

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 | 嘉手苺 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 | 西阪 祐希 | 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 | 須田 拓翔 | 有限会社バーデン | | |

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し、動物病院に来院する家庭動物（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康猫）のAMR保有状況と比較解析を行った。本年度は、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マイクロチップを装着し、継続的な健康状態のアセスメントとAMRモニタリングを開始した。離島に生息する地域猫のAMR保有率は3%と家庭猫、他広域に生息する地域猫に比較して低く、検出される薬剤は限定されていた。健康調査により、ヘモプラズマ集団感染が認められたことから、感染と診断された個体のみを対象としてマクロライド系抗生物質の治療を行い、AMRのフォローアップ調査を開始した。また、輸入直後の愛玩鳥より、多剤耐性菌が検出された。

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。また、愛玩動物の多様化により、輸入動物と触れ合う機会が増えている。本研究では、海外の繁殖施設から適切な手続きを行い輸入された愛玩鳥の調査を開始し、海外からのAMR蔓延リスク評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1. 対象動物

1) 離島に生息する地域猫の継続的健康調査と薬剤耐性菌保有状況： 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。2021年度に、島内に約100頭生息する地域猫のうち71頭について一斉

調査を行った後、本年度は、3回の継続調査を実施した。2021年度の一斉調査では麻酔下で行ったが、継続調査においては、動物を捕獲後、ネットで保定し、マイクロチップによるID確認、体重測定、全身、口腔内アセスメントを行い、採血、咽頭スワブ、直腸スワブの採取、爪切り、外部寄生虫用駆虫薬投与等、グルーミング処置を実施し、マイクロチップ未挿入の個体にはあらたにマイクロチップ挿入を実施した。

2) 輸入愛玩鳥の薬剤耐性菌保有状況： 民間の動物輸入・検疫施設において、2017年に導入された7羽のベニコンゴウインコより、輸入直後にクロアカより採取し分離保存した菌株を用いて検索を実施した。また、当該施設で飼育されている輸入愛玩鳥より、ケージ内に落下した新鮮便を採取し、分離を行った。

2. 血液検査

内在伏在静脈より採材した血液は、プレイン管およびEDTA管に分注した。EDTA管に採取した血液は、自動血球計算装置（日本光電）により全血球計算を行うとともに、血液塗抹標本を作製しメタノール固定を行った。プレイン管に採取した血液は血清分離後、ドライケム（NX7000、富士フィルム）で血清生化学検査を行った。血液塗抹標本はメイ・ギムザ染色後、バーチャルスライドスキ

ヤナNanozoomerに取り込み、白血球百分率の計測と血球の観察を行った。

3. 腸内細菌分離同定

糞便のサンプリングにはシードスワブ1号を用いて採取した。地域猫は大腸菌を対象とし、輸入愛玩鳥は腸内細菌を対象として分離同定を行った。XM-G寒天培地（日水製薬）またはDHL寒天培地に塗抹し、35℃で24-36時間、好気的条件下で培養した。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、またはDHL寒天培地では腸内細菌を対象とし、同一の選択培地に塗抹しシングルコロニーを採取し、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、マイクロバンク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 2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 : GACCTCGGTTTAGTT CACAGA、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, 1242-1247, 1996）。大腸菌以外の菌株はBacterial 16S rDNA PCR Kit Fast（タカラバイオ株式会社）を用いて16S ribosomal DNA（rDNA）領域内の特定領域（約0.8 kb）を増幅し塩基配列により、菌種の同定を行った。

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℃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')-Ib-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

1) 離島に生息する地域猫の継続的健康調査と薬剤耐性菌保有状況

2021年に実施した一斉調査に引き続き、2022年6月に21頭、10月に40頭、3月に37頭を対象とし、健康調査を実施した。6月には16頭、10月に4頭、3月に4頭にマイクロチップを挿入するとともに、動物病院に入院した6頭へのマイクロチップ挿入を行っていただき、島内ほぼ全頭に相当する計101頭について個体管理が可能となった。

