

機関番号：32669

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21880043

研究課題名（和文）

子犬、病犬及びヒト由来大腸菌における薬剤耐性の分布状況調査及びその性状解析

研究課題名（英文）

Epidemiological and molecular investigation on prevalence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from pups, diseased dogs, and humans.

研究代表者

原田 和記 (HARADA KAZUKI)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教

研究者番号：80549543

研究成果の概要（和文）：犬及びヒトの糞便及び病犬の泌尿生殖器に由来する大腸菌を対象に、薬剤耐性分布調査とその関係解析を行った。子犬由来株ではブリーダー内にクローン性の拡大が認められ、その結果、ブリーダー間で耐性分布が異なっていた。また、病犬由来株では、病原因子や系統発生分類と関連した薬剤耐性分布が認められた。さらに、犬とその飼い主由来株では、耐性分布には差はなかったが病原因子は犬に高頻度に認められ、また、遺伝子解析の結果一部の飼い主-飼い犬間で大腸菌クローンの共有が認められた。

研究成果の概要（英文）：In this study, I investigated prevalence of antimicrobial resistance and their relative factors in *Escherichia coli* isolates from dogs and humans. Pup-origin isolates spread clonally in each kennel, resulting in different prevalence of resistance between kennels. In addition, resistance prevalence was associated with virulence factors and phylogenetic groups in dogs with urogenital infections. Furthermore, virulence factors, but not antimicrobial resistance, was more prevalent in canine isolates than in owner isolates, and genetic analysis revealed clone sharing between dogs and their owners.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	770,000	231,000	1,001,000
平成22年度	470,000	141,000	611,000
総計	1,240,000	372,000	1,612,000

研究分野：獣医細菌学、疫学

科研費の分科・細目：農学・応用獣医学

キーワード：大腸菌、薬剤耐性、犬、ヒト、病原因子、クローン

1. 研究開始当初の背景

(1) 薬剤耐性は、臨床現場で使用される抗菌剤の有効性に影響を及ぼし、治療効果を低下させる原因となっていることから、医療分野のみならず、獣医療分野においても重要課題とされている。

(2) 犬、猫といった伴侶動物において発生した耐性菌（又は耐性因子）は、飼い主等との直接接触により人に伝播されるおそれがあることが指摘されている。また、我が国では、

近年の少子化等に伴い、犬を主体とする伴侶動物飼育頭数が年々増加傾向にある。従って、伴侶動物における薬剤耐性菌の分布状況及び実態把握は、獣医療上及び公衆衛生上の極めて重要な課題と考えられる。

(3) しかし、我が国では、犬や猫などの伴侶動物における薬剤耐性菌の分布の実態についてほとんど知られていなかった。また、犬-犬間及び犬-ヒト間の耐性菌の伝播リスクについても未だ詳細な調査はされていな

かった。

2. 研究の目的

(1) 動物に分布する各種細菌のうち、大腸菌は、全ての動物に普遍的に存在する腸内細菌であり、薬剤耐性の指標として扱われている。一方で、病原性を有する大腸菌（病原性大腸菌）も存在し、これらは犬及び猫の泌尿生殖器感染症の主要な原因菌とされている。今回、犬及びヒト由来大腸菌を対象に薬剤耐性に関する疫学的調査を実施することとする。

(2) まず、抗菌剤の選択圧が少ないと考えられるブリーダー子犬の糞便由来大腸菌の薬剤耐性分布とその疫学的関連性について調査することとする。

(3) また、病犬由来の病原性大腸菌を対象に耐性分布及びその耐性機構を調査することとする。

(4) さらに、飼い犬と飼い主の糞便由来大腸菌を用いて、薬剤耐性を有する大腸菌の伝播リスクについて調査することとする。

3. 研究の方法

(1) ブリーダー子犬、飼い犬、飼い主及び非飼い主の糞便及び病犬の泌尿生殖器の検体から、大腸菌を定法に従い、分離同定した。

(2) 全ての株を対象に、臨床検査標準協会（CLSI）のプロトコールに準拠した寒天平板希釈法により、各薬剤の最小発育阻止濃度（MIC）を測定し耐性率を算出した。

(3) また、医療上重要視される基質拡張型βラクタマーゼ（ESBL）の保有状況について、全ての株を対象に CLSI のプロトコールに準じてスクリーニングを行った後、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）及びシーケンス解析によりβラクタマーゼ遺伝子の同定を行った。

