱が0.7%であったのに対し、ゴマフPでは Alphaproteobacteria 綱が19.2%で Epsilonproteobacteria 綱が5.5%とゴマフPの方がこの二つの細菌綱において大きかった。

公衆衛生上重要な細菌およびその他の病原性細菌(表2, 3)

公衆衛生上注意すべき細菌と眼科疾患以外の病原性細菌について、CRC Handbook of Marine Mammal Medicine [12, 13] に掲載されている細菌を参考に検索を行った。表2に示すように、公衆衛生および感染症としても重要な細菌種の中で、ウェルシュ菌である *Clostridium perfringens* と、眼科疾患にも関係する黄色ブドウ球菌である *Staphylococcus aureus* が全てのプールの飼育水から確認された。しかし、これらの菌は土壌中、水中などに存在する日和見菌でありその検出割合も非常に低値であった。それ以外に公衆衛生上および海棲哺乳類の感染症として重要な細菌種は確認されなかった。次に、表3に示すように、人の眼科疾患原因細菌種の中で *S. aureus* が色々な飼育水から確認され、さらに *Serratia marcescens* はハンドウイルカの飼育水から確認されたが、いずれの菌もごく微量であった。細菌属の分類で見ると、環境常在菌である *Bacteroides* 属および *Peptostreptococcus* 属が含まれていることがわかった。動物の眼科疾患原因菌の中で、*Mycoplasma* 属の細菌がいくつかの飼育水から検出されたが、これもごく微量であった(表3)。また、*Moraxella* 属や *Acholeplasma* 属もいくつかの飼育水中から見つかったが、病原性のある細菌種は検出されなかった。

考 察

本研究では、海棲哺乳類の飼育水中の細菌の群集解析を行うことで、飼育プール間では飼育水の細菌学的特徴が異なることを明らかにし、その中には感染症を引き起こす病原体は含まれ

