

平成28年度食品の安全確保推進研究事業

「食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究」

分担課題名：家畜由来腸内細菌の疫学的研究：JVARMとJANISの連携について

分担研究者：川西 路子（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：木島 まゆみ（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：小澤 真名緒（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：内山 万利子（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：白川 崇大（農林水産省動物医薬品検査所）

#### 研究要旨

薬剤耐性(AMR)対策アクションプランの戦略2.5 ヒト、動物、食品、環境等に関する統合的なワンヘルス動向調査の実施の取組において、「ヒト、動物、食品における薬剤耐性に関する動向調査・監視に関するデータ連携の実施」が項目として記載されている。本研究では当該データの連携を実施するため、厚生労働省院内感染対策サーベイランス（JANIS）集計用プログラムを一部改変し移植した動物由来薬剤耐性菌モニタリング（JVARM）データサーバーに、JVARMの農場由来（平成26年～27年）及びと畜場由来（平成24～26年度）大腸菌について、データの入力作業を実施し、アンチバイオグラムを作成した。また、JANISで測定されるヒト用の薬剤とJVARMで測定される動物用の薬剤の薬剤耐性の相関を確認するため、JANISの調査薬剤（ミノサイクリン；MINO、ピペラシリン；PIPC、アミカシン；AMK）の微量液体希釈法による最小発育阻止濃度（MIC）と、それぞれと同系統のJVARMの調査薬剤（オキシテトラサイクリン；OTC、アンピシリン；ABPC、カナマイシン；KM）の寒天平板希釈法によるMICを相関係数等によって比較し、関係について検討した。ABPCについては、相関係数、感度、特異度ともに良好な値を示し、PIPCとのMICの比較に用いられると考えられた。OTCについては特異度が低く、MINO耐性の検出には有効であるが、比較の際は注意が必要と考えられた。KMについては相関係数が低く、AMKとの比較に用いるには検討が必要であることが確認された。さらにヒト用医薬品として注射剤が承認され、医療上重要な抗菌性物質として再認識されているコリスチンについて、薬剤感受性試験法であるE-test、微量液体希釈法、寒天平板希釈法の3法によるMICの相関を検討した。E-testにおけるMICは寒天平板希釈法および微量液体希釈法と比較し、低い傾向が認められた。寒天平板希釈法は微量液体希釈法と比較し、MICがやや高い株が認められたものの、相関係数、感度、特異度ともに良好な値を示し、共にモニタリングに有用であることが確認された。

#### A. 研究目的

家畜に由来する薬剤耐性菌が畜産食品を介して人に伝播し、人の健康に危害を与える可能性について評価するため、国内では動物由来薬剤耐性菌モニタ

リング（JVARM）が構築されている。

一方、医療の分野においては、医療機関における院内感染の発生状況、薬剤耐性菌の分離状況および薬剤耐性菌による感染症の発生状況を調査すること

で、我が国の院内感染の概況を把握し、医療現場への院内感染対策に有用な情報の還元等を行うことを目的に、厚生労働省院内感染対策サーベイランス（JANIS）が構築されている。

本研究では、薬剤耐性(AMR)対策アクションプランの戦略 2.5 ヒト、動物、食品、環境等に関する統合的なワンヘルス動向調査の実施の取組において、「ヒト、動物、食品における薬剤耐性に関する動向調査・監視に関するデータ連携の実施」のため、JVARM データの整備作業を継続した。JANIS では平成 26 年度にアンチバイオグラムを作成するための SIR の基準値が CLSI2007 から CLSI2012 に変更され、CLSI2007 と CLSI2012 の基準の SIR に基づくアンチバイオグラムが並列で公表されている。昨年度まで JVARM 由来株について CLSI2007 の SIR 基準に基づきアンチバイオグラムを作成していたが、JANIS のアンチバイオグラムと比較するために、CLSI2012 の基準の SIR に基づくアンチバイオグラムを作成することとした。また、平成 24 年から開始したと畜場由来株についてもアンチバイオグラムを作成した。