(3) 子犬由来大腸菌においては、ブリーダー間で耐性分布の比較を行うと共に、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）による解析により、大腸菌間の疫学的関連性を調査した。

(4) 病犬由来大腸菌においては、PCRにより病原因子の検出及び系統発生型別を行い、それらと薬剤耐性分布との関連性について調査した。また、ESBL産生菌については、血清型別及びmultilocus sequence typing (MLST)による型別を別途行った。

(5) 飼い犬、飼い主及び非飼い主由来大腸菌においては、耐性分布を由来別に比較するとともに、病原因子の検出及び系統発生型別も併せて実施し由来別に比較を行った。また、飼い犬及び飼い主由来株については、その疫学的関連性について PFGE により評価した。

4. 研究成果

(1) ブリーダー子犬由来大腸菌における薬剤耐性分布状況及び疫学的関連性

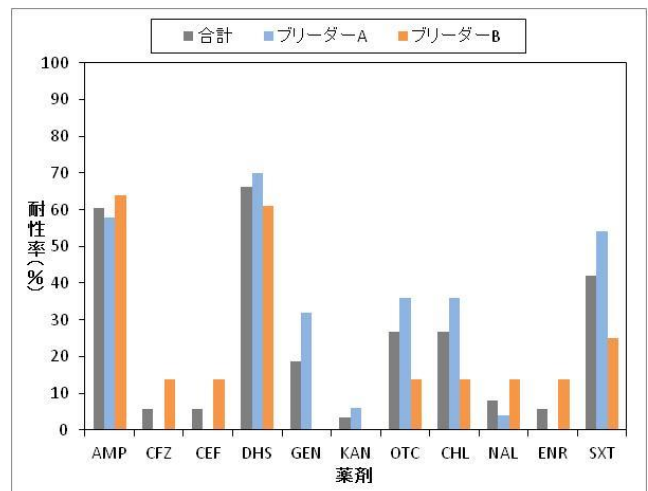
① 供試株

2カ所のブリーダー（A及びB）に由来する計43頭の2ヶ月例未満の子犬（それぞれ25頭及び18頭）の糞便由来大腸菌を1頭あたり2株ずつ釣菌し、調査に供した（計86株）。

② 薬剤耐性分布

11薬剤に対する耐性率を測定したところ、76%の株が1薬剤以上に対して耐性を示す結果となった。特にジヒドロストレプトマイシン（DHS）に対する耐性が66.3%と最も高く、次いでアンピシリン（AMP）（60.5%）、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤（SXT）（41.9%）、オキシテトラサイクリン（OTC）（26.7%）及びクロラムフェニコール（CHL）（26.7%）で高率に耐性が認められた（図1）。また、多剤耐性（2系統以上の薬剤に対する耐性）は60.5%に認められた。従って、子犬のステージで既に高率に耐性大腸菌を獲得していることが示唆された。また、ブリーダー間で耐性率を比較したところ、7薬剤に対する耐性率及び多くの耐性パターンは、両ブリーダー間で異なっていたことから、子犬由来大腸菌の薬剤耐性分布は、ブリーダーによって異なることが示唆された。

図1. ブリーダーA及びBの子犬の糞便由来大腸菌の耐性率



③菌株間の疫学的関連性

全ての株を対象に PFGE 解析を実施した結果、43 頭中 17 頭は PFGE プロファイルの異なる 2 株を保有していたことから、子犬のステージに既に様々な大腸菌が定着していることが示唆された。

また、ブリーダーA では 25 頭中 16 頭が、ブリーダーB では 18 頭中 16 頭が兄弟犬の他個体と少なくとも 1 株の薬剤耐性又は感受性の大腸菌クローンを共有しており、高頻度に垂直伝播や水平伝播が生じていることが示唆された (図 2)。

さらに、計 24 頭の子犬は、別に飼育されている非兄弟犬と大腸菌クローンを共有していることが明らかとなり、ブリーダー内における環境やヒトなどを介した伝播が生じていることが示唆された。また、この共有率はブリーダー間で異なっていたことから、ブリーダーの飼育環境によって大腸菌クローン共有率は変動することが考えられた。

