

報 告

ペット（イヌ及びネコ）の薬剤感受性調査

鴻巣麻子¹, 石森隼都¹, 相良瑠奈¹, 塚田香澄¹, 中山涼太¹, 山崎大峰¹,
佐野海咲², 川畑大輔³, 東出正人⁴

¹つくば国際大学医療保健学部臨床検査学科

²(株)サンリツラボサービス部鉄蕉会グループ

亀田幕張クリニック（元臨床検査学科助手）

³東京医科大学茨城医療センター 中央検査部

⁴(株)江東微生物研究所 品質保証部

【要 旨】 ヒトの薬剤耐性菌は近年、大きな問題となっている。さらに、ヒトに限らずペットであるイヌ・ネコ由来の薬剤耐性菌の報告もある。動物の感染症にも当然、抗生物質が使用され、それにより薬剤耐性菌が出現してきた可能性がある。または、ペットの散歩道など環境中の耐性菌、野生動物からの伝播も考えられる。現在、獣医学の分野で問題となる薬剤耐性菌は、メチシリン耐性ブドウ球菌（MRS）と基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ（ESBL）産生菌と言われている。これらの菌は、ヒトとペットとの相互感染が確認されている。そこで本研究では、これらの MRS や ESBL 産生菌 に注目し、ペットから分離されたグラム陰性菌、陽性菌について薬剤感受性試験を行った。結果、グラム陰性菌からは ESBL 産生菌を疑う菌株は検出されなかった。グラム陽性菌についても MRS の疑いのあるものは検出されなかった。今後はさらに検体数を増やし、ペットのもつ薬剤耐性菌の動向に注目したい。

キーワード： ペット, 薬剤耐性菌, MRS, ESBL

I. 序論

細菌感染症の治療には、抗菌薬（抗生物質）を用いて静菌的に増殖抑制、または殺菌的に死滅させる化学療法が行われる。抗菌薬の作用と

して核酸合成阻害、細胞壁合成阻害、タンパク質合成阻害、細胞質膜障害、代謝阻害などがある。しかしながら一部の細菌においては、抗菌薬に対して治療効果が期待できないものがある。これらの抗菌薬耐性（AMR）は、細菌ゲノム DNA に組み込まれ細胞分裂する際に垂直伝播をする場合や、プラスミドによる水平伝播などで薬剤耐性を獲得する。

耐性菌出現の大きな原因として人的要因が考えられる。頻繁な抗菌薬投与により抗菌薬に曝露される時間・機会が増え、その結果、薬剤感受性菌が減少し、耐性菌が増殖しやすくなる選

連絡責任者：鴻巣麻子

〒300-0051 茨城県土浦市真鍋 6-20-1

つくば国際大学医療保健学部臨床検査学科

TEL: 029-826-6000

FAX: 029-826-6937

E-mail: a-kounosu@tius.ac.jp

抑圧が働くようになる。細菌の薬剤耐性の詳しいメカニズムとして、薬剤の不活化、薬剤の細胞外への排出、薬剤親和性の低下などがある。

ヒトの薬剤耐性菌は、特に入院患者や免疫能が低下した高齢者などは、感染した場合使用できる薬剤に限られるなど、近年大きな問題となっている。また、ヒトに限らず、ペットであるイヌ・ネコ由来の薬剤耐性菌の報告（農林水産省ホームページ、2018；嶋田他、2011；嶋田他、2012）もある。動物の感染症にも当然、抗生物質が使用され（農林水産省ホームページ、2020）、それにより薬剤耐性菌が出現してきた可能性や環境中の耐性菌、他のペットからの伝播、野生動物からの伝播などが考えられる。そこで、我々は先行論文を参考にペットの持つ薬剤耐性菌を調査した。獣医学の分野で特に問題になるのはMRS（メチシリン耐性ブドウ球菌属）とESBL（基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ）産生菌である（Harada et al、2012；Harada et al、2016）。これらはペットとヒトとの相互感染が確認されており、この2つの薬剤耐性菌を中心に調べた。ESBL産生菌はグラム陰性菌が産生する酵素で、中でも腸内細菌目の細菌から検出されることが多い。複数の抗菌薬が効かない多剤耐性菌であるため、ヒトのみならずイヌ・ネコなどペットでも問題となる菌である。MRSは、ヒトの場合MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）がヒトではよく知られているが、動物の場合、*Staphylococcus pseudointermedius*