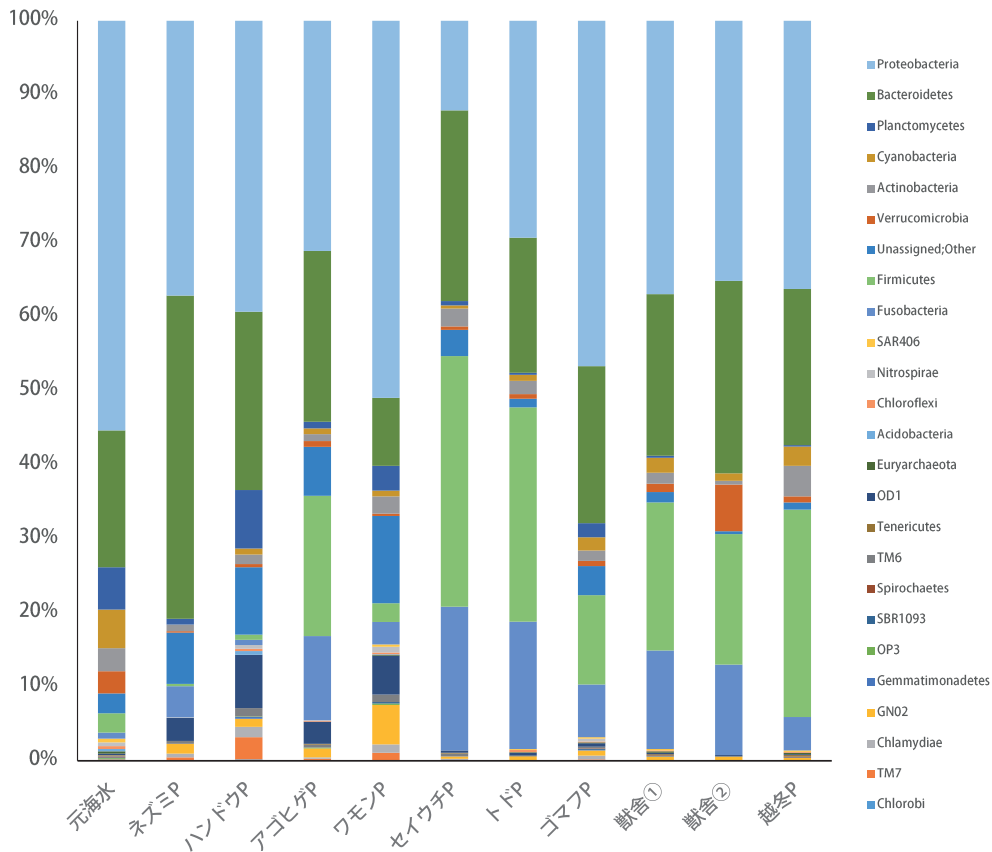


図1 各飼育水と元海水中の細菌門百分率

各プールの飼育水中および元海水に含まれていた細菌叢の全細菌門を百分率で示した。Proteobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria, Firmicutesが主要な細菌門であった。Proteobacteria, BacteroidetesはセイウチP以外の全ての飼育水で半数の割合を示した。

ていないことを確認した。

各飼育水の細菌叢の特性

飼育水中に含まれる細菌の特性は元海水に加え、動物の排泄物や呼吸器からの放出物質の影響を受ける。Bikら [8]によれば、培養不能菌であるGN02門、OD1門はハンドウイルカの噴気や噴気孔から特定されており、その細菌がハンドウPに混入したと考えられるが、ワモンPから検出されたものについては、彼らの呼吸器にこれらの菌が常在していたことが原因かを検証する必要がある。Actinobacteria門は放線菌と呼ばれ、自然界および人や動物の口腔内や腸管に存在している。Actinobacteria門はハンドウイルカやカリフォルニアアシカの口腔内から見つかるだけでなく、それらが生息する海水中で高い割合で確認されている [8]。動物たちの呼吸器内に存在する細菌群は呼吸する際に出される噴気に紛れて飼育水の水面に放出されていると考えられる。

アシカなどの肉食性のほとんどの鰭脚類の遠位腸管内ではBacteroidetes, FusobacteriaやFirmicutesが主要構成細菌門となっている [8]。Laveryら [5]の報告によればオーストラリアアシカ糞便中のFirmicutes門はClostridia綱が主であったが、本研究の鰭脚類においてもClostridia綱が主であり類似していた。また、同糞便中のProteobacteria門ではGammaproteobacteria綱とAlphaproteobacteria綱が優勢であったと述べており、本研究のアシカ科最大の種であるトドPにおいてもProteobacteria門のこの二つの細菌綱が優勢であったことから、腸内細菌叢の特徴が同じアシカ科で類似していると考えられた [5]。

Bikら [8]の報告によれば、ハンドウイルカの直腸内にはBacteroidetes門がほとんど含まれておらず、さらにProteobacteria門、Fusobacteria門およびFirmicutes門の存在の割合が個体によってまちまちであることが示されている。ネズミイルカおよびハンドウイルカの飼育水はともに元海水と同

