厚生労働行政推進調査事業費補助金（新興･再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
分担研究報告書

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　渡辺 俊平　　岡山理科大学　獣医学部
研究協力者　藤井 ひかる　岡山理科大学　獣医学部
研究協力者　嘉手苅 将　　岡山理科大学　獣医学部
研究協力者　小菊 洋行　　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：　家庭環境内での人と動物のAMR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保有状況の継続的調査を実施するとともに動物病院に来院する家庭猫（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ている。地域猫調査は、去勢避妊活動（TNR活動）で捕獲後去勢避妊処置を行う際に採取した広域の地域猫の薬剤耐性菌保有率の継続調査とともに、離島という限定地域で生息している地域猫を対象として、健康状態のアセスメントとともに、マイクロチップを装着し、継続的モニタリングを開始し、限定されたコミュニティにおける猫相互間の感染リスクについて検証を開始した。濃厚なコミュニティを形成している離島の地域猫の耐性菌保有率は低い傾向にあった。

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：　愛媛県離島（大洲市青島）に生息する地域猫の健康状態のアセスメントおよび、検体採取を実施した。島内に約100頭生息する地域猫のうち71頭について調査を実施した。動物は、ボランティアの方により捕獲され、体重測定後、メデトミジン（50μg/kg）投与した。鎮静下で全身、口腔内アセスメントを行い、採血および直腸スワブ等の採取を行い、マイクロチップの挿入を実施した。爪切り、外部寄生虫用駆虫薬投与等、グルーミング処置および、状態に応じて皮下輸液を実施し、検査及び処置終了後にアチパメゾール塩酸塩（100μg/kg）投与し、覚醒を促した。捕獲個体中3頭は加療が必要と判断し、大洲市の動物病院へ移送した。

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、好気的条件で培養した。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分加温後、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, 1242-1247, 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（動物由来薬剤耐性菌モニタリング）とJANIS（厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業）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。

４．薬剤耐性遺伝子の検出：　薬剤耐性を示した大腸菌菌株について遺伝子検索を行う目的で下記遺伝子のプライマーを作成した。blaTEM、blaSHV、AmpC(bla CMY/MOX、bla CMY/LAT、bla DHA、bla ACC、bla ACT-1/MIR-1、bla FOX)、CTX-M遺伝子(bla CTX-M-1群、bla CTX-M-2群、blaCTX-M-8群、およびbla CTX-M-9群)、カルバペネマーゼ遺伝子(bla IMP-1、bla IMP-2、bla VIM-2、bla KPC-2、bla GES、bla NDM-1)31-35.アミノグリコシド耐性16S rRNAメチラーゼ遺伝子(armA、rmtB)、アミノグリコシド修飾酵素遺伝子(Aac(6')-Ib、Ant(3")-Ia、Aph(3')-Ia、Aac(3)-II、キノロン耐性遺伝子(qnrA、qnrB、qnrC、qnrD、qnrS、qepA、oqxAB、aac(6')-lb-cr) について増幅条件の検討を行った。

（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。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

2017年から継続に行っているTNR活動時に実施する検体採取は、昨年度に引き続き新型コロナ禍で実施されなかったため、2021年度のサンプリングは実施しなかった。

愛媛県離島（大洲市青島）に生息する地域猫調査は、対象とする離島の住民は高齢者であることから、一時的に新型コロナが収束した時期（2021年11月）に、地元住民、大洲市役所および、支援ボランティア団体の了解を得て行った。調査は、本研究で実施するAMR調査とともに、島内で毎年蔓延している猫ウイルス性上部気道炎の調査と対応処置を行うことで、大洲市職員、ボランティア、大学教員および学生約20名で実施した。捕獲は約90頭行われたが、検査処置を行ったのは71頭であった。健康状態のアセスメント、検体採取、マイクロチップの挿入を実施し、半数の個体へのワクチン接種、爪切り、外部寄生虫用駆虫薬投与等のグルーミング処置および、状態に応じて皮下輸液を実施し、処置終了後にアチパメゾール塩酸塩（100μg/kg）投与し早期覚醒を諮った。鎮静薬を投与した個体は全頭覚醒を確認し島内に開放した。捕獲個体中3頭は加療が必要と判断し、大洲市の動物病院へ移送した。