が世界的に増加している（Weese、2008）。

2022年の時点において国内で飼育されている犬は約705万頭、猫では約883万頭と言われる（一般社団法人ペットフード協会ホームページ、2022）。そこで本研究では、国内で数多くペットとして飼育されているイヌ、ネコを対象とし、検体はペットの糞便、口腔内擦過物とした。ペットの検体から分離されたグラム陰性桿菌9菌種、グラム陽性球菌5菌株について、CLSI M100,29th 2019のディスク拡散法に準拠して薬剤感受性試験を行った。結果、今回我々の調査ではペット由来のESBL産生菌、MRSは検出しなかった。

II. 材料および方法

1. 対象動物および検体

本研究内容を理解し同意を得たつくば国際大学の学生、教員の計11名に協力していただき、イヌ、ネコのペット由来の検体から菌を分離した。内容はグラム陰性菌はイヌ3個体から4菌株、ネコ3個体から5菌株、計9菌株、グラム陽性菌はイヌ2個体から2菌株、ネコ2個体から3菌株、計5菌株であり、分離部位は便、口腔擦過物である（表1）。

表1. イヌ・ネコ由来分離株の種類と分離部位、株数

菌種	分離部位	株数
グラム陰性菌	大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)	5
	エンテロバクター属菌 (<i>Enterobacter</i> spp.)	2
	セラチア属菌 (<i>Serratia</i> spp.)	1
	シトロバクター属菌 (<i>Citrobacter</i> spp.)	1
グラム陽性菌	コアグラールゼ陽性スタフィロкокカス属菌 (Coagulase Positive Staphylococci)	2
	コアグラールゼ陰性スタフィロкокカス属菌 (Coagulase Negative Staphylococci)	3

2. 検体の分離・培養、同定

分離培地は普通寒天培地（栄研化学株式会社；以下栄研）、血液寒天培地（栄研）、BTB寒天培地（栄研）、DHL寒天培地（栄研）を用い、好気条件下で36℃、18～24時間培養した。

分離された集落についてはグラム染色を行い、グラム陽性球菌はカタラーゼ試験、グラム陰性桿菌はオキシダーゼ試験（日水製薬）を実施した。ブドウ球菌属を疑う集落はID32 staph（バイオメリュー・ジャパン株式会社；以下バイオメリュー）、腸内細菌科が疑われる集落はAPI 20E（バイオメリュー）を用い、手順書に従い同定した。ID32staphやAPI 20Eで同定確立の低かった菌株や同定不能と判定された菌株については、質量分析装置MALDI Biotyper（ブルカー・ジャパン株式会社）による同定検査を追加した。

3. 薬剤感受性試験

純培養したコロニーの菌液をMcFarland標

準濁度0.5の濃度になるように濁度計にて調整し、検体懸濁液を調整した。検体懸濁液をミューラー・ヒントン寒天培地（栄研）に塗布した。表2に示す薬剤ディスクを培地に置き、37℃、16時間培養後、阻止円を測定し、判定表に従い感性（S）、中間（I）、耐性（R）を判定した。薬剤感受性試験には、微量液体希釈法や遺伝子検査があるが、本研究ではディスク拡散法にて実地した。

4. 薬剤感受性判定

1) ESBLについて

腸内細菌のESBLに対する米国Clinical and Laboratory Standards Institute（CLSI）の薬剤感受性の基準（2019年）は、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella oxytoca*においてCAZ、CTX、CTRX、CPDX、AZTのうち、決められた濃度の薬剤に1剤以上に耐性であった場合、また*Proteus mirabilis*はCAZ、CTX、CPDXのうち、決められた濃度の薬剤に1剤以上に耐性であった場合と定められている。本

