

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24780299

研究課題名(和文) 伴侶動物由来腸内細菌における薬剤耐性、特に  $\beta$ -ラクタム耐性の疫学調査及び性状解析

研究課題名(英文) Epidemiological investigation on antimicrobial resistance, especially beta-lactam resistance, in Enterobacteriaceae isolated from companion animals

## 研究代表者

原田 和記 (Harada, Kazuki)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：80549543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： 伴侶動物由来の各種グラム陰性桿菌における薬剤耐性分布とその疫学的特徴について調査した。犬由来 *Proteus mirabilis* 及び犬猫由来 *Acinetobacter* 属菌では、調査薬剤に対する耐性率は概ね20%以下であり、薬剤耐性分布は低率であった。一方で、犬猫由来 *Klebsiella* 属菌及び *Enterobacter* 属菌では、 $\beta$ -ラクタム系剤に対する耐性が高率に認められ、その耐性株の多くは重要な耐性機構である基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼを保有していた。以上から、伴侶動物に由来する薬剤耐性菌の分布は菌種により異なり、一部菌種は獣医療上・公衆衛生上重要な薬剤耐性菌として注視する必要がある。

研究成果の概要(英文)： In this study, I investigated prevalence of antimicrobial resistance and its epidemiological characteristics in various Gram-negative bacteria isolated from companion animals. Resistance to the tested antimicrobials were less prevalent in *Proteus mirabilis* and *Acinetobacter* spp. In contrast, resistances to antimicrobials including beta-lactams were highly prevalent in *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp. isolated from dogs and cats. Most of beta-lactam-resistant isolates in these bacteria had extended-spectrum beta-lactamases. These findings suggest that prevalence of antimicrobial resistance can differ by bacterial species. Notably, *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp. are regarded as important antimicrobial-resistant bacteria in veterinary medicine and public health.

研究分野： 獣医臨床微生物学

キーワード： 薬剤耐性菌 伴侶動物 グラム陰性桿菌

### 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。特に、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。

(2) 近年、重要な抗菌剤である第3・4世代セファロスポリン系剤やベネム系剤といった重要なラクタム剤にも耐性を獲得した腸内細菌科細菌が国内外の医療分野で多く分離されており、院内感染や市中感染の主要な原因菌として重要視されている。これらの耐性は、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ（ESBL）、メタロβ-ラクタマーゼ（MBL）及び AmpC 型β-ラクタマーゼ（AmpC）といった特定の耐性機構により獲得される。従って、ESBL、MBL 及び AmpC を産生する腸内細菌科細菌の分布や疫学に関する調査は極めて重要と言える。

### 2. 研究の目的

(1) 伴侶動物に由来する、各種腸内細菌科細菌及びその他のグラム陰性桿菌を対象に、主としてβ-ラクタム剤に対する耐性分布を把握するとともに、ESBL、MBL 及び AmpC の保有状況について調査することとする。

(2) 上記の耐性保有株について、疫学的背景を調査し、ヒト由来株との共通性について調査する。

(3) さらに、その他の重要な薬剤耐性であるフルオロキノロン耐性についても、その耐性機構について評価する。

### 3. 研究の方法

(1) 近隣の動物病院や検査会社の協力を得て、犬や猫の病変部位からの検体を収集する。その後、市販の同定キット、PCR、IT-TOF-MS などにより菌種を特定する。

(2) 全ての分離株を対象に、β-ラクタム系剤を中心とした各種薬剤に対する感受性を Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に準拠した薬剤感受性試験により調査する。

(3) 薬剤感受性試験の結果より、ESBL、MBL 及び AmpC の産生が疑われる菌株については、さらに、市販の同定キットや PCR、シーケンスにより、関連する耐性遺伝子を特定する。

(4) プラスミド媒介性キノロン耐性遺伝子

(PMQR)の有無についても、PCR 及びシーケンスにより確認する。

(5) 重要な薬剤耐性を有する株については、Multilocus sequence typing (MLST) やパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) により疫学的な関連性を調査する。