水族館飼育プールの細菌群集解析

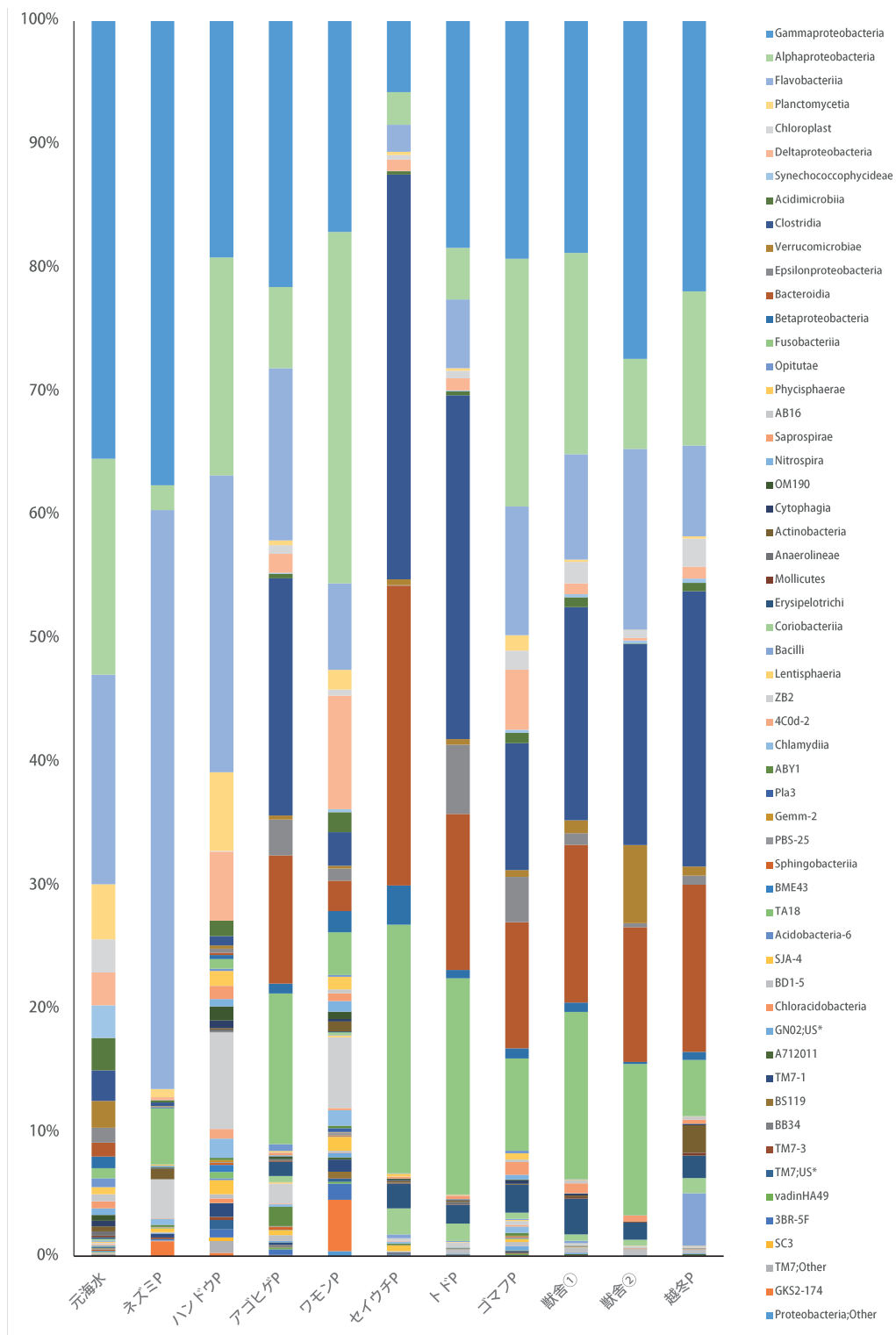


図2 各飼育水と元海水中の細菌綱百分率

各プールの飼育水中および元海水に含まれていた細菌叢の細菌綱を百分率で示した。Proteobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria, Firmicutesが主要な細菌門であった。Proteobacteria, BacteroidetesはセイウチP以外の全ての飼育水で半数の割合を示した。

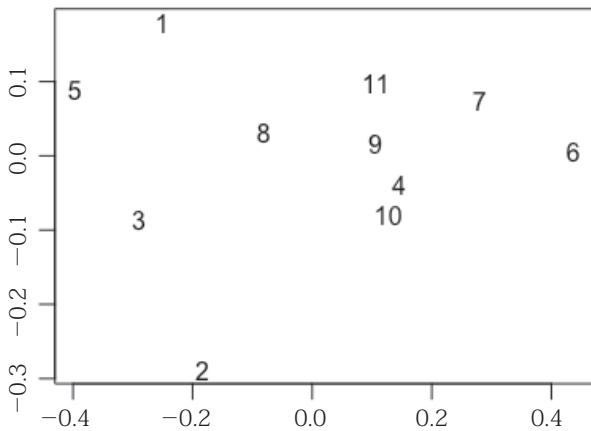


図3 非計量多次元尺度 (NMDS) による細菌門の細菌群集類似度を示す空間配置

各飼育水に含まれる細菌叢の細菌門レベルでの類似度について示す。距離が近いほど、飼育水の細菌群集が類似している。数字は以下の飼育水を表す。

1：元海水、2：ネズミP、3：ハンドウP、4：アゴヒゲP、5：ワモンP、6：セイウチP、7：トドP、8：ゴマフP、9：獣舎①、10：獣舎②、11：越冬P

じ Bacteroidetes 門を含んではいるものの、Flavobacteriia 綱のみ確認されたことから、おたる水族館の飼育環境においてイルカの腸管内では Bacteroidia 綱が存在しにくいと思われる。また、これらイルカ種の飼育水において糞便由来と考えられる Fusobacteria 門は確認されたが、Firmicutes 門がほぼ確認されていない。これは Bik ら [8] の報告と同様に、ハンドウイルカの直腸から検出されていた Firmicutes が海水で希釈されほとんど検出されなくなったためであろう。実際、このイルカ2種のプールの容積は他の動物よりも大きいことがわかっている。