表2. 感受性検査に使用した薬剤及びその略号

系統	薬剤	略号	グラム陰性菌	グラム陽性菌
ペニシリン系	アンピシリン	ABPC	○	○
セフェム系	セファゾリン	CEZ	○	○
	セフォタキシム	CTX	○	○
	セフトジジム	CAZ	○	—
	セフォキシチン	CFX	—	○
アミノグリコシド系	ゲンタマイシン	GM	○	○
ホスホマイシン系	ホスホマイシン	FOM	○	○
テトラサイクリン系	テトラサイクリン	TC	○	○
	ドキシサイクリン	DOXY	○	○
クロラムフェニコール系	クロラムフェニコール	CP	○	○
マクロライド系	エリスロマイシン	EM	—	○
キノロン系	ナジリスク酸	NA	○	—
	オフロキサシン	OFLX	○	○
その他	スルファメトキサゾール	ST	○	—
	ノリメトプリム			

研究では、ESBLのスクリーニングとしCTXを用いた。他には表3、4に示す薬剤を用いた。

2) MRSについて

MRSAの判定基準は、CLSIに準拠すると、*Staphylococcus aureus*に対して微量液体希釈法ではMIPIC（オキサシリン）MIC値（最小発育阻止濃度）が $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ 、CFX（セフォキシチン）がMIC値 $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ 、ディスク法ではMIPICの阻止円が $\leq 10\text{mm}$ 、CFXの阻止円 $\leq 21\text{mm}$ で耐性となっている。本研究では、スクリーニング検査の基準であるディスク拡散法に従って行い、薬剤はCFXを使用した。他には表5、6に示す薬剤を用いた。

III. 結果

1. イヌ由来グラム陰性菌の薬剤感受性試験結果（表3）

ESBL産生菌の判定薬剤であるCTXはいずれも感性であり、耐性菌は検出されなかった。また、ABPCに対する耐性は、*Escherichia coli*、*Citrobacter*属菌は染色体に β -ラクタマーゼを持つため、耐性になったと考えられる。また、*Citrobacter*属と*Enterobacter*属は染色体に第一世代のセフェム系CEZに対するセファロsporinaゼを持つため、耐性になった。*Escherichia coli*は通常CEZに感性であり、ヒトからは耐性が確認されているが、今回ペットからも第一世代のセフェム系耐性の菌が分離された。

2. ネコ由来グラム陰性菌の薬剤感受性試験結果（表4）

ESBL産生菌の判定薬剤であるCTXはいずれも感性であり、耐性菌は検出されなかった。ABPCに対する耐性は、染色体性 β -ラクタマーゼと考えられる。一方、イヌと異なりABPC感性の菌も検出された。

3. イヌ由来グラム陽性菌の薬剤感受性試験結果（表5）

MRSの判定薬剤であるCFXはいずれも感性であり、耐性菌ではなかった。

4. ネコ由来グラム陽性菌の薬剤感受性試験結果（表6）

MRSの判定薬剤であるCFXはいずれも感性であり、耐性菌ではなかった。

5. 倫理的配慮について

本研究は、愛玩動物（ペット）が対象であり、糞便や表皮に付着する菌を採取したため、動物に対する実験的処置は行っていない。しかしながら、本学の教員、学生の飼育する愛玩動物であるため、学内の倫理委員会にて承認を得た【承認番号R05-2】。記録の保管場所は、研究代表者の研究室（B202）にて、紙面および電子媒体にて鍵付き書庫に保存している。

IV. 考察

本研究では、ペットにおいて問題となるMRSとESBL産生菌に注目し調査を行った。結果、どの検体からもMRSやESBL産生菌は検出されなかった。本研究のペットは感染症既往歴がないペットであり（飼い主からの聞き取り情報）、抗菌薬の使用がないと推測されることから、耐性菌が検出されなかった一因と考えられる。一方、感染症罹患歴のあるペット、例えばイヌ膿皮症では、起因菌であるブドウ球菌のメチシリン耐性率の高さが問題となっており、イヌ・ネコにおける尿路感染症においては腸内細菌目におけるESBL産生菌の保有率の高さも問題となっている（露木他、2016）。さらに、ESBL産生菌はヒトから犬、犬からヒトへの相互感染と思われる例がすでに数例確認さ