さらに、JVARM と JANIS では測定薬剤が一部異なるため、JVARM と JANIS のデータを比較可能か検討するため、テトラサイクリン系、ペニシリン系、アミノグリコシド系各薬剤間の薬剤感受性の相関を確認することとした。

またヒト用医薬品として注射剤が承認され、医療上重要な抗菌性物質として再認識されているコリスチン（CL）について、JANIS では微量液体希釈法により感受性が確認されているが、JVARM では平成 21 年まで薬剤感受性試験を寒天平板希釈法で実施していた。薬剤感受性の推移を JVARM 内及び JANIS と比較可能か検討するため、E-test、微量液体希釈法、寒天平板希釈法での最小発育阻止濃度（MIC）の相関を確認した。

## B. 研究方法

### (1)家畜由来大腸菌のアンチバイオグラムを

CLSI2007 及び CLSI2012 の SIR 基準により作成

平成 26～27 年度農場由来大腸菌及び平成 24 年～25 年と畜場由来大腸菌の MIC データを加工し、

JANIS 集計用プログラムを一部改変し移植した JVARM データサーバーに入力した。CLSI2007 及び CLSI2012 の SIR 基準によるアンチバイオグラムを作成した。

### (2) JANIS と JVARM での測定薬剤の相関の確認

平成 21 年に JVARM において健康家畜から分離された大腸菌について、JVARM の調査薬剤（オキシテトラサイクリン；OTC、アンピシリン；ABPC、カナマイシン；KM）の寒天平板希釈法による MIC と、それぞれと同系統の JANIS の調査薬剤（ミノサイクリン；MINO、ピペラシリン；PIPC、アミカシン；AMK）の微量液体希釈法による MIC を、相関係数（スピアマン）、感度及び特異度を計算し、相関性について検討した。さらに、相関性が低かった成分について、その原因を検討するため耐性遺伝子の検出を行った。

### (3) 健康家畜由来大腸菌における寒天平板希釈法、微量液体希釈法および E-test によるコリスチン最小発育阻止濃度の比較

平成 22～26 年度に JVARM において健康家畜糞便から分離された大腸菌 126 株（牛由来：34 株、豚由来：37 株、肉用鶏由来：32 株、採卵鶏由来：23 株）を供試株とし、寒天平板希釈法、微量液体希釈法および E-test を用いて CL の MIC を測定した。EUCAST での CL のカットオフ値 4 $\mu$ g/mL を用い、各方法での MIC を相関係数等によって比較し、関係について検討した。

## C. 研究結果

### (1)家畜由来大腸菌のアンチバイオグラムを CLSI2007 及び CLSI2012 の SIR 基準により作成

平成 26～27 年度農場由来大腸菌及び平成 24～25 年と畜場由来大腸菌のアンチバイオグラムを CLSI2007 及び CLSI2012 の SIR 基準により作成する（図 1～7）とともに、動物医薬品検査所 HP（[http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai\\_p3-1.html](http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3-1.html)）に掲載した。

### (2) JANIS と JVARM での測定薬剤の相関の確認

相関係数、感度及び特異度はそれぞれ以下のとおりであった。MINO に対する OTC : 0.739、1、0.64。PIPC に対する ABPC : 0.709、1、0.899。AMK に対する KM : 0.241、1、0.873 (図 8 ~ 10)。AMK に対する KM の相関係数が低かったが、特に KM の MIC が 128 µg/mL 以上の株において、AMK の MIC との差が大きくなっていった。特異度が低かった OTC と MINO、相関係数が低かった AMK と KM について、それぞれに耐性を示した株で耐性遺伝子の検出を行ったところ、OTC のみ耐性の株は 31 株中 24 株 (77.4%) が tet(A)を、OTC と MINO 耐性の株は 18 株中 16 株 (88.9%) が tet(B)を保有していた。また、KM のみ耐性の株は調査した耐性遺伝子 6 種類のうち 0 ~ 3 種類を保有していたが、AMK 耐性の 1 株 (MIC 64 µg/mL) は 4 種類を保有していた (図 11)。