健康状態アセスメントでは、2021年に実施した71頭の一般状態の所見として、ボディコンディションスコア（BCS）2以下の個体が12頭、歯肉炎8頭、眼や全身に重度黄疸のある個体が5頭確認された。また、毛並み不良や流涙、眼脂、眼球白濁などの眼症状、鼻汁等が確認された。健康調査の際、脱水重度などの症状があった個体10頭に関しては、輸液処置を行い、加療が必要と考えられた3頭は大洲市の動物病院へ入院させた。全血球計算は61検体で実施した。白血球数の平均値は基準値内であったが、28%で基準値を逸脱し高値を示

した。ヘモグロビン値の平均は基準値内であったが、30%で基準値を逸脱し低値を示した。血液塗抹標本では、ヘモプラズマ感染症と考えられる赤血球表面の好塩基性の球菌様寄生体が35検体で確認された。血清生化学検査は60検体で実施した。ASTとTPは60%以上の個体で高値を示し、平均値が基準値を超えた。T-BILは12%の個体で逸脱し、3.1mg/dlと顕著に高値を示す個体がいた。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。ヘモプラズマ感染による貧血、黄疸症状が多くの個体で認められることから、動物病院での処置および定期検査時において、感染が疑われる個体への抗生物質投与を開始した。抗生物質は長時間作用型マクロライド系ツラスロマイシン（ドラクシン ゴエティス・ジャパン株式会社）を、2022年10月に40頭中11頭、2023年3月に37頭中4頭に投与した。

2021年の初回感受性試験の結果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。2023年3月の検査では37検体中6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。そのうち10月にツラスロマイシンを投与した個体は2例であった。

2) 輸入愛玩鳥の薬剤耐性菌保有状況

7羽のベニコンゴウインコの糞便から分離した腸内細菌は、6羽のベニコンゴウインコから14株の大腸菌 (*Escherichia coli*)、4羽から5株の *Pseudomonas putida*、1株の *Pseudomonas fulva*、1羽から1株の *Lactococcus lactis* と高い相同性が認められた。薬剤耐性は、分離された14株の大腸菌ではセファリゾン、キノロン系、テトラサイクリンに対し耐性が認められた菌株が検出された。 *Pseudomonas* 属では、全ての菌株が多剤耐性菌で、ペニシリン系、β-ラクタム系、セファム系、キノロン系、クロラムフェニコール系と8種以上の抗生物質に対し耐性が認められる菌株が検出された。

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。昨年度より離島という閉鎖的かつ濃厚なコミュニティの地域猫について調査を開始し、JAVMA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。また、当該

地域猫に対し、マイクロチップ挿入により継続調査を可能とし、血液検査、保定検診等継続調査を開始した。赤血球内感染により、貧血、黄疸をもたらすマイコプラズマによる猫ヘモプラズマ感染症の集団感染が認められたことから、感染の診断を行った個体を対象に抗生物質投与を開始するとともに、AMR継続調査を実施したところ、βラクタム系への耐性菌の増加傾向が認められた。マクロライド系抗生物質とβラクタム系やセファム系の抗生物質は、異なる薬理作用を持つため、一般的には互いに薬剤耐性を生じさせることはない。しかし、薬剤耐性のメカニズムは多岐にわたることから、継続的なサーベイランスとともに、発生機序について検討を進める。また、輸入愛玩鳥から多剤耐性菌が分離された。分離された菌株のうち、腸内常在菌である大腸菌に比べ、飼育環境中に存在すると考えられる *Pseudomonas* 属菌株に多剤耐性菌が検出されたことから、繫留検疫期間中の排除の可能性について検討が必要であることから、今後輸入される動物の調査とともに、繫留検疫期間中の変動について調査を開始した。

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、JAVMA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、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。また、海外繁殖施設からの輸入愛玩鳥より多剤耐性菌が検出されたことから、輸入動物が保有するAMRリスクについて解析が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

地域猫および家庭猫において薬剤耐性菌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
 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
 2. 実用新案登録
 3. その他
- なし