

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

研究要旨： 本研究では、獣医療臨床検体の薬剤耐性菌（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った。薬剤感受性試験においてディスク法により、各検体より分離した1菌株について薬剤感受性試験を行い耐性菌を検出した検体について微量希釈法により2菌株について検索を行った結果25%で異なる薬剤耐性が認められ、効率的なモニタリング方法についての検討が必要と考えられた。臨床例からESBL産生菌の可能性のある検体が13%検出された一方で、地域猫からの検出率は3%と低く、人為的な要因が関与していることが強く示唆され、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とともに、獣医療における抗菌薬使用状況を踏まえた解析が重要と考えられた。また、公衆衛生上、地域猫の継続的なモニタリングが重要と考えられた。

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。本研究では人生活圏内で生息する地域猫が保有するAMRのサーベイランスとともに、動物病院に来院する愛玩動物について家庭環境のアンケート調査とともに、動物が保有するAMR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： 2020年度は新型コロナ禍により、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）」が実施されなかったことから、散発的に実施した地域猫の去勢避妊の際に検体採取を実施した

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® γ1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°Cで24-36時間、好气的条件で培養した。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°C10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、EC O-1 : GACCTCGGTTTAGTTCACAGA、ECO-2 : C ACACGCTGACGCTGACCAを合成し用いた。増幅条件は94°C15分加温後、94°C35秒、50°C10秒、74°C35秒を35回繰り返したのち、45°C2分保温後4°C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 (ディスク法) : 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、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°C24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°Cで培養し、24時間以内に阻止円計測により判定を行った。

4. 薬剤感受性試験 (微量希釈法) : ディスク法による薬剤感受性試験で何らかの薬剤耐性がみられた検体を対象として、同一検体から得られた大腸菌2株についてバイテック2コンパクト (ピオメリュー・ジャパン株式会社) を用いて薬剤感受性試験を行った。バイテック2感受性カードにはグラム陰性菌感受性カード (AST-N269) を用いた。この測定方法は微量希釈法に基づき、ブレイクポイントはCLSIに準拠している。

(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。動物からの採材については岡山理科大学動物実験委員会の承認を得て実施した。臨床検体については動物病院への協力要請とともに、飼育者へのインフ

ォームドコンセントを行い、直腸スワブを採取するとともに、アンケート調査を実施した。調査は岡山理科大学倫理審査委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

1. 薬剤感受性試験結果 : 2020年度は散発的に実施されたTNR活動時に採取した地域猫の直腸スワブ42検体、臨床検体99検体の直腸スワブより各2株大腸菌を分離保存した。

2017年~2021年に採取し分離した菌株のうち、地域猫直腸スワブから分離した大腸菌212株、中26株、臨床検体の検査47株中15株でディスク法により薬剤耐性を示した。そのうち、地域猫検体19頭から分離した各2株の大腸菌、臨床検体13検体中から分離した各2株の大腸菌についてバイテックグラム陰性菌感受性カードによる微量希釈法で感受性試験を実施した。ディスク法では21種類、微量希釈法では19種類、そのうち、15種類について、同一の抗生物質に対して感受性試験を実施した。ディスク法と微量希釈法の結果を比較したところ、セファム系抗生物質に対する薬剤耐性において、セフメタゾールはディスク法が、セフォタキシム、セフトキシム、セフェピムにおいては微量希釈法で耐性を示す菌株が多かったが、微量希釈法で耐性を示した菌株ではディスク法で中間耐性を示す検体が多く認められた。

ESBL産生菌の可能性が考えられる検体は臨床例13検体中6検体、地域猫18検体中5検体であった。地域猫において2018年に検体採取し、検査を実施した107検体中5検体でESBLの可能性のある菌株が検出されたのに対し、2019年に検体を採取し、検査を実施した60検体ではESBLの可能性のある検体は認められなかった。

ディスク法による薬剤感受性試験は分離した2菌株中1菌株について実施している。微量希釈法について2菌株で実施したところ、2菌株の薬剤耐性が明らかに異なる菌株は臨床例13検体中3検体、地域猫18検体中5検体に認められた。そのうち臨床例、地域猫とも各3検体において1株でESBL産生菌の可能性が考えられた (表1)

D. 考察

愛玩動物由来感染症の中でもAMRは継続的な調査とその結果を集約し対策を早急に講じるべき公衆衛生上の問題であると考えられる。本年度は、新型コロナ禍により経年で実施しているTNR活動による集中的な検体採取は行うことができなかったが、散発的に実施した検体について大腸菌株の分離保存を行った。また臨床例99検体の採取し、分離保存を行っており、今後薬剤感受性試験を進めていく。臨床例について、アンケート調査を実施しており、薬剤耐性を示した症例につい