(3) 健康家畜由来大腸菌における寒天平板希釈法、微量液体希釈法および E-test によるコリスチン最小発育阻止濃度の比較

E-test における MIC は寒天平板希釈法および微量液体希釈法と比較し低い傾向が認められた。相関係数 (スピアマン)、感度および特異度は、微量液体希釈法に対する E-test : 0.684、0.806、0.958。寒天平板希釈法に対する E-test : 0.819、0.674、1.000。寒天平板希釈法に対する微量液体希釈法 : 0.801、0.721、1.000 (図 12 ~ 14) であった。

#### D. 考察

JVARM の農場及びと畜場由来の大腸菌について CLSI2007 及び CLSI2012 の SIR 基準によるアンチバイオグラムを作成し動物医薬品検査所 HP に掲載した。JVARM と JANIS の比較可能なデータを公表し、両者の連携を継続的に実施した。これまで大腸菌についてアンチバイオグラムを作成していたが、本研究班において、食品由来株については、全国の地方衛生研究所において収集されたサルモネラについてモニタリングを開始されたことから、家畜由来株と食品由来株の連携を図るためには、サルモネラについて来年度以降アンチバイオグラムを作成する必要があると考えられる。

JANIS と JVARM での測定薬剤の薬剤感受性の相関を確認した結果、PIPC に対する ABPC について相

関係数、感度、特異度ともに良好な値を示し、耐性の検出及び比較に有効であると考えられた MINO に対する OTC について、相関係数及び感度は良好な値を示したが、特異度が若干低く、耐性の検出には有効であるが、比較の際には注意が必要と考えられた。AMK に対する KM について相関係数が低く、比較に用いるには検討が必要と考えられた。耐性遺伝子検出の結果から、保有する耐性遺伝子により、KM 耐性であっても AMK の MIC が上昇せず感受性になる可能性が考えられた。

健康家畜由来大腸菌における寒天平板希釈法、微量液体希釈法および E-test によるコリスチン最小発育阻止濃度を比較した結果、E-test による MIC は寒天平板希釈法および微量液体希釈法と比較し、低い傾向が認められた。寒天平板希釈法は微量液体希釈法と比較し、MIC がやや高い株が認められたものの、相関係数、感度、特異度ともに良好な値を示し、共にモニタリングに有用であることが確認された。なお、JVARM で平成 12 ~ 24 年に収集した 9,308 株の菌株について平成 21 年までは寒天平板希釈法で、平成 22 年以降は微量液体希釈法で CL の感受性試験を実施した結果を図 15 に示す。図に示す様に MIC 2 µg/mL 以上の株の割合は増加傾向が認められておらず、家畜での CL の薬剤感受性上昇傾向は認められていない。来年度以降も CL 耐性については微量液体希釈法によりモニタリングを継続し、薬剤感受性の推移を確認していく予定である。

#### E. 結論

大腸菌について、CLSI2007 及び CLSI2012 の SIR 基準によりアンチバイオグラムを作成し動物医薬品検査所 HP に掲載した。ペニシリン系について、JANIS と JVARM での測定薬剤との薬剤感受性に高い相関があることを確認し、両モニタリングで実施された薬剤の耐性率の比較が可能であることを示した。テトラサイクリン系について OTC は MINO 耐性の検出には有効であるが比較の際には注意が必要、アミノグリコシド系の両薬剤については比較に用いるには検討が必要であることが確認された。コリスチン最小発育阻止濃度を寒天平板希釈法、微量液体希釈法および E-test で比較し、E-test は MIC 値

