

愛玩動物における薬剤耐性菌に関する調査研究

研究分担者 小野 文子 岡山理科大学 獣医学部 准教授
研究協力者 宇根 有美 岡山理科大学 獣医学部
研究協力者 畑 明寿 岡山理科大学 獣医学部
研究協力者 藤谷 登 岡山理科大学 獣医学部
研究協力者 徳田 昭彦 竜之介動物病院
研究協力者 大川 恵子 竜之介動物病院
研究協力者 下田 宙 山口大学 共同獣医学部
研究協力者 立本 完吾 山口大学大学院 共同獣医学研究科
研究協力者 松本 一俊 熊本県保健環境科学研究所

研究要旨： 本研究では、獣医療臨床検体のAMRのみでなく、家庭環境内、特に在宅介護等家庭内医療が必要となる環境下での人と動物の相互感染のリスクについての評価を行う目的で、野外で生活している地域猫のAMR保有状況について調査研究を継続して実施している。また、動物病院に来院する猫において、疾患治療および健康診断や避妊処置等を目的として来院した健常猫についてAMR保有状況の検索を行うとともに、飼育環境、家族構成、在宅介護等についてのアンケート調査を行った。地域猫からのサンプリングは、熊本県で実施されているTNR活動（Trap Neuter Return:地域ネコを一時的に保護し、不妊手術を施し、元の場所に戻す）時に採取した。平成29年から令和元年に採取した275検体中212検体について検査を実施したところ、地域猫の薬剤耐性菌保有率は12%であった。動物病院に来院した家庭猫34頭中では26%がAMRを保有していた。家庭猫34頭中25頭が去勢・避妊・ワクチン接種等来院時疾患治療を行っていない個体でAMR保有率が12%であるのに対し、治療処置のため来院した10頭（直近の治療処置歴も含む）のAMR保有率は56%であった。

A．研究目的

少子高齢化社会において、愛玩動物に対する依存は増大し、ペットと飼育者の関係に変化が生じている。また、人のみでなく動物における高度医療による薬剤耐性菌（AMR）のリスク危機マネジメントが重要な課題となっている。AMR感染症の抑圧は喫緊の課題として、医療、農畜水産、食品安全の各分野においてAMRの監視、抗菌薬の適正使用にむけワンヘルスサーベイランスのアプローチが推進されている。本研究では飼育放棄動物が保有する薬剤耐性菌のサーベイランスとともに、愛玩動物、特に居宅介護家庭の愛玩動物が保有する薬剤耐性菌について調査研究を行い、適切な飼養管理について啓発普及を行うことを目的として実施した。

B．研究方法

1．検査材料： 2017年～2019年の11月に、竜之介動物病院（熊本県熊本市中央区）徳田竜之介院長が行っている「野良猫不妊手術キャンペーン（TNR活動）」期間中に施術された猫から採取した検体より分離した大腸菌について、275検体中212検体について薬剤耐性の検索を実施した。材料の採取は、術後麻酔覚醒時に直腸より、シードスワブ

1号（シードスワブ® 1号‘栄研’）を用いて直腸内から直接採取した。なお、スワブを採取前に抗生物質投与が行われた場合は採取を行わなかった。個体情報は性別および捕獲場所情報について提供いただいた。

また、同動物病院に来院した健常動物（ワクチン接種、健康診断のため来院する動物）及び患者動物（疾患治療のため来院する動物）について48頭から採取した直腸スワブより、34検体の大腸菌を分離しAMRの検索を実施した。家庭動物のアンケート調査を依頼するにあたり動物病院への協力要請とともに、飼い主へのインフォームドコンセントを行い、直腸スワブを採取していただいた。また、希望者には血液生化学検査を実施し、患者動物への情報フィードバックとともに、個体情報アセスメントに用いた。

2．大腸菌分離同定： 糞便のサンプリングにはシードスワブ1号を用い、XM-G寒天培地（日水製薬）に塗抹し、35℃で24-36時間、好氣的条件で培養した。XM-G寒天培地上で大腸菌の特徴であるβ-グルコロニダーゼ陽性の青色コロニーを2株釣菌した。XM-G寒天培地に塗抹しシングルコロニーをNA寒天培地に塗布し、再度シングルコロ

ニーを採取した。採取したコロニーをNA寒天培地で増菌し、30%グリセリン加NA液体培地に採取し凍結保存するとともに、Prepman (Thermo Fisher scientific) に菌株を浮遊させた後98 10分加熱後、10000rpm 3分遠心分離し、上清を採取した。採取した上清を用いてPCR法により大腸菌の同定を実施した。E.coli検出用プライマーは、ECO-1 : GACCTCGGTTTAGTTCACAGA、ECO-2 : CACACGCTGACGCTGACCAを合成し用いた。増幅条件は94 15分加熱後、94 35秒、50 10秒、74 35秒を35回繰り返したのち、45 2分保温後4 で維持した。陽性コントロールとして大腸菌標準株DNAを用いて電気泳動を行い、585bpの増幅産物を確認したものを大腸菌と同定した (RONG-FU WANG et.al., PCR Detection and Quantitation of Predominant Anaerobic Bacteria in Human and Animal Fecal Samples. Appl Environ Microbiol, 12 42-1247, 1996)。