表 3. イヌ由来グラム陰性菌の薬剤感受性試験結果

薬剤名	菌種			
	<i>Escherichia coli</i> (菌株 1)	<i>Escherichia coli</i> (菌株 2)	<i>Citrobacter</i> spp.	<i>Enterobacter</i> spp.
ABPC	R	R	R	I
CEZ	R	R	R	R
CTX	S	S	S	S
CAZ	S	S	S	S
GM	S	S	S	S
FOM	S	S	S	I
TC	S	S	S	S
DOXY	S	S	S	I
CP	S	S	S	S
NA	I	I	S	S
OFLX	S	S	S	S
ST	S	S	S	S

判定：S（感性）、I（中間）、R（耐性）

表 4. ネコ由来グラム陰性菌の薬剤感受性試験結果

薬剤名	菌種				
	<i>Escherichia coli</i> (菌株 1)	<i>Escherichia coli</i> (菌株 2)	<i>Escherichia coli</i> (菌株 3)	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Serratia</i> spp.
ABPC	R	S	S	S	S
CEZ	R	I	I	R	R
CTX	S	S	S	S	S
CAZ	S	S	S	S	S
GM	S	S	S	S	S
FOM	S	S	S	S	S
TC	S	S	S	S	S
DOXY	S	S	S	S	S
CP	S	S	S	S	S
NA	R	R	S	S	S
OFLX	R	S	S	S	S
ST	S	S	S	S	S

判定：S（感性）、I（中間）、R（耐性）

表5. イヌ由来グラム陽性菌の薬剤感受性試験結果

薬剤名	菌種	
	コアグラールゼ陽性 スタフィロкокカス属菌 <i>Staphylococcus pseudointermedius</i>	コアグラールゼ陰性 スタフィロкокカス属菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i>
ABPC	R	S
CEZ	S	S
CTX	S	S
CFX	S	S
GM	S	S
FOM	S	S
TC	R	S
DOXY	R	S
CP	S	S
EM	R	S
OFLX	S	S

判定：S（感性）、I（中間）、R（耐性）

表6. ネコ由来グラム陽性菌の薬剤感受性試験結果

薬剤名	菌種		
	コアグラールゼ陽性 スタフィロкокカス属菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	コアグラールゼ陰性 スタフィロкокカス属菌 <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	コアグラールゼ陰性 スタフィロкокカス属菌 <i>Staphylococcus warneri</i>
ABPC	S	S	R
CEZ	S	S	S
CTX	S	I	S
CFX	S	S	S
GM	S	S	S
FOM	S	R	R
TC	S	R	S
DOXY	S	R	S
CP	S	S	S
EM	I	S	S
OFLX	S	S	S

判定：S（感性）、I（中間）、R（耐性）

れている (Ljungquist, 2016)。これは、ペットと飼い主の密接なスキンシップや生活環境が近いことを考えると、薬剤耐性菌が飼い主にも伝播し、逆に飼い主の薬剤耐性菌がペットに伝播した可能性も十分に考えられる。また、イヌなどは散歩中のペット同士のふれあいなども耐性菌が広まる一因と考えられる。これらから、ペットの耐性菌が徐々に広まっている可能性が考えられる。今後は、検体数を増やしていくことで、よりペットの耐性菌動向調査が出来ると考えている。

謝辞

本報告は、江東微生物研究所の支援を受け、本学の教員、学生の飼育するペットの検体の解析を基にした研究であり、協力していただいた皆様に感謝申し上げます。

本論文内容に関連する著者らの利益相反：なし

文献

- 嶋田恵理子, 宮本忠, 鳩谷晋吾 (2011) 犬猫における臨床材料からのグラム陰性菌の検出状況と薬剤感受性. 日獣会誌. 64:879-884.
- 嶋田恵理子, 宮本忠, 鳩谷晋吾 (2012) 犬猫における臨床材料からのグラム陽性菌の検出状況と薬剤感受性. 日獣会誌. 65:131-137.
- 露木勇三, 高橋孝 (2016) 伴侶動物 (犬, 猫) における細菌検査について. 日本臨床微生物学雑誌. 26(4):1-6.
- Kazuki Harada, Yuka Nakai, Yasushi Kataoka (2012) Mechanisms of resistance to cephalosporin and emergence of O25b-ST131 clone harboring CTX-M-27 β -lactamase in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*

from dogs and cats in Japan. Microbiology and immunology. 56(7):480-485.