図 2-1. ブリーダーA の PFGE プロファイル

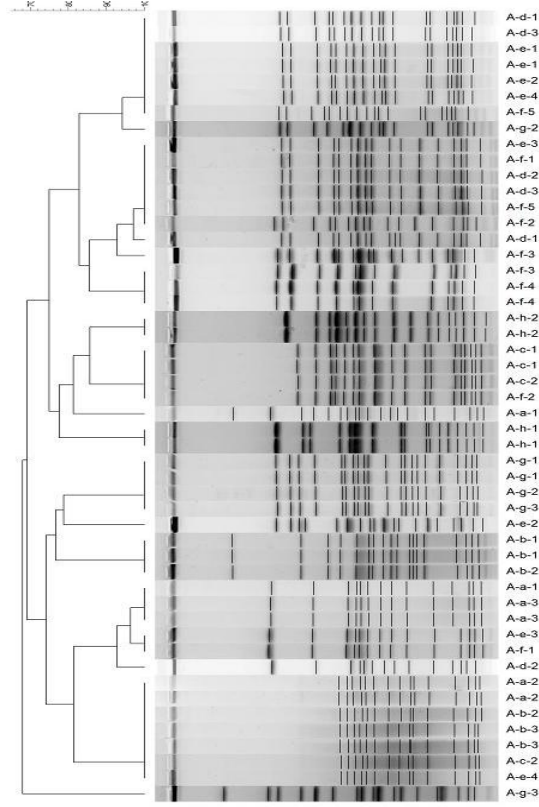
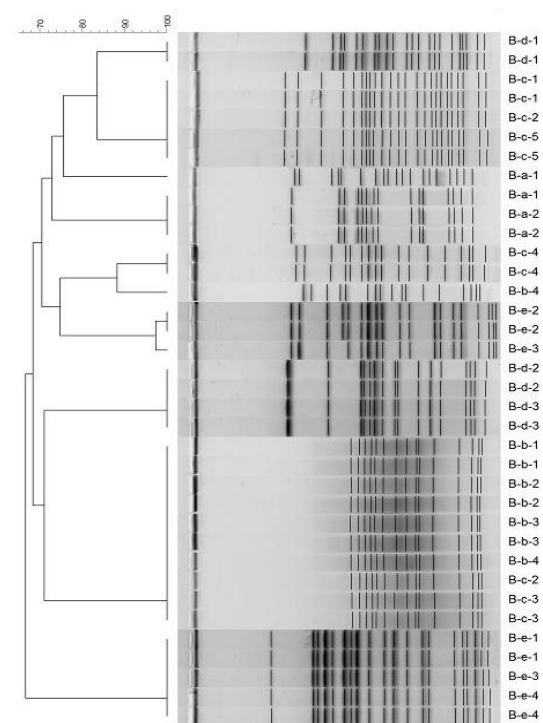


図 2-2. ブリーダーB の PFGE プロファイル



④ESBL の保有状況

全ての個体を対象に ESBL の保有状況を調査したところ、3 頭からスクリーニング試験陽性となる株が分離され、PCR 及びシーケンス解析の結果、いずれも SHV-12 遺伝子による ESBL であることが判明した。また、由来となる 3 頭は兄弟犬であり同一の PFGE プロファイルを有していたことから、当該 ESBL 産生菌は兄弟間で水平伝播又は垂直伝播していることが示唆された。

⑤本調査の意義

これまで集団飼育される犬群内における細菌の疫学的調査は、国内外で実施されておらず、今回の結果は、同一環境内で飼育される犬においては血縁関係の有無に関わらず大腸菌の共有化が生じうることを証明した数少ない報告である。また、SHV-12 遺伝子による ESBL の検出は、国内の伴侶動物では初となる。

(本結果については、既に学会発表及び論文投稿・掲載済み。)