3. 薬剤感受性試験： 1頭の動物より大腸菌が検出された場合、各2株の大腸菌株を分離保存し、薬剤耐性菌検索の供試株は、1検体あたり1株についてディスク法により薬剤感受性試験を実施した。試験はCLSI (臨床検査標準協会) に準拠して実施した。ディスク法の供試薬剤は、動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM) と厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業 (JANIS) の対象薬剤を考慮した20種とし、BDセンシ・ディスク (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いた。なお、耐性限界値は、CLSI M100-S24に記載のものについてはその値とし、規定されていない薬剤については評価しなかった。精度管理株には、CLSIで規定されているEscherichia coli (ATCC 25922、ATCC 35218)、Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) を用いた。感受性試験を行う際の菌液調整はプロンプトキット (BD) を用いて行った。凍結保存菌株をNA培地で35 24時間培養後、プロンプト接種棒で5コロニーを採取後プロンプト接種チューブ内に懸濁した溶液を用いてミューラーヒントン寒天培地に調整した菌液を塗布し、ディスクを配置した。ミューラーヒントン寒天培地は35 で培養し、24時間以内に阻止円計測により判定を行った。

(倫理面への配慮)

去勢および避妊手術は麻酔下で実施され、採血および直腸スワブ採取は動物が十分に麻酔されている時間に実施した。また、材料採取後に抗生物質を投与し、術後感染防御につとめた。臨床検体については動物病院への協力要請とともに、飼い主へのインフォームドコンセントを行い、直腸スワブを採取していただいた。

C. 研究結果

1. 薬剤感受性試験結果： 2017年~2019年11月

のTNR活動により去勢・避妊を行った猫から分離された大腸菌212株について、ディスク法により薬剤感受性試験を実施した。

薬剤感受性成績は、212菌株中25菌株 12%で耐性菌が検出された。2種類以上の抗生物質に耐性を示した菌株は19株検出され、そのうち4株 (2%) で6種類以上の抗生物質に耐性を示した。臨床検体の検査については本年度より実施し、48頭の直腸スワブより、34検体から大腸菌を分離した。来院理由により、去勢・避妊・ワクチン・駆虫薬投与等で来院した動物を健常動物とし、検索を行ったところ25菌株中4株 (12%) が耐性を示し、3株で3種類に対して、1株で6種類の抗生物質に対して耐性を示した。治療処置のため来院した動物より分離した9検体中5検体 (56%) が耐性を示し、3種類~8種類の抗生物質に対して耐性が認められた (表1)

抗生物質ごとに検出された耐性菌株数を表2に示す。参考値として、農林水産省動物医薬品検査所が実施した「平成30年度 疾病に罹患した愛玩動物由来細菌の薬剤耐性モニタリング調査結果」: https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/pdf/H30cyo_20191029.pdf で報告されているデータを示している。我々が検索対象としているサンプルは直腸スワブであるが、当該調査では疾患に罹患した犬および猫から分離された菌株について調査が実施されており、大腸菌は尿、または生殖器から分離された菌となっている。

地域猫ではペニシリン系のアンピシリン、セファロスポリン系のセファゾリン、アミノグリコシド系のストレプトマイシンで5%以上の菌株で耐性が認められた。去勢・避妊、ワクチン接種等で来院した健常猫の耐性菌保有率は地域猫と同程度であり、ペニシリン系に対する耐性保有率が高かった。一方で、疾患治療で来院した家庭猫の薬剤耐性菌保有率は高く、JVARMで検索した耐性菌出現傾向と同様セファム系、キノロン系に対する耐性保有率が高い傾向が認められた。

D. 考察

愛玩動物由来感染症は今後、注意を要し、対策を早急に講じておくべき公衆衛生上の問題であると考えられる。本年度は、臨床例から分離した大腸菌34株について検索を実施したところ、疾患治療猫はJVARM調査と同様の傾向が認められたのに対し、健常家庭猫では地域猫と同様の耐性菌保有状況であった。JVARMの調査研究は疾患に起因すると考えられる検体の調査であるが、本研究は腸管内常在大腸菌を用いた検索であり、正常細菌叢において耐性菌を保有している可能性が考えられた。次年度、さらに検体数を増やして調査を行い、各個体のアセスメントによる薬剤耐性菌出現傾向についてリスク評価を行う。居宅介護家