が低い、いずれの試験方法も相関係数、感度および特異度について良好な値を示し、CL耐性率のモニタリングに有用であることが確認された。

#### F. 健康危害情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Suzuki, S., Ohnishi, M., Kawanishi, M., Akiba, M., and Kuroda, M. Investigation of a plasmid genome database for colistin-resistance gene *mcr-1*. *Lancet Infect Dis* 16, 284-285(2016)
- (2) Makita, K., Goto, M., Ozawa, M., Kawanishi, M., Koike, R., Asai, T., and Tamura, Y. Multivariable Analysis of the Association Between Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Apparently Healthy Pigs in Japan. *Microb Drug Resist* 22, 28-39(2016)
- (3) Ozawa, M., Hiki, M., Kawanishi, M., Abo, H., Kojima, A., Asai, T., and Hamamoto, S. Molecular Typing of Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter jejuni* Isolated from Broilers in Japan Using Multilocus Sequence Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Foodborne Pathog Dis* 13, 1-7 13. (2016)
- (4) Kawanishi, M., H. Abo, M. Ozawa, M. Uchiyama, T. Shirakawa, S. Suzuki, A. Shima, A. Yamashita, T. Sekizuka, K. Kato, M. Kuroda, R. Koike, and M. Kijima. Prevalence of colistin-resistance gene *mcr-1* and absence of *mcr-2* in *Escherichia coli* isolated from healthy food producing animals in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*
- (5) Hiki M, Shimizu Y, Kawanishi M, Ozawa M,

Abo H, Kojima A, Koike R, Suzuki S, Asai, T, Hamamoto S. (2016) Evaluation of the relationship between the minimum inhibitory concentration of ceftiofur and third generation cephalosporins in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. *J. vet. diagn. invest* (in press)

- (6) 川西路子 JVARM(動物由来薬剤耐性菌モニタリング)の取り組み(2016)日本豚病研究会会報 第68号
- (7) 川西路子 動物由来細菌薬剤感受性調査(JVARM)の概要と薬剤耐性(AMR)対策アクションプランへの対応(2017)日本獣医師会雑誌 1月号

##### 2. 学会発表

- 1) 小澤真名緒、川西路子、内山万利子、阿保均、小池良治、木島まゆみ。家畜由来大腸菌における人用抗菌剤と動物用抗菌剤の最小発育阻止濃度(MIC)の関係 第159回日本獣医学会学術集会 2015年9月8日 神奈川
- 2) 内山万利子、小澤真名緒、川西路子、阿保均、小池良治、木島まゆみ。健康家畜由来大腸菌における寒天平板希釈法、微量液体希釈法およびE-testによるコリスチン最小発育阻止濃度の比較 第159回日本獣医学会学術集会 2015年9月8日 神奈川
- 3) 川西路子、阿保均、内山万利子、小澤真名緒、小池良治、木島まゆみ。健康家畜由来大腸菌におけるコリスチン耐性について 第159回日本獣医学会学術集会 2015年9月8日 神奈川

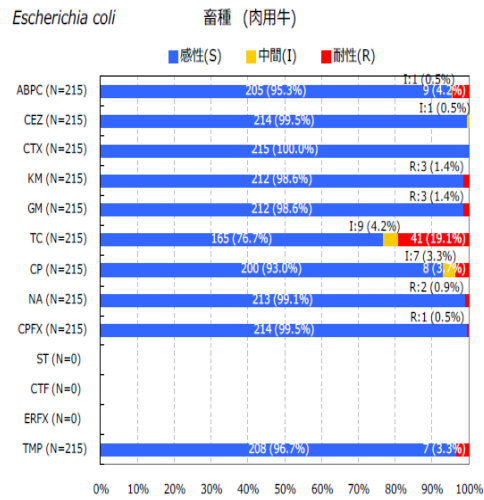
#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

JVARM事業を通して菌株の提供等ご協力いただきました全国の家畜保健衛生所の諸先生方に感謝いたします。