Planctomycetes 門や Verrucomicrobia 門は海水、淡水や土壌、深海だけでなく動物からも検出されている環境に存在する細菌門である。また、Cyanobacteria 門は藍色細菌門と呼ばれ、水中に存在する酸素発生型光合成細菌である。Bik ら [8] の報告ではハンドウイルカやカリフォルニアアシカの生息する海水のほか、イルカやアシカの体表や消化管に Cyanobacteria 門が確認されている。今回、獣舎②において、Cyanobacteria 門が元海水よりも高い割合で確認されたのは、ろ過装置のない飼育水内でこの細菌門が増殖していることが原因であると示唆された。

各飼育水の類似性

Lavery ら [5] によれば、様々な海域の海水はそれぞれの特徴を持っており、その類似度には違いが見られる。飼育水の細

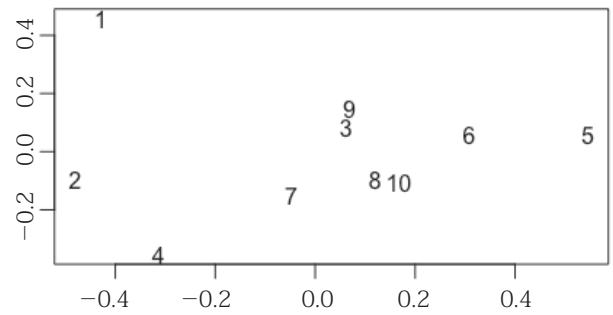


図4 非計量多次元尺度 (NMDS) による細菌綱の細菌群集類似度を示す空間配置

各飼育水に含まれる細菌叢の細菌綱レベルでの類似度について示す。距離が近いほど、飼育水の細菌群集が類似している。数字は以下の飼育水を表す。

1：元海水、2：ネズミP、3：ハンドウP、4：アゴヒゲP、5：ワモンP、6：セイウチP、7：トドP、8：ゴマフP、9：獣舎①、10：獣舎②、11：越冬P

菌叢は主に排泄物の影響を受けるが、それ以外に個体密度、水量、屋外屋内、塩素、ろ過装置が関係すると考えられる。また、排泄物である糞の細菌叢は動物種の違いや摂取する餌によって変化する。そのため、鯨類とアザラシ科の動物とでは餌が同じであっても細菌叢は異なっていたが、これは動物種の違いによって各動物の腸内で維持される細菌叢が異なっていたことが原因かもしれない。また、ワモンアザラシはイカナゴのみしか食していなかったことが、ワモンPとそれ以外のアザラシ科の飼育水との間に類似性があまり見られなかった理由であると考察された。

ゴマフアザラシを飼育する2つのプールにおいて、ゴマフPにはろ過装置があり、さらに塩素添加がされているが、越冬Pにはその両方が行われていない。そのため、1頭あたりの飼育水量がほぼ同じであっても、ゴマフPに比べろ過装置のない越冬Pの方は浮遊物が除去されにくい可能性がある。これら二つのプールで飼育されているゴマフアザラシはほぼ同じ種類の餌を与えられているため、腸内細菌叢は似通っている可能性が考えられる。そのためこの違いの理由は、おそらくろ過装置と塩素の添加が細菌門の種類や割合の違いに影響を与えたと考えられるが、今後糞便中の細菌叢を調べ比較することで明らかになるであろう。

飼育水の細菌叢と公衆衛生的意義

本研究では、Cowan らや Dunn ら [12, 13] が CRC Handbook of Marine Mammal Medicine において示している公衆衛生上確認すべき細菌属や細菌種がいくつか検出された。そのほとんどは日和見感染菌であり、そもそも実際に海棲哺乳類

