

分担研究報告書

分担課題名：伴侶動物病院から分離された薬剤耐性菌のヒトへの影響

研究分担者 田村 豊（酪農学園大学 獣医学部食品衛生学ユニット）

研究協力者 白井 優（酪農学園大学 獣医学部食品衛生学ユニット）

研究要旨

伴侶動物はヒトと密接な関係にある。伴侶動物に使用される抗菌性物質の多くは人体用であり、伴侶動物由来薬剤耐性菌がヒトへ伝播することによる影響が懸念される。今回、ヒトの抗菌薬関連下痢症の原因菌である *Clostridium difficile* の伴侶動物における現状及びヒトの感染症との関連を明らかにすることを目的として、イヌ由来 *C. difficile* の薬剤感受性及びその性状を決定し、ヒト臨床由来株との比較を行った。また、近年、ヒト医療において注目される 16S rRNA methylase(16S-RMTase)による高度アミノグリコシド耐性について、イヌ由来大腸菌での現状を調べた。イヌから分離された *C. difficile* の中にはヒト臨床由来株と同一のリボタイプ及び PFGE 型を示す株があった。イヌ由来大腸菌のうち 2/212(9.4%)がヒト医療で最も多く報告される 16S-RMTase の一つである *rmtB* 遺伝子を保有していた。以上の結果より、イヌ由来 *C. difficile* はヒトに伝播する可能性があること、伴侶動物においても 16S-RMTase が伝播していることが示された。

A. 研究目的

1. *Clostridium difficile* はヒトの抗菌薬関連下痢症・偽膜性大腸炎の原因となり世界的な問題となっている。海外では、介護施設の入所者を訪問するイヌから過去にヒトでアウトブレイクを起こしたことがあるリボタイプ 027 型菌が分離された。イヌを含む伴侶動物はヒトの生活と密接な関係があることから、伴侶動物が保有する *C. difficile* は、ヒトが保有する *C. difficile* のレゼルポアとなっている可能性がある。

そこで今回、ヒトとイヌの間での *C. difficile* 伝播の可能性について明らかに

することを目的として、昨年度の本研究において分離したイヌ糞便由来 *C. difficile* とヒト臨床由来 *C. difficile* について、薬剤感受性、リボタイプ、PFGE 型について比較を行った。

2. 近年、ヒトの医療現場においてプラスミド性 16S rRNA methylase(16S-RMTase)の獲得によるグラム陰性腸内細菌の高度アミノグリコシド耐性が広がっている。疫学的に 16S-RMTase 保有株はメタロ ラクタマーゼ、ESBL、*qnr* 遺伝子と共存することが多いことから、感染症を発症した場合は使用抗菌剤が限られることとなり大きな問題となっている。海外では、動物からも 16S-RMTase

保有株の存在が報告され始めた。

そこで今回、日本の伴侶動物における 16S-RMTase 保有状況の実態を明らかにすることを目的として、当研究室が保有するイヌ由来大腸菌株の 16S-RMTase 保有状況を調べた。

B. 研究方法

1. イヌ由来 *C. difficile* とヒト臨床由来株との性状比較

昨年度の本研究にて 204 検体のイヌのうち 62 検体(30%)から 68 株の *C. difficile* が分離された。これら 68 株と東京都内の 2 病院において *C. difficile* 感染症患者から分離された 73 株について薬剤感受性、リボタイプ、PFGE 型を決定し比較を行った。

感受性試験は、CLSI の方法に従い、ヒトの抗菌薬関連下痢症に対して使用されるバンコマイシン(VCM)及びメトロニダゾール(MNZ)、抗菌薬関連下痢症の原因となるクリンダマイシン(GM)、セフトリアキソン(CTRX)、エリスロマイシン(EM)、シプロフロキサシン(CPFX)に対する感受性を寒天平板希釈法により調べた。加えて、テトラサイクリン(TET)に対する薬剤感受性も寒天平板希釈法で調べた。

2. イヌ由来大腸菌における 16S-RMTase 保有解析

動物病院来院犬から分離されたイヌ由来大腸菌 212 株について、高度アミノグリコシド耐性株をスクリーニングするため、アミノグリコシド系 4 薬剤(ゲンタマイシン(GM)、アミカシン(AMK)、ネオマイシン(NEO)、アプラマイシン(APR))に対する薬剤感受性を CLSI の方法に従い寒天平板希釈法により測定した。

16S-RMTase の保有が疑われる株について、

rmtA, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *armA*, *npmA* 遺伝子の保有について PCR により検索した。