- Kazuki Harada, Takae Shimizu, Yujiro Mukai, Ken Kuwajima, Tomomi Sato, Masaru Usui, Yutaka Tamura, Yui Kimura, Tadashi Miyamoto, Yuzo Tsuyuki, Asami Ohki, Yasushi Kataoka (2016) Phenotypic and Molecular Characterization of Antimicrobial Resistance in *Klebsiella* spp. Isolates from Companion Animals in Japan: Clonal Dissemination of Multidrug-Resistant Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. Frontiers in microbiology. 7:1021-1021.

- Oskar Ljungquist, Ditte Ljungquist, Mattias Myrenas, Cecilia Ryden, Maria Finn, Bjorn Bengtsson (2016) Evidence of household transfer of ESBL-/pAmpC-producing Enterobacteriaceae between humans and dogs-a pilot study. Infection Ecology and Epidemiology. 6:31514

- Scott Weese J (2008) Antimicrobial resistance in companion animals. Anim Health Res rev. Des 9(2):169-176.

農林水産省ホームページ. 平成 29 年度疾病により患した愛玩 (伴侶) 動物 (犬及び猫) 由来細菌の薬剤耐性モニタリング調査の結果. https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/pdf/H29_cyousa_20181130.pdf (閲覧日: 2022 年 9 月 1 日)

- 農林水産省ホームページ. 愛がん動物における抗菌薬の慎重使用に関するワーキンググループ: 愛玩動物における抗菌薬の慎重使用の手引き 2020. <https://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/yakuzi/attach/pdf/torikumi-25.pdf> (閲覧日: 2022 年 9 月 1 日)
- 一般社団法人ペットフード協会ホームページ. 令和 4 年全国犬猫飼育実態調査 <https://petfood.or.jp/topics/img/221226.pdf> (閲覧日: 2022 年 9 月 1 日)

Report

Drug susceptibility survey of pets (dog and cats)

Asako KOUNOSU¹, Hayato ISHIMORI¹, Runa SAGARA¹,
Kasumi TSUKADA¹, Ryota NAKAYAMA¹, Taiho YAMAZAKI¹,
Usaki SANO², Daisuke KAWAHATA³, Masato HIGASHIDE⁴

¹Department of Medical Technology, Faculty of Health Sciences, Tsukuba International University

²Sanritsu Co.,Ltd. Department of Labo service

³Clinical Laboratory Division, Tokyo Medical University Ibaraki Medical Center

⁴Koto Biken Medical Laboratory inc. Department of Quality Assurance

Abstract

Drug-resistant bacteria in humans have become a major problem in recent years. Moreover, there are reports of drug-resistant bacteria not only in humans but also in pet dogs and cats. Naturally, antibiotics are used to treat infectious diseases in animals, but this may have led to the emergence of drug-resistant bacteria. The transmission from resistant bacteria in the environment or via wild animals is also considered. Currently, problematic drug-resistant bacteria relevant to veterinary medicine are methicillin-resistant *Staphylococcus* (MRS) and extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing Gram-negative bacteria. These bacteria are confirmed to be cross-infective between humans and pets. In this study, we focused on MRS and ESBL producing bacteria and conducted drug susceptibility tests on Gram-negative and positive bacteria isolated from pets. Our results demonstrate that no suspected ESBL strains from the Gram-negative bacteria. Furthermore, no Gram-positive bacteria suspected of being MRSA were detected. To observe the future trends of drug-resistant bacteria in pets, studies with a larger sample size are warranted.

Keywords: pets, Drug resistant bacteria, MRS, ESBL