て、獣医療機関での抗生物質使用履歴の照合を行い、薬剤耐性獲得についての疫学的検証を進めていく。

薬剤感受性試験では、ディスク法により耐性が認められた検体についてバイテック2を用いた微量希釈法による検討を行った。測定に用いた感受性カードはJANIS管轄のグラム陰性菌対応カードであるため、JVARM管轄の抗生物質については検索を行っていない。地域環境における公衆衛生上リスクを評価する上では引き続きJVARM管轄の抗生物質を検索項目に加えることが重要と考えられた。

微量希釈法により各検体から分離した2菌株について検索を行ったところ、25%で感受性の異なる菌株が認められたことから、ディスク法によるスクリーニングと微量希釈法を組み合わせた効率的なモニタリング方法について検討を進める。

今回微量希釈法による検査を実施した32検体中8検体においてESBL産生菌の可能性のある菌株が認められたことから、今後、CAZとCVA/CAZおよびCTXとCVA/CTXによる確認試験を進めるとともに、遺伝子型の検索を進めていく。国内の伴侶動物におけるESBL産生菌の大腸菌からの分離率は約11%という報告があり、現時点で、臨床例からは13%検出されており、ほぼ同様の結果であった。一方で、地域猫からの検出率は3%と低く、人為的な要因が関与していることが強く示唆され、獣医療処置と家庭内環境の両側面からの検討を進めていく。地域猫でESBL産生菌が検出されたのが、2018年に実施したTNR活動猫からの

検体であったことから、捕獲地域や捕獲情報等について再調査を行うとともに、継続的な監視が重要と考えられた。

E. 結論

AMRのリスクを啓発普及する上で、家庭猫が保有する耐性菌について獣医療処置と家庭内環境の両側面からの検証を進めるとともに、公衆衛生上、地域猫の継続的なモニタリングが重要と考えられた。

F. 健康危険情報

地域猫および家庭猫においてESBL産生菌の可能性のある菌株が検出されたことから、愛玩動物と人相互感染のリスクが考えられる。

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

	管轄	測定方法		系統	名称	臨床例 (n=13)		地域猫 (n=18)	
		ディスク法	微量希釈法			ディスク法	微量希釈法	ディスク法	微量希釈法
1	JANIS		●	ペニシリン系	フロモキシセフ	NT	0	NT	0
2	JVARM/JANIS	●	●	ペニシリン系	アンピシリン	11	10	13	14
3	JANIS	●		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	0	NT	0	NT
4	JANIS		●	ペニシリン系/βラクタマーゼ阻害薬	アンピシリン・スルバクタム	NT	9	NT	10
5	JANIS	●	●	ペニシリン系	ピペラシリン	8	9	8	11
6	JVARM/JANIS	●	●	セフェム系(第1世代)	セファゾリン	8	7	11	10
7	JANIS		●	セフェム系(第2世代)	セフォチアム	NT	4	NT	5
8	JANIS	●	●	セフェム系(第2世代)	セフメタゾール	2	0	3	1
9	JVARM/JANIS	●	●	セフェム系(第3世代)	セフォタキシム	4	4	1	5
10	JANIS	●	●	セフェム系(第3世代)	セフトジジム	0	4	2	5
11	JANIS	●	●	セフェム系(第4世代)	セフェピム	3	4	2	5
12	JANIS	●	●	モノバクタム系	アストレオナム	1	3	1	5
13	JANIS	●	●	カルバペネム系	イミペネム	0	0	0	0
14	JANIS	●	●	カルバペネム系	メロペネム	0	0	0	0
15	JANIS	●	●	アミノグリコシド系	アミカシン	0	0	0	2
16	JVARM	●	●	アミノグリコシド系	ゲンタマイシン	1	0	0	0
17	JVARM	●	●	フルオロキノロン系	シプロフロキサシン	4	1	0	0
18	JANIS	●	●	フルオロキノロン系	レボフロキサシン	4	4	0	0
19	JVARM	●	●	クロラムフェニコール系	クロラムフェニコール	0	1	1	1
20	JVARM	●		アミノグリコシド系	カナマイシン	3	NT	1	NT
21	JVARM	●		アミノグリコシド系	ストレプトマイシン	3	NT	8	NT
22	JANIS		●	テトラサイクリン系	ミノサイクリン	NT	4	NT	0
23	JVARM	●		テトラサイクリン系	テトラサイクリン	3	NT	5	NT
24	JVARM	●		キノロン系	ナリジクス酸	5	NT	2	NT
25	JVARM	●		ペプチド系	コリスチン(ポリミキシンE)	0	NT	0	NT