から人に感染した報告はこれまでない。しかし、日本では海棲哺乳類を食する人が一定数いるため、注意が必要であろう。また、陸上の動物や鳥類との接触により、海棲哺乳類が人獣共通感染症に感染した例もあるため間接的な感染にも注意しておくに越したことはない。本研究において飼育水に含まれる公衆衛生上確認しておくべき細菌についてモニタリングできたことは、今後の動物の飼育環境維持に役に立つ情報であると示唆された。これまで海棲哺乳類の眼科疾患原因菌の報告はないが、特に鰭脚類は眼科疾患に罹患した個体が野生および飼育下問わず見られる [11]。人および陸上の動物に対して眼科疾患を引き起こす細菌が海棲哺乳類においても原因菌となる可能性は否定できない。また、通常角膜炎などは、物理的な外傷やウイルス感染といった角膜の傷ついた眼球から細菌が侵入することで引き起こされる [14]。Colitz ら [9] は飼育下鰭脚類の眼科疾患の原因は、紫外線、闘争、水中浮遊物などが原因であると述べており、細菌に限らず飼育水中の病原体についてモニタリングすることは重要である。今後、眼科疾患が起きている眼球からの細菌検出の試みが必要であると考察された。本研究では、次世代シーケンスによって得られた結果から、水族館の飼育水中における細菌学的環境特性の解明を行った。今回のように細菌のスクリーニングを行うことは、病原性細菌の有無を確認するだけでなく、飼育水環境のリファレンスとして役に立つであろう。今後、他の水族館の飼育水についても調べることで、より理想的な海棲哺乳類の飼育環境づくりに繋がることが期待される。

謝 辞

本研究を終えるにあたり、水族館での採水や動物個体情報の提供にご協力頂いた、おたる水族館の伊勢伸哉 氏、大野木孝二氏、岡本圭介氏、勝見 智氏、川本 守氏、佐々木佑輔氏、志村智行氏、鈴木 茜氏、徳山 航氏、新野雅大氏、濱 夏樹氏、三宅教平氏 (50 音順) に心より感謝の意を表します。なお、この研究は、2017 年度酪農学園大学共同研究の助成を受けたものである。

引用文献

- 服部正平. 2016. 1 メタゲノム解析技術のオーバービュー. 実験医学 別冊 NGS アプリケーション: メタゲノム解析実験プロトコール (服部正平 編), pp. 8-14. 羊土社, 東京.
- Hicks AL, Lee KJ, Couto-Rodriguez M, Patel J, Sinha R, Guo C, Olson SH, Seimon A, Seimon TA, Ondzie AU, Karesh WB, Reed P, Cameron KN, Lipkin WI, Williams BL. 2018. Gut microbiomes of wild great apes fluctuate seasonally in response to diet. *Nature Commun* 9: 1-18.
- Ilmberger N, Güllert S, Dannenberg J, Rabausch U, Torres J, Wemheuer B, Alawi M, Poehlein A, Chow J, Turaev D, Rattei T, Schmeisser C, Salomon J, Olsen PB, Daniel R, Grundhoff A, Borchert MS, Streit WR. 2014. A comparative metagenome survey of the fecal microbiota of a breast-and a plant-fed Asian elephant reveals an unexpectedly high diversity of glycoside hydrolase family enzymes. *PLoS One* 9: e106707.
- Wu X, Zhang H, Chen J, Shang S, Yan J, Chen Y, Tang X, Zhang H. 2017. Analysis and comparison of the wolf microbiome under different environmental factors using three different data of Next Generation Sequencing. *Sci Rep* 7: 1-11.
- Lavery TJ, Roudnew B, Seymour J, Mitchell JG, Jeffries T. 2012. High nutrient transport and cycling potential revealed in the microbial metagenome of Australian sea lion (*Neophoca cinerea*) faeces. *PLoS One* 7: e36478.
- Lavery TJ, Roudnew B, Gill P, Seymour J, Seuront L, Johnson, G, Mitchell JG, Smetacek V. 2010. Iron defecation by sperm whales stimulates carbon export in the Southern Ocean. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277 : 3527-3531.
- Miller S, Colitz CM, St. Leger J, Dubielzig R. 2013. A retrospective survey of the ocular histopathology of the pinniped eye with emphasis on corneal disease. *Vet Ophthalmol* 16: 119-129.
- Bik EM, Costello EK, Switzer AD, Callahan BJ, Holmes SP, Wells RS, Et al, Relman DA. 2016. Marine mammals harbor unique microbiotas shaped by and yet distinct from the sea. *Nature Commun* 7: 1-13.
- Colitz CM, Saville WJ, Renner MS, McBain JF, Reidarson TH, Schmitt TL, Mejia-Fava JC. 2010. Risk factors associated with cataracts and lens luxations in captive pinnipeds in the United States and the Bahamas. *J Am Vet Med Assoc* 237: 429-436.
- Colitz CM, Renner MS, Manire CA, Doescher B, Schmitt TL, Osborn SD, Croft L, Olds J, Gehring E, Mergl J, Tuttle AD, Sutherland-Smith M, Rudnick JC. 2010. Characterization of progressive keratitis in Otariids. *Vet Ophthalmol* 13: 47-53.
- Kot BW, Morisaka T, Sears R, Samuelson D, Marshall CD. 2012. Low prevalence of visual impairment in a coastal population of Gray Seals (*Halichoerus grypus*) in the gulf of St. Lawrence, Canada. *Aquat Mamm* 38: 423-427.
- Cowan DF, House C, House JA. 2001. Public Health. In *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine* (Dierauf LA, Gulland