### 4. 研究成果

(1) 犬由来 *Proteus mirabilis* における薬剤耐性とその疫学的特徴

*P. mirabilis* は、犬の耳・皮膚、泌尿生殖器など様々な部位から分離される日和見感染症の原因菌である。今回、犬由来 *P. mirabilis* の薬剤耐性分布と主要な耐性機構に関する調査を行った。結果として、犬の臨床検体由来株 102 株のうち、36 株 (35.3%) が 1 薬剤以上に耐性を示し、クロラムフェニコール (19.6%)、ストレプトマイシン (14.7%)、エンロフロキサシン (12.7%)、トリメトプリム・スルファメトキサゾール (9.8%)、アンピシリン (7.8%) の順に高い耐性率を示した (図 1)。全株のうち、クラス 1 インテグロンが 3 株、クラス 2 インテグロンが 11 株に検出された (図 2)。また PMQR の 1 つである *qnrD* が 2 株に検出された。また、アンピシリン耐性株 8 株中 3 株が CMY-型又は DHA 型の AmpC を保有していた (図 3)。さらに、エンロフロキサシン耐性株 13 株中 10 株が *GyrA* と *ParC* の一方又は両方の QRDR にアミノ酸変異を有していた。従って、犬由来 *P. mirabilis* における薬剤耐性分布は比較的低率であるが、インテグロン、PMQR 及び AmpC といった医療上・獣医療上注視される耐性因子のリザーバーになりうることを示唆された。

図 1. 犬由来 *P. mirabilis* における薬剤耐性率 (%)

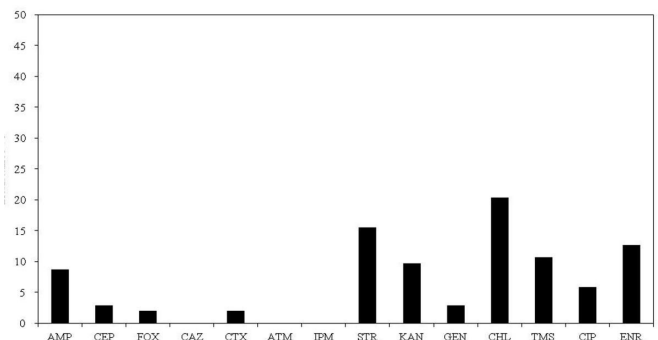


図2. 犬由来 *P. mirabilis* に検出されたインテグロン

クラス	可変領域 (kb)	含有遺伝子	耐性パターン
Class 1	0.75 (2)	aadB (2)	AMP CEP FOX CTX KAN GEN (1)
			AMP KAN STR GEN CHL TMS (1)
Class 2	1.5 (1)	sat-aadA1(1)	ENR (2)
			CIP ENR (4)
Class 1/2	3.0 / 2.2 (1)	aadB-catB- blaOXA10-aadA1/ dhfr1-sat-aadA1 (1)	STR ENR (1)
			TMS (1)
			STR CHL TMS (1)
			AMP KAN STR CHL TMS CIP ENR (2)

図3. 犬由来 *P. mirabilis* のアンピシリン耐性機構

株名	MIC (μg/ml)				スクリーニング			β-ラクタマーゼ
	AMP	CEP	FOX	CTX	ESBL	PABL	MBL	
1	32	4	4	<0.25	-	-	-	TEM-1
5	>128	>128	16	16	-	+	-	TEM-1, CMY-4
13	>128	4	2	<0.25	-	-	-	TEM-1
19	32	4	8	<0.25	-	-	-	TEM-1
39	32	4	4	<0.25	-	-	-	TEM-1
61	32	>128	8	<0.25	-	+	-	DHA-1
68	>128	>128	64	4	-	+	-	CMY-2
77	32	4	4	<0.25	-	-	-	TEM-1
93	32	2	2	<0.25	-	-	-	TEM-1, OXA-10*