庭において、愛玩動物は精神的よりどころとなる一方、不適切な衛生管理や、動物との濃厚接触等による人獣共通感染症および日和見感染のリスク増大が危惧される。特にAMR対策では、高齢者世帯において、ペットへの獣医療によるAMR出現リスクのみでなく、高齢者の通院率増大に伴うAMR保有が家庭内ペットへの不顕性感染による常体的な暴露環境のリスクが危惧される。ホストの免疫状態が低下すればするほど易感染性となり、かつ重症化しやすく、人および動物の相互感染のリスクについての検証が必要である。愛玩動物が保有するAMRについて調査を行うとともに、飼育環境についてのアセスメントを行い、愛玩動物のAMR保有状況を解析し、リスク危機マネジメントをおこなう。

1) 愛玩動物(ネコ)が保有するAMR調査：地域ネコ、健常ネコ、疾患ネコのカテゴリーに別けAMR保有状況の調査することにより、獣医療とAMRの保有との因果関係について情報を構築することができる。

2) 高齢者在宅介護家庭で飼育されている飼育ネコのAMRの検索と飼育環境調査を行うことにより、人および動物相互間のAMR発生状況について検証を行うことができる。

3) 収集したデータとJVARMの動向調査データに基づきリスク危機マネジメントを行い、高齢者在宅介護家庭における愛玩動物のAMR発現抑圧環境整備のための、社会への啓発普及を行うことができる。

E. 結論

地域猫が保有するAMRの継続的サーベイランスは、家庭内健常猫の保有状況の評価に有用であり、獣医療処置を受ける家庭猫のAMR出現傾向を解析し、飼育環境アセスメントを加えることにより、動物とヒトのAMR相互感染のリスクについて検討が可能であると考えられた。

F. 健康危険情報

健常家庭猫の糞便中大腸菌株のAMR保有率は地域猫と同様に12%と低い傾向が認められたが、疾患治療動物は半数以上の個体で腸内細菌叢にAMRを保有していた。

G. 研究発表等

1. 論文発表等
なし
2. 学会発表等
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 猫由来大腸菌株の耐性菌出現率

耐性薬剤数 (検査数19種)	地域猫 検体数 (212)	家庭猫 (健常) 検体数 (25)	家庭猫 (疾患) 検体数 (9)
0	187	21	4
1	6		
2	4		
3	8	3	1
4	3		
5			1
6	2	1	
7	1		2
8	1		1
耐性菌保有率	12%	12%	56%

表2 猫由来大腸菌株の薬剤感受性試験結果

薬剤系統	薬剤名		地域猫		家庭猫 (健康)		家庭猫 (疾患)		JVARM *	
			検体数 (212)		検体数 (25)		検体数 (9)		検体数 (93)	
	薬剤名	略称	耐性株数	耐性率 (%)	耐性株数	耐性率 (%)	耐性株数	耐性率 (%)	耐性株数	耐性率 (%)
ペニシリン系	アンピシリン	ABPC	14	7%	3	12%	5	56%	64	69%
	ピペラシリン	PIPC	9	4%	2	8%	5	56%	-	-
ペニシリン系/ β ラクタマーゼ阻害薬	タゾバクタム/ピペラシリン	TAZ/PIPC	0	0%	0	0%	0	0%	-	-
セファロスポリン系第1世代	セファゾリン	CEZ	10	5%	1	4%	4	44%	46	49%
セファロスポリン系第2世代	セフメタゾール	CMZ	4	2%	0	0%	0	0%	-	-
セファロスポリン系第3世代	セフォタキシム	CTX	2	1%	1	4%	3	33%	38	41%
	セフトジジム	CAZ	1	0%	0	0%	0	0%	-	-
セファロスポリン系第4世代	セフェピム	CFPM	0	0%	1	4%	2	22%	-	-
モノバクタム系	アズトレオナム	AZT	1	0%	0	0%	1	11%	-	-
カルバペネム系	イミペネム	IPM	0	0%	0	0%	0	0%	-	-
	メロペネム	MEPM	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
アミノグリコシド系	ゲンタマイシン	GM	1	0%	0	0%	1	11%	14	15%
	アミカシン	AMK	0	0%	0	0%	0	0%	-	-
	カナマイシン	KM	3	1%	1	4%	2	22%	12	13%
	ストレプトマイシン	SM	12	6%	2	8%	1	11%	32	34%
テトラサイクリン系	テトラサイクリン	TC	9	4%	2	8%	1	11%	26	28%
フルオロキノロン系	シプロフロキサシン	CPFX	1	0%	1	4%	2	22%	47	51%
キノロン系	ナリジクス酸	NA	5	2%	1	4%	3	33%	64	69%
クロラムフェニコール系	クロラムフェニコール	CP	4	2%	0	0%	0	0%	14	15%