(2) 病犬の泌尿生殖器由来大腸菌における薬剤耐性分布及び系統発生群別・病原因子との関係解析

①供試株

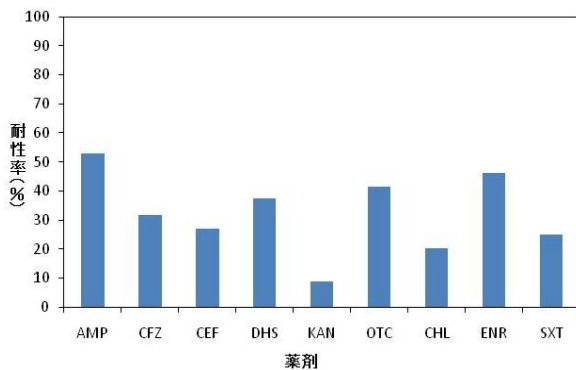
本学動物病院及び近隣の動物病院にて泌尿生殖器感染と診断された犬由来の検体から分離された計 85 株 (1 株/個体) を供試し

た。より詳細な関係解析を実施するために、本調査に限り、同様に分離された猫由来の検体計 19 株 (1 株/個体) も併せて供試し、計 104 株にて本調査を実施した。

②薬剤耐性分布

9 薬剤に対する耐性率を測定したところ、63%の株が 1 薬剤以上に対して耐性を示す結果となった。特に AMP に対する耐性が 52.9%と最も高く、次いでエンロフロキサシン (ENR) (46.2%)、OTC (41.3%)、DHS (37.5%) 及びセファゾリン (CFZ) (31.7%) で高率に耐性が認められた (図 3)。また、多剤耐性 (2 系統以上の薬剤に対する耐性) は 43.3%に認められた。これらの結果を他国 (デンマーク、スウェーデン及びアメリカ) の既報と比較すると、今回の結果、特に、アンピシリンとエンロフロキサシンの耐性率はいずれも高い傾向にあることが明らかとなった。これらの薬剤は当該大腸菌感染症にも頻繁に使用される抗菌剤であり、その結果、高度の耐性発現につながったものと考えられる。

図 3. 病犬・病猫の泌尿生殖器由来大腸菌における薬剤耐性率



③系統発生群別・病原因子の分布状況と薬剤耐性との関連性

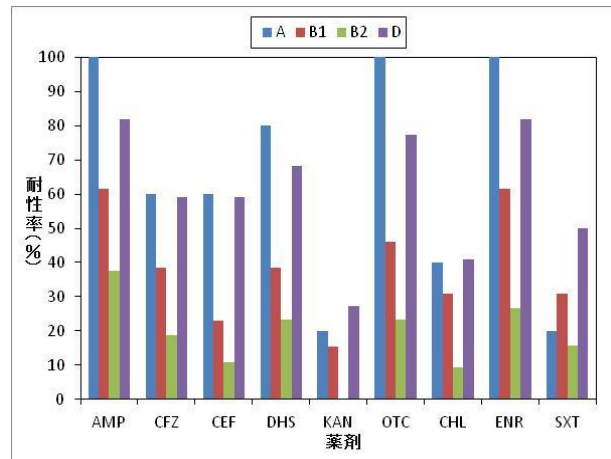
系統発生群別の結果、B2 グループが主体であり (61.5%)、次いで D (21.2%)、B1 (12.5%) 及び A グループ (4.8%) に分類された。これらのグループ別に薬剤耐性率を比較したところ、B2 グループでは調査した 9 薬剤全てにおいて、B1 もしくは D 又はそれらの両グループよりも有意に低い耐性率を示す結果となった。従って、系統発生群別と薬剤耐性分布には関連性があることが示唆された (図 4)。

また、病原因子について調査したところ、*pap* (腎盂腎炎関連線毛)、*sfa* (S 線毛)、*hly* (溶血素)、*aer* (アエロバクチン) 及び *cnf* (細胞壊死因子) がそれぞれ、34.6%、54.8%、27.9%、51.9%及び 51.0%と比較的高頻度に検出された。これら病原因子と薬剤耐性とのオッズ比を測定したところ、*pap*、*sfa*、*hly* 及び *cnf* 遺伝子においては 1 薬剤以上の耐性と

負の関連性が認められた。一方で *aer* 遺伝子では多くの薬剤の耐性と正の相関性が認められた。

以上のことから、大腸菌の属する系統発生群及びそれが有する病原因子は、薬剤耐性の分布に影響を及ぼすことが示唆された。

図 4. 病犬・病猫の泌尿生殖器由来大腸菌の系統発生群別薬剤耐性率



④本調査の意義

本調査は、国内で初めての病犬の泌尿生殖器由来大腸菌における薬剤耐性分布の調査である。また、薬剤耐性分布と病原因子や系統発生群との関連性については、これまで特定の薬剤についてしか知られておらず、今回の報告はさらに多くの薬剤の耐性が関連していることを示唆する数少ない報告である。(本結果については、既に学会発表及び論文投稿済み・印刷中である。)