- FMD eds.), pp. 309-328. CRC Press LLC, Florida.
13. Dunn JD, Buck JD, Robeck TR. 2001. Bacterial Diseases of Cetaceans and Pinnipeds. In *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine* (Dierauf LA, Gulland FMD eds.), pp. 767-778. CRC Press LLC, Florida.
14. 中込 治. 2005. 臨床症状から病原診断へのアプローチ感染症と病原微生物. 標準微生物学 第9版 (平松啓一, 中込治 編), pp.599-609. 医学書院, 東京.
15. 2019. 17眼疾患. *MSD マニュアル* (<https://www.msdmanuals.com/ja-jp/>). Merck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co., Inc., Kenilworth.
16. Angelos JA. 2019. Overview of Infectious Keratoconjunctivitis. *Merck Manual. Veterinary Manual* (<https://www.merckvetmanual.com/>). Merck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co., Inc., Kenilworth.

Full paper Bacteriology

Bacterial Community Analysis of Captive Marine Mammals Pool Water using Next-Generation Sequencer

Sayuri WAKAMATSU¹⁾, Misato NAKAMURA¹⁾, Marin MATSUSHIRO¹⁾, Masatoshi TSUNOKAWA²⁾,
Yoshinori SHIMAMOTO³⁾, Daiji ENDOH³⁾ and Takanori KOORIYAMA^{1)*}

1) Laboratory of Companion Animal Behavior and Wildlife Ecology, Department of Veterinary Science, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai-Midori, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

2) Otaru Aquarium, 3-303 Syukutsu, Otaru, Hokkaido 047-0047, Japan

3) Laboratory of Animal Therapeutics, Department of Veterinary Science, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai-Midori, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

4) Department of Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai-Midori, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

(Received 4 December 2019; accepted 2 March 2020)

ABSTRACT

Eye disorders is a life-threatening for pinnipeds, such as sea lions and seals, that are rely on vision for feeding. It is suspected that such as ultraviolet light, trauma on cornea and water quality may causes of ophthalmological diseases for marine mammals. In this study, we focused on the water quality, to conduct comprehensive analysis of bacteria, to clarify the bacteriological characteristics of each animal pool waters in aquarium and to search for the cause bacteria of eye disease. Bacterial 16s rRNA was investigated using a next-generation sequencer to perform community analysis of pool waters of pinnipeds and cetaceans in Otaru Aquarium. As a result, there were few opportunistic but cause bacteria of eye disease, such as *Staphylococcus aureus*, *Serratia* or *Welsh* bacteria. Other infectious bacteria were not recognized that those are directly cause of some diseases or other bacterial infection in public health. Three bacterial phyla were found in common with the former seawater, such as Proteobacteria, Bacteroidetes, and Firmicutes, but Fusobacteria and some non-culturable bacteria were characteristic of animal pool waters. In addition, it was found that the composition of the bacteria is different depending on each animal, so that the bacterial flora may be affected by each animal excretion. So, it is necessary to survey the bacterial flora of pool water, but important to take measures to prevent damage on the cornea of captive marine mammals, which will be an invasion route of bacteria.

Key words: bacteria, marine mammal, next-generation sequencer, ophthalmologic diseases, pool water

— *Jpn J Zoo Wildl Med* 25(2) : 71-80, 2020

* Corresponding author : Kooriyama TAKANORI (E-mail: kooriyam@rakuno.ac.jp)