離島の地域猫から採取した直腸スワブ71検体より63検体より大腸菌が分離された。各個体より2菌株を保存し、各1菌株についてディスク法による薬剤感受性試験を実施した。感受性試験の結果63検体中2検体でアンピシリンおよびセファゾリンに対して耐性が認められた。中間耐性は、13菌株でセファゾリン、ストレプトマイシン、クロラムフェニコール、キノロン系、ナリジクス酸、アミカシンに対して1～3種の抗生物質に対して認められた。個体の健康アセスメントと継続的調査実施を目的として、血液検査およびマイクロチップの挿入を行った。血液学的検査は71検体中60検体について実施し、12検体(20%)で白血球増多が認められ、7検体で赤血球数、ヘモグロビン値とも貧血傾向が認められた。血清生化学検査では、昨年度までに実施した九州地区の地域猫と同様、家庭猫に比べて、低蛋白、低コレステロールの傾向であった。

2017年～2021年に採取し分離した菌株のうち、TNR活動における地域猫直腸スワブから分離した大腸菌212株中26株、離島に生息する地域猫直腸スワブ検体63株中2株、臨床検体の検査47株中15株および、保存中菌株で薬剤耐性菌未検索株の継続検査中の体制株について耐性遺伝子検査を開始した

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。本研究では、縦断的に地域ネコの薬剤耐性菌保有率について調査を行い、野外環境からの感染リスクを評価し、家庭猫における、獣医療および家庭内での人からの感染リスク、薬剤耐性獲得について疫学的検証を進めていく。本年度は離島という閉鎖的且つ濃厚なコミュニティの地域猫について調査を行ったところ、JVARMおよび本研究で行った家庭動物（疾患動物、健常動物）に比べ耐性菌保有率は低く、これまで本研究で実施してきた地域猫に比べても低い耐性菌保有率であった。地域猫として地元の方の庇護の元管理されており、疾患に罹患した場合、ボランティアにより適切な獣医診療を受けることができるという、個体の抗生物質投与履歴を遡ることができる環境下にある地域猫である。今回の調査で低い薬剤耐性菌保有率であり、内集団の濃厚接触による蔓延は比較的低いことがわかった。一方で本猫集団の高齢化、他感染症による免疫抑等リスク因子も考えられることから治療履歴の詳細解析と個体ごとの継続的調査により、AMR蔓延リスクについて検証することが重要と考えられた。

E．結論

離島の地域猫について薬剤感受性検査を実施したところ、JVARMおよび本研究で行った家庭動物（疾患動物、健常動物）に比べ耐性菌保有率は低く、これまで本研究で実施してきた地域猫に比べても低い耐性菌保有率であった。離島という内集団の濃厚コミュニティを形成している群であり、ボランティア団体により疾患動物は本島で獣医療を受診しているため、薬剤耐性を獲得した場合、集団内への蔓延リスクについて個体特定が可能な地域猫の継続調査により、AMR蔓延リスク評価に有用な情報となる。

G．研究発表等

１．論文発表等

（１）Surveillance of antimicrobial-resistant Escherichia coli in Sheltered dogs in the Kanto Region of Japan. Akihisa Hata, Noboru Fujitani, Fumiko Ono, Yasuhiro Yoshikawa. Sci Rep. 2022 Jan 14; 12(1):773

２．学会発表等

（１）地域猫の健康状態の把握. 石橋涼香, 大川恵子, 徳田竜之介, 宇根有美, 畑明寿, 藤谷登, 小野文子. 第5回ワンヘルスサイエンス学会, 2021年9月3日, 愛媛

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

図１　離島で生活する地域猫

図２　一斉サンプリング