16S-RMTase 陽性株について、複数薬剤の感受性について微量液体希釈法で決定した。また、その他の耐性遺伝子も PCR により決定した。

16S-RMTase 陽性株について、プラスミド伝達性を明らかにするため接合伝達試験を行った。

C. 研究結果

1. イヌ由来 *C. difficile* とヒト臨床由来株の性状比較

薬剤感受性について、イヌ由来 *C. difficile* 及びヒト由来 *C. difficile* のいずれにおいても、VCM、MNZ 耐性は認められなかった(表 1)。抗菌薬関連下痢症の原因となる薬剤に対する耐性割合はヒト由来株が犬由来株に比べて高い傾向を示した。TET に対する耐性割合はいずれの由来も低かった。

リボタイプニングの結果、イヌ由来株は 29 の型に分類された(図 1)。最も主要なリボタイプ(16 株)はトキシン A および B 陽性であった。4 番目に主要なリボタイプ(4 株)はヒト臨床由来株(3 株)と同一のリボタイプを示した。これら同一のリボタイプの株について PFGE 解析を行ったところ、イヌ由来株のうち 1 株はヒト臨床由来株 3 株と同一の PFGE 型を示した(図 2)。

2. イヌ由来大腸菌における 16S-RMTase 保有解析

イヌ由来大腸菌 202 株の 4 種類のアミノグリコシド系薬剤に対する感受性試験を行ったところ、GM 及び AMK に耐性を示す株が 29 株、4 薬剤の全てに耐性

を示す株が6株であった。

以上の35株のうち、2株から *rmtB* 遺伝子が PCR により同定された (表2)。*rmtB* の内部配列についてシーケンス解析を行ったところ、ヒトから分離されている *rmtB* 遺伝子と同一の遺伝子配列であった。この2株は、アミノグリコシド系薬剤以外にも耐性を示し (表2)、*bla*_{TEM-1} も保有していた。

rmtB 陽性株について、伝達試験を行ったところ、プラスミドの伝達が認められた (伝達頻度は 1.7×10^{-5} 及び 2.4×10^{-3})。トランスコンジュガントには GM、AMK 耐性が伝達した。

D. 考察

1. イヌ由来 *C. difficile* とヒト臨床分離株の性状比較

日本で飼育されるイヌが、比較的高い割合でトキシシン A 及び B を産生する *C. difficile* を保有していた。分離された菌株について、ヒトの抗菌薬関連下痢症の原因となる抗菌薬に耐性割合はヒト臨床由来株に比べて低い傾向であるものの、CLDM、CTRX、CPFX に対して50%以上の株が耐性を示した。ブタ由来 *C. difficile* は TET に対して高い耐性割合を示すが、ブタでの TET の高い耐性割合は抗菌薬の使用実態を反映していると考えられている。以上のことから、イヌにおける3薬剤の高い耐性割合は、イヌへの抗菌薬の使用が一因と考えられる。

最も主要なリボタイプに分類された16株は全てトキシシン A および B を保有していた。イヌにおいて広く拡散している株が、ヒトに伝播した場合にヒトに対して毒性を示すことから、イヌからヒトに伝播した際

のリスクは高い。

また今回、イヌとヒトでリボタイプおよび PFGE 型が同一の株が同定された。今回のイヌ由来株とヒト由来株の疫学的な関連は不明であるものの、イヌとヒトが近縁な *C. difficile* を保有し、イヌとヒトの間で伝播し得ることが明らかとなった。今後、疫学的な調査を含めたイヌ由来 *C. difficile* の調査が必要であることが示唆された。

2. イヌ由来大腸菌における 16S-RMTase 保有解析

日本のイヌから分離された大腸菌において低率ではあるが、プラスミド性 16S-RMTase が同定された。16S-RMTase 保有株は他の耐性因子と共存することが多く、問題となりやすい。今回分離された2株についても、アミノグリコシド系薬剤以外にも耐性を示し、少なくとも *bla*_{TEM-1} 遺伝子を保有していた。また、これら耐性遺伝子は接合伝達した。以上のことから、イヌを含む伴侶動物における 16S-RMTase 保有株及び耐性遺伝子の拡散には注意が必要であることが示唆された。

RGU-60 株について、NEO 及び APR に対する薬剤感受性は、トランスコンジュガントに伝達しなかった。RGU-60 株の NEO、APR 耐性は *rmtB* 遺伝子以外の因子が関係している可能性がある。また、高度アミノグリコシド耐性を示し、アミノ配糖体修飾酵素の作用による耐性では説明がつかない株も存在した。これらの株については新たな 16S-RMTase の存在の可能性も含めてさらなる研究が必要である。