(2) 犬猫由来 *Klebsiella* 属菌における薬剤耐性分布と疫学的特徴

*Klebsiella* 属菌は、伴侶動物の尿路、皮膚、生殖器などの様々な部位から分離される病原菌である。供試株として15都道府県の動物病院に来院した犬及び猫から分離された *Klebsiella* 属菌計103株 (*K. pneumoniae* (89株) 及び *K. oxytoca* (14株)) を用いた。薬剤感受性試験の結果、ほぼ全ての株がアンピシリンに対して耐性を示し、その他の薬剤に対しては概ね30-40%程度の耐性率であった(図4)。また、35株(34%)がセフトキシム耐性を示し、その31株がESBL産生株であり全て *K. pneumoniae* であった。検出されたESBLはCTX-M-15が最も多く、CTX-M-14及びCTX-M-55が次いで多く認められた。MLSTにより、約半数のESBL産生株がST15に型別され、その他ST307、ST655、ST1844などに型別された。また、同一のESBLとST型に加えて近縁なPFGEプロファイルを有する株が単一又は複数の病院の異なる個体から認められた(図5)。以上のことから、国内の伴侶動物由来 *K. pneumoniae* においてはESBLが高率に分布しており、その要因としてESBL産生株のクローナルな流行が関与していることが示唆された。

図4. 犬猫由来 *Klebsiella* 属菌における薬剤耐性率(%)

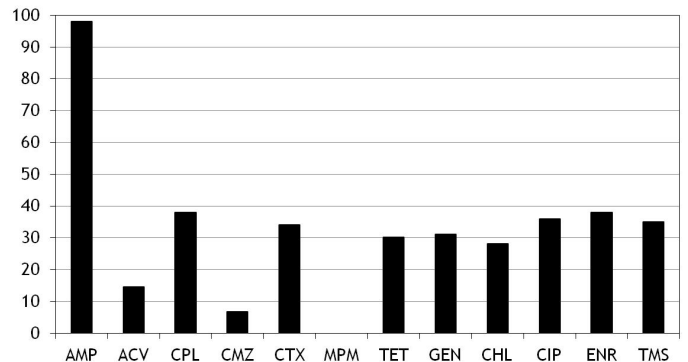
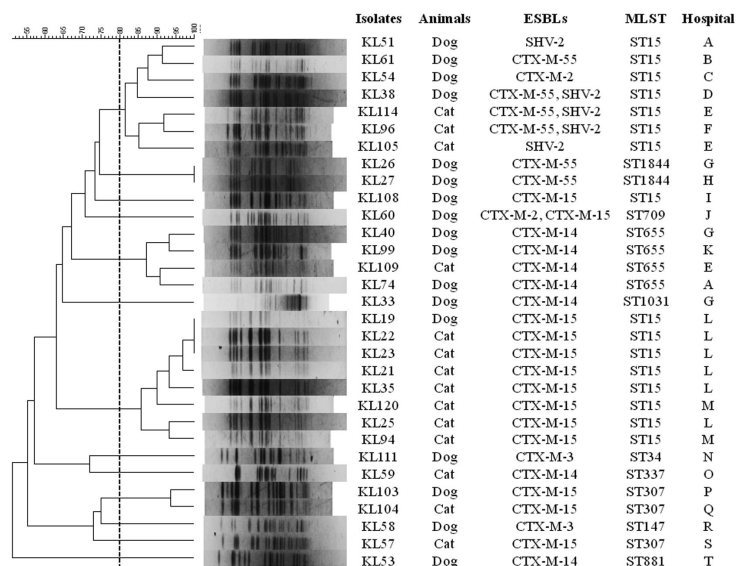


図5. 犬猫由来ESBL産生 *K. pneumoniae* のMLSTおよびPFGEプロファイル



(3) 犬猫由来 *Enterobacter* 属菌における薬剤耐性分布と疫学的特徴

*Enterobacter* 属菌は、伴侶動物からは比較的分離率の低い病原菌である。供試株として犬及び猫から分離された *Enterobacter* 属菌計61株を用いた。菌種同定の結果、*E. cloacae* が最も多く(45株)、その他 *E. aerogenes* (10株)、*E. asburiae* (5株)、*E. gergoviae* (1株) も認められた。薬剤感受性試験の結果、90%以上の株がアンピシリン、アモキシシリン/クラバン酸、セファロチン、セフメタゾールに対して耐性を示し、その他の薬剤に対しては概ね20-40%程度の耐性率であった(図6)。また、21株(34.4%)が第三世代セファロsporin耐性を示し、その16株がESBL産生株であり全て *E. cloacae* であった。検出されたESBLはCTX-M-15とSHV-12が主体であった。ESBL産生株のSTは、ST591 (n=7)、ST171 (n=3)、ST121 (n=3)、ST114 (n=1)、ST136 (n=1)、ST813 (n=1) で