(3) 病犬の泌尿生殖器由来大腸菌のセファロスポリン耐性機構の解析

①供試株

(2)の調査で用いた株のうち、セファゾリン (CFZ) に耐性を示す計 33 株 (犬由来 24 株及び猫由来 9 株) を供試した。

②薬剤耐性分布

これら CFZ 耐性株の詳細な耐性性状を知るために、(2)で調査した薬剤に加え、各種βラクタム薬計 8 薬剤について更に MIC 値を測定した。その結果、いずれの薬剤においても幅広い MIC 分布がみられたことから、多様な耐性機構を有することが示唆された。

③βラクタマーゼ耐性遺伝子

*bla*TEM-1、*bla*CMY-2 又はその両方の遺伝子が、それぞれ 20 株、17 株及び 13 株に検出されたことから、これらの遺伝子は主要なセファロスポリン耐性機構と考えられた。また、ESBL の一種である *bla*CTX-M-14 及び-15 が 11

株に認められ、*bla*CTX-M-14 産生株の4株は国際的に医療分野で重要視されている025b-ST131 クローンであることが判明した。また、1株からはDHA-1セファロスポリナーゼが検出された。

④染色体性 AmpC のプロモーター領域の変異
対象とした33株中30株で当該プロモーター領域の変異が認められた。このうち28株はβラクタマーゼ遺伝子を有していたが、2株はβラクタマーゼ非保有株であった。従って、当該領域の変異はβラクタマーゼ保有又は非保有に関わらず生じることが示唆された。

⑤本調査の意義

伴侶動物におけるCTX-M-14産生025b-ST131クローンとDHA-1セファロスポリナーゼ遺伝子の検出は、国際的にも初めてであり、公衆衛生上重要な所見であるといえる。(本結果については、学会発表予定及び論文投稿中である。)

(4) 飼い犬と飼い主の糞便由来大腸菌の薬剤耐性等の比較解析

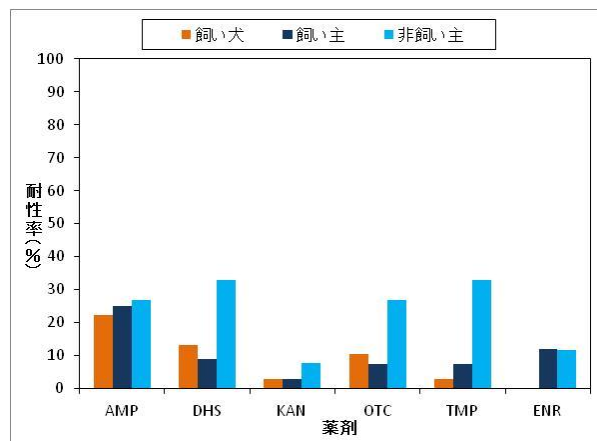
①供試株

34組の飼い犬-飼い主及び26人の非飼い主の糞便から分離された大腸菌計188株(2株/個体)を供試した。なお、いずれの個体も検体採取前6ヶ月間は抗菌薬治療を受けていないことを確認している。

②薬剤耐性分布の比較

調査した6薬剤のうち、3薬剤(DHS、OTC、トリメトプリム)に対する耐性率は、非飼い主に比べて、飼い犬及び飼い主で有意に低い傾向が認められ、飼い犬及び飼い主間では耐性率に有意差は認められなかった(図5)。従って、飼い犬の糞便は薬剤耐性菌のリザーバーとして重要でないことが示唆された。一方で、飼い犬と飼い主間の耐性率の差は、飼い犬と非飼い主間のそれより小さかったことから、糞便を介して犬からヒトへ薬剤感受性大腸菌が伝播されている可能性が考えられた。