E. 結論

伴侶動物として飼育されているイヌからヒトの抗菌薬関連下痢症の原因となる可能性のある *C. difficile* が分離され、イヌとヒトの間での伝播の可能性が示された。イヌにおける *C. difficile* のヒトへの伝播リスク、制御法についてのさらなる研究が必要であることが示唆された。

イヌ由来大腸菌から低率ではあるが、プラスミド性 *rmtB* 遺伝子保有株が分離された。今後、イヌを含む伴侶動物における 16S-RMTase 保有株及び耐性遺伝子の拡散について注意が必要であることが示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

<口頭発表>

1. 福田昭、臼井優、大久保寅彦、田村豊：薬剤耐性遺伝子はイェバエ腸管内で接合伝達する、第 87 回日本細菌学会、2014 年 3 月 28 日、東京
2. 大久保寅彦、臼井優、田村豊：ドブネズミ由来 *Enterococcus faecalis* の遺伝子的特徴について-市街地と無人島の比較-、第 87 回日本細菌学会、2014 年 3 月 28 日、東京
3. 臼井優、岡健太郎、高橋志達、稲松孝思、神谷茂、田村豊：子豚糞便から分離された *Clostridium difficile* リボタイプ 078 と欧州で分離されたリボタイプ 078 の比較、第 81 回日本細菌学会北海道支部会、2014 年 8 月 29 日、札幌
4. 福田昭、臼井優、大久保寅彦、田村豊：薬剤耐性大腸菌はイェバエの発

育環で維持される、第 81 回日本細菌学会北海道支部会、2014 年 8 月 29 日、札幌

5. 大久保寅彦、福田昭、田中和之、臼井優、田村豊：腸球菌の薬剤耐性性状と人為的影響の関係、第 81 回日本細菌学会北海道支部会、2014 年 8 月 29 日、札幌
6. 臼井優、酒見蓉子、内田郁夫、田村豊：豚へのフルオロキノロン剤投与及び群飼育がフルオロキノロン耐性カンピロバクターの選択・拡散に与える影響、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
7. 白川崇大、福田昭、大久保寅彦、臼井優、田村豊：農場由来耐性菌ベクターとしてのハエの役割、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
8. 工藤逸美、臼井優、田村豊：畜舎で使用される消毒薬が *Escherichia coli* の薬剤排泄ポンプに与える影響、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
9. 川崎ななみ、臼井優、田村豊：遺伝子導入による多剤耐性大腸菌の感受性回復の可能性、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
10. 鈴木要人、臼井優、岡健太郎、高橋志達、稲松孝思、神谷茂、田村豊：イヌ糞便由来 *Clostridium difficile* とヒト臨床由来株の比較、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
11. 長藤亘、臼井優、岡健太郎、高橋志達、山口博之、田村豊：

- Flavophospholipol による薬剤耐性遺伝子の接合伝達阻害作用、第157回日本獣医学会、2014年9月9日、札幌
12. 白井優、大久保寅彦、福田昭、高田秀重、鈴木聡、田村豊：水圏環境からの薬剤耐性遺伝子伝播における八工の役割、環境微生物系合同大会2014、2014年10月23日、浜松
 13. 大久保寅彦、白井優、鈴木聡、高田秀重、田村豊：バンコク周辺の水圏環境における薬剤耐性菌とその耐性遺伝子の解析、環境微生物系合同大会2014、2014年10月23日、浜松
 14. 白井優、中島千絵、舘野翔、田勢準也、小野崎正修、大曾根司郎、鈴木定彦、田村豊：CAMERA法による野外サンプル(鶏肉及び鶏糞便)からの薬剤耐性カンピロバクターの迅速検出法、第7回日本カンピロバクター研究会、2014年12月11日
 15. 中島千絵、白井優、鈴木晴香、小野崎正修、大曾根司郎、田村豊、鈴木定彦：DNAアレイ技術を応用した新たなカンピロバクター同定・薬剤耐性検出法の開発、第7回日本カンピロバクター研究会、2014年12月11日
- <紙上発表>
1. Usui M, Ozawa S, Onozato H, Kuge R, Obata Y, Uemae T, Ngoc PT, Heriyanto A, Chalemchaikit T, Makita K, Muramatsu Y, Tamura Y.: Antimicrobial susceptibility of indicator bacteria isolated from chickens in Southeast Asian countries (Vietnam, Indonesia, and Thailand). *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 685-692. 2014
 2. Usui M, Sakemi Y, Uchida I, Tamura Y. Effects of fluoroquinolone treatment and group housing of pigs on the selection and spread of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter*. *Vet. Microbiol.*, 170: 438-441, 2014.
 3. Usui M, Uchida I, Tamura Y.: Selection of macrolide-resistant *Campylobacter* in pigs treated with macrolides. *Vet. Rec.*, 175: 430, 2014.
 4. Usui M, Nanbu Y, Oka K, Takahashi M, Inamatsu T, Asai T, Kamiya S, Tamura Y.: Genetic relatedness between Japanese and European isolates of *Clostridium difficile* originating from piglets and their risk associated with human health. *Front. Microbiol.*, 5: 513, 2014.
 5. Sato T, Yokota SI, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y.: Phylogenetic association of fluoroquinolone- and cephalosporin-resistance of D-O1-ST648 *Escherichia coli* carrying *bla*_{CMY-2} from fecal samples of dogs in Japan. *J. Med. Microbiol.* 63: 263-270, 2014.
 6. Okubo T, Sato T, Yokota SI, Usui M, Tamura Y.: Comparison of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs and humans in Hokkaido, Japan. *J. Infect. Chemother.*, 20: 243-249. 2014.
 7. Sato T, Yokota SI, Ichihashi R, Miyauchi T, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y.: Isolation of *Escherichia coli* strains with AcrAB-TolC efflux pump-associated