あった。また、同一の ESBL と ST 型に加えて近縁な PFGE プロファイルを有する株が単一又は複数の病院の異なる個体から認められた(図7)。以上のことから、国内の伴侶動物由来 *E. cloacae* は、*K. pneumoniae* と同様に、ESBL が高率に分布しており、その要因として ESBL 産生株のクローナルな流行が関与していることが示唆された。

図6 . 犬猫由来 *Enterobacter* 属菌における薬剤耐性率 (%)

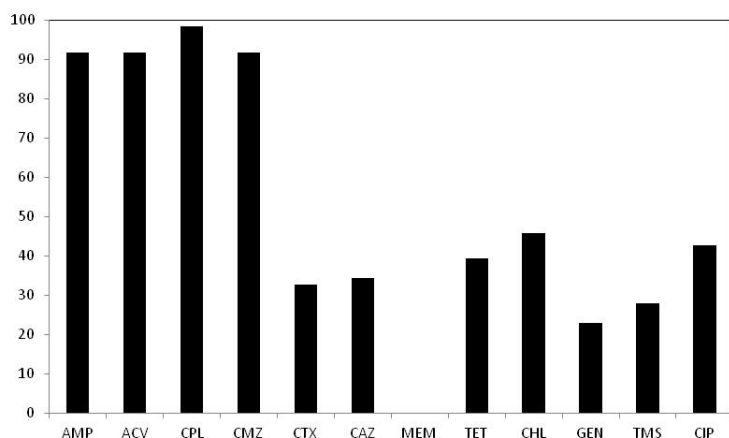
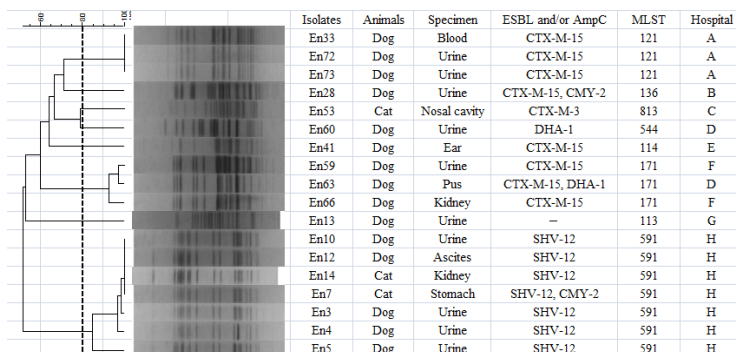


図7 犬猫由来 ESBL/AmpC 産生 *E. cloacae* の MLST および PFGE プロファイル

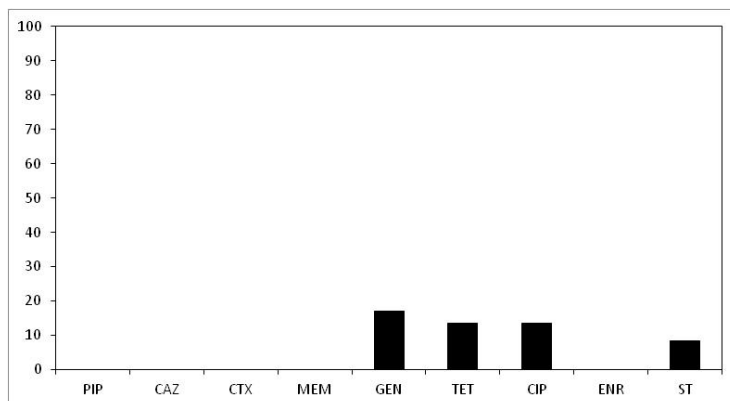


(4) 犬猫由来 *Acinetobacter* 属菌における薬剤耐性分布

*Acinetobacter* 属菌は、伴侶動物からは比較的分離率の低い病原菌であり、多くは日和見感染菌または二次感染菌として分離される。供試株として犬及び猫から分離された *Enterobacter* 属菌計 81 株を用いた。菌種同定の結果、*A. baumannii* が最も多く(28 株)、その他 *A. pittii* (11 株)、*A. radioresistens* (10 株)、*A. ursingii* (10 株)、*E. gergoviae* (1 株) も認められた。供試株 59 株の薬剤感受性試験の結果、対象とした全ての -ラクタム系剤(ピペラシリン、セフトラジジム、セフトキシム、メロペネム)に耐性を示す株は認められなかった。また、他の系統の抗菌剤に対する耐性率も 20%未満と低率であった