図5. 飼い犬、飼い主及び非飼い主の糞便由来大腸菌における薬剤耐性率



③病原因子の比較

(2)と同様に病原因子を調査したところ、犬由来株の*sfa*、*hly*及び*cnf*遺伝子の保有率は、非飼い主由来株のそれよりも有意に高かったが、飼い主由来株のそれとは有意差は認められなかった。このことから、犬の糞便は、病原性大腸菌のリザーバーになりうるということが示唆された。一方で、犬と非飼い主間の病原因子の保有率の差と比較して、犬と飼い主間の保有率の差は小さかったことから、糞便を介して犬のからヒトへ病原性大腸菌が伝播されている可能性が考えられた。

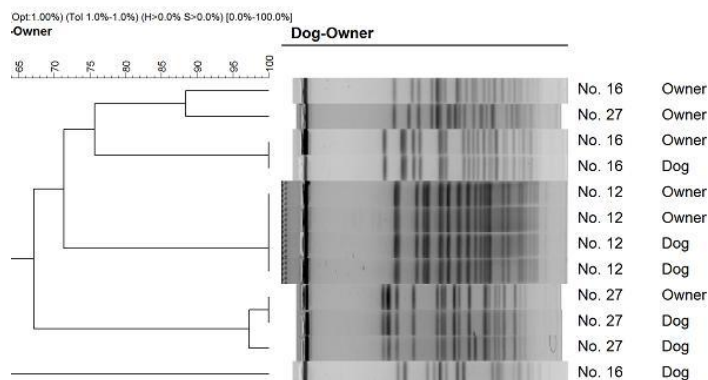
④系統発生群の比較

系統発生群の調査の結果、飼い犬、飼い主、非飼い主のいずれにおいてもB2グループが主体であり、次いでD、B1及びAグループに分類される株が多く認められた。また、由来別に比較したところ、これらグループの比率に有意差は認められなかった。

⑤飼い犬及び飼い主間のPFGEプロファイルの比較

PFGE解析の結果、34組の飼い犬-飼い主のうち、3組で非常に近似した、又は同一のパターンの株が検出された(図6)。これらのクローンは系統発生群、病原因子及び薬剤耐性パターンについても同一であった。また、これらのクローンには、薬剤耐性や病原因子を有するものも含まれていた。このことから、国内の飼育形態においても、糞便を介した飼い主と飼い犬の大腸菌の共有が生じることが明らかとなった。また、聞き取り調査の結果、これらの飼い犬-飼い主は6~14年間同居しており、犬の長期にわたる飼育期間が飼い犬と飼い主の糞便中の大腸菌の共有化の一要因と考えられた。

図 6. 同一大腸菌クローンが認められた飼い犬-飼い主の 3 組 (No. 12, 16, 27) の PFGE プロファイル



⑥本調査の意義

飼い主と飼い犬間の大腸菌の比較解析は、国内では初めての試みである。また、薬剤耐性と病原因子の双方を対象とした比較は、国外においても実施されておらず、本調査及びその結果は貴重なものであると考えられる。(本結果については、学会発表予定及び論文投稿準備中である。)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kazuki Harada, Erika Morimoto, Yasushi Kataoka, Toshio Takahashi, Clonal spread of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates among pups in two kennels, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 査読有, Volume 53, No. 11, 2011.
- ② Kazuki Harada, Ayaka Niina, Yuka Nakai, Yasushi Kataoka, Toshio Takahashi, Prevalence of antimicrobial resistance in relation to virulence genes and phylogenetic origins among urogenital *Escherichia coli* isolates from dogs and cats in Japan, *American Journal of Veterinary Research*, 査読有, 印刷中

[学会発表] (計 2 件)

- ① 森本恵里可、原田和記、片岡康、高橋敏雄、ブリーダーの子犬間における薬剤耐性大腸菌のクローン性の拡大、第150回日本獣医学会学術集会、2010年9月16日、帯広畜産大学
- ② 新名彩加、中井悠華、原田和記、片岡康、

高橋敏雄、犬の泌尿生殖器疾患由来大腸菌の病原性因子の保有状況調査と薬剤耐性分布との関係解析、第150回日本獣医学会学術集会、2010年9月16日、帯広畜産大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 和記 (HARADA KAZUKI)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教
研究者番号：80549543

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

澤田 拓士 (SAWADA TAKUO)
日本獣医生命科学大学・名誉教授
研究者番号：30226071
高橋 敏雄 (TAKAHASHI TOSHIO)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授
研究者番号：90586273
片岡 康 (KATAOKA YASUSHI)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授
研究者番号：60277663