

愛玩動物と飼育者の関係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 | 竹口 汐音 | 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 | 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 | 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 | | |
| 研究協力者 | 乾 隆宗 | 株式会社ペットサン | | |

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常猫）のAMR保有状況と比較解析を行った。昨年度に引き続き、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モニタリングを実施した。離島に生息する地域猫が保有するAMRはいずれの個体もアンピシリンおよびセファゾリン耐性であり、個体識別による継続調査では、同一個体で検出される時期に変動があった。また、2か所の輸入業者により採取いただいた輸入愛玩鳥より、高率に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。本研究では人生活圈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。2022年度に引き続き

本年度も継続調査を実施した。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・検疫施設に導入された輸入愛玩鳥より、ケージ内に落下した新鮮便を採取した。

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ャナ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： 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°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、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°C10分加熱後、10000 rpm 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 : GACCTC GGTTTAGTTCACAGA、ECO-2 : CACACGCTGACGCTGACCAを合成し用いた。増幅条件は94°C15分加熱後、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, 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。

4. 薬剤感受性試験 (ディスク法) : 2017年から2019年に熊本県龍之介病院で実施されているTNR活動 (地域猫を捕獲 (Trap) 後、去勢・避妊 (Neuter) 後元の生活場所に戻す (Return)) 事に採取した直腸スワブより分離した大腸菌株224菌株および、離島に生息する地域猫から分離した大腸菌株88菌株についてディスク法により実施した。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アンピシリン、ピペラシリン、タゾバクタム・ピペラシリン、セファゾリン、セフメタゾール、セフォタキシム、セフトジジム、セフェピム、アズトレオナム、イミペネム、メロペネム、ゲンタマイシン、アミカシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、シプロフロキサシン、ナリジクス酸、クロラムフェニコールの19種とし、BDセンシ・ディスク (日本ベクトン・ディッキンソン) またはKBディスク (栄研) 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。

5. 薬剤耐性遺伝子の検出 : 輸入鳥類より分離した菌株は16Sr-DNAシーケンスにより菌種を同定し、VITEC2システム (日本ビオメリユー・バイテック社) によりグラム陰性菌感受性カード (AST-N269) を用い、実施した。対象とする抗生物質は、アミカシン、アンピシリン、アンピシリン/スルバクタム、アズトレオナム、セファゾリン、セフェピム、セフメタゾール、セフォタキシム、セフォチアム、セフトジジム、クロラムフェニコール、シプロフロキサシン、フロモキシセフ、ゲンタマイシン、イミペネム、レボフロキサシン、メロペネム、ミノサイクリン、ピペラシリンの19種類とした。

(倫理面への配慮)

地域猫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11月から2023年10月までの調査において分離された大腸菌は158菌株 (88頭) について薬剤感受性試験を実施したところ、11頭 (13%) の個体について耐性菌が認められ、いずれもアンピシリンとセファゾリンの2薬剤に対する耐性菌であった。2021年11月は63菌株中3%、2022年10月は28菌株中7%、2023年3月は37菌株中16%、2023年7月は24菌株中13%で耐性菌が検出された。耐性菌が検出された11頭中3頭、耐性菌が検出されなかった77頭中13頭に抗生物質投与履歴があった (本調査中に投与したツラスロマイシンのみでなく、動物病院で投薬された抗菌薬を含む)。

2) 輸入愛玩鳥の薬剤耐性菌保有状況 : 2017年から2024年に輸入された愛玩鳥より分離した57菌株について薬剤感受性試験を実施した。動物種

はアルゼンチンから輸入されたベニコングウインコ、タンザニアから輸入されたコシジロイヌワシ、ベルギーから輸入されたモモイロインコ、カナリア、マレーシアから輸入されたコウラン、キンパラ、ヘキチョウ、タイハクオウム、ゴシキセイガイインコ、ヒインコ、アカビタイムジオウムである。分離された菌種は*Escherichia coli*、*Pseudomonas putida*、*Lactococcus lactis*、*Citrobacter sp.*、*Aeromonas hydrophila*、*Enterobacter sp.*、*Hafnia alvei*、*Raoultella ornithinolytica*、*Klebsiella pneumoniae*、*Acinetobacter sp.*、*Acinetobacter sp.*等であった。

57菌株中47菌株がいずれかの薬剤に耐性が認められた。いずれの薬剤も感受性であった10菌中9菌株は*E. coli*であった。37菌株が多剤耐性菌であり、10薬剤に対して耐性が認められた菌株が検出された。アンピシリンに対し56%、アンピシリン・スルバクタム、セファゾリンに対し40%、ST合材に対し33%、セフメタゾールに対し28%、シプロフロキサシン、ミノサイクリンに対し21-23%の菌株で耐性が認められた。同一個体から分離した異なる菌種間での耐性出現傾向は一致しなかった。

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行った。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の縦断的調査の結果、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と同様の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へ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行ったが投与による耐性菌出現傾向に変化はなく、いずれもアンピシリンとセファゾリンの2種の抗生物質に耐性を示す菌株が検出され、水平感染が示唆された。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。また、東南アジア、南米、ヨーロッパからの輸入愛玩鳥から多剤耐性菌が分離され、海外の繁殖施設での薬剤耐性のリスクが示唆され、継続調査の必要性が考えられた。

E. 結論

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い耐性菌保有率であった。離島に生息する地域猫は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。本研究による3年間の継続調査の結果、検出された耐性菌はいずれも同一の薬剤にのみ耐性を示していることから水平感染が示唆された。また、海外繁殖施設からの輸入愛玩鳥は多剤耐性菌保有率が高かったことから、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

なし

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