(図8)。また、医療分野で問題となっている多剤耐性アシネトバクター(カルバペネム、アミノグリコシド、フルオロキノロンに耐性)を示す株は認められなかった。以上のことから、伴侶動物に由来する *Acinetobacter* 属菌は、薬剤耐性菌としては重要でない可能性が考えられた。

図8 . 犬猫由来 *Acinetobacter* 属菌における薬剤耐性率 (%)



#### (5) まとめ

伴侶動物における薬剤耐性菌の分布状況は、菌種により大きく異なるが、今回の研究では、これまで国内外を問わず報告の少ない菌種を対象に調査を行った。その結果、明らかに菌種により薬剤耐性のリスクが異なっていることが判明した。特に、*Klebsiella* 属菌および *Enterobacter* 属菌では、ESBL や AmpC を産生する株が多く、また、クローナルに拡大していることが懸念された。このことから、動物病院における日常的な感染対策が必要であると考えられた。一方で、*P. mirabilis* 及び *Acinetobacter* 属菌では、薬剤耐性菌の流行は少ないと言える。従って、伴侶動物に由来する薬剤耐性菌に対する対策は、菌種や薬剤耐性機構などの特色を考慮した上で、実施することが好ましいと考えられる。

現在、上記に記載した菌種以外に、さらに伴侶動物に由来する *Citrobacter* 属菌、*Serratia* 属菌、*Stenotrophomonas* 属菌についても現在収集を行っている段階であり、結果が次次第、公表していく予定である。

#### 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 3 件)

原田和記、国内の伴侶動物における薬剤耐性菌の疫学、獣医疫学雑誌, 査読無, 19:85-90, 2015

原田和記、浅井鉄夫、動物に由来する CTX-M 型基質拡張型 -ラクタマーゼ産生大腸菌. 日本化学療法学会雑誌, 査読無, 63:181-186.

2015

K. Harada, A. Niina, T. Shimizu, Y. Mukai, K. Kuwajima, T. Miyamoto and Y. Kataoka: Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Proteus mirabilis* isolates from dogs. Journal of Medical Microbiology 査読有, 63: 1561-1567. 2014

〔学会発表〕(計 5 件)

原田和記、清水孝恵、桑島賢、向井裕次郎、佐藤友美、臼井優、田村豊、木村唯、宮本忠、露木勇三、大木麻生、片岡康：伴侶動物由来 *Klebsiella* 属菌における薬剤耐性分布とその分子学的・疫学的特徴．第 159 回日本獣医学会学術集会、2016 年 9 月（予定）日本大学、神奈川県・藤沢市

K. Harada, T. Shimizu, Y. Mukai, K. Kuwajima, T. Sato, M. Usui, Y. Tamura, Y. Kimura, T. Miyamoto, Y. Tsuyuki, A. Ohki, Y. Kataoka. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Klebsiella* spp. isolates from companion animals in Japan: Clonal dissemination of multidrug-resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Eighth International Conference on Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine. 2016 年 8 月（予定）Butapest Marriott hotel, Budapest, Hungary

原田和記、国内の伴侶動物における薬剤耐性菌の疫学、第 45 回獣疫学学会学術集会シンポジウム、2015 年 9 月、北里大学、青森県・十和田市

原田和記、伴侶動物から分離されるグラム陰性桿菌の薬剤耐性、第 42 回動物用抗菌剤研究会シンポジウム、2015 年 4 月、日本獣医生命科学大学、東京都・武蔵野市

原田和記、新名彩加、桑島賢、向井裕次郎、清水孝恵、宮本忠、片岡康、犬由来 *Proteus mirabilis* における薬剤耐性分布とその性状解析、第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月、北海道大学、北海道・札幌市

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

原田 和記 (HARADA, Kazuki)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：8 0 5 4 9 5 4 3