- intermediate interpretation or resistance to fluoroquinolone, chloramphenicol, and aminopenicillin from dogs admitted to a university veterinary hospital. *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 937-945., 2014
8. Sato T, Okubo T, Usui M, Yokota SI, Izumiyama S, Tamura Y.: Association of veterinary third-generation cephalosporin use with the risk of emergence of extended-spectrum-cephalosporin resistance in *Escherichia coli* from dairy cattle in Japan. *PLOS One.*, 9: e96101, 2014.
 9. Okubo T, Tosaka Y, Sato T, Usui M, Nakajima C, Suzuki Y, Imura S, Tamura Y.: Bacterial diversity in sea ice from Southern ocean and the Sea of Okhotsk. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 2: 266-272, 2014.
 10. Ishihara K, Saito E, Shimokubo N, Muramatsu M, Maetani S, Tamura Y.: Epidemiological analysis of Mechicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among veterinary staffs for companion animals in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 1627-1629, 2014.
 11. Ishihara K, Saito E, Shimokubo N, Muramatsu M, Maetani S, Tamura Y.: Mechicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among veterinary staffs and dogs in private veterinary clinics in Hokkaido, Japan. *Microbiol. Immunol.*, 58: 149-154, 2014.
 12. Makita K, Inoshita K, Kayano T, Uenoyama K, Hagiwara K, Asakawa M, Ogawa K, Kawamura S, Noda J, Sera K, Sasaki H, Nakatani N, Higuchi H, Ishikawa N, Iwano H, Tamura Y.: Temporal changes in environmental health risks and socio-psychological status in areas affected by the 2011 tsunami in Ishinomaki, Japan. *Environment and Pollution*, 3:1-20, 2014.
 13. Tsukamoto N, Ohkoshi Y, Okubo T, Sato T, Kuwahara O, Fujii N, Tamura Y, Yokota S.: High prevalence of cross-resistance to aminoglycosides in fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *Chemotherapy* 59:379-384, 2014.
 14. Uchida L, Heriyanto A, Thongchai C, Hanh Tran Thi, Horiuchi M, Ishihara K, Tamura Y, Muramatsu Y.: Genetic diversity in the prion protein gene (PRNP) of domestic cattle and water buffaloes in Vietnam, Indonesia and Thailand. *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 1001-1008, 2014.
 15. Muramatsu Y, Usaki N, Thongchai C, Kramontong I, Kriegsak P, Tamura Y. Seroepidemiological survey in Thailand of *Coxiella burnetii* infection in cattle and chicken and presence in ticks attached to dairy cattle. *SE Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth.*, 45: 1167-1172, 2014
 16. Harada K, Usui M, Asai T.: Application of enrofloxacin and orbifloxacin disks approved in Japan for susceptibility testing of representative veterinary respiratory pathogens. *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 1427-1430., 2014.
 17. Hiki M, Usui M, Akiyama T, Kawanishi M, Tsuyuki M, Imamura S, Sekiguchi H,

Kojima A, Asai T.: Phylogenetic Grouping, Epidemiological Typing, Analysis of Virulence Genes, and Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* Isolated from Healthy Broilers in Japan. *Ir. Vet. J.*, 64: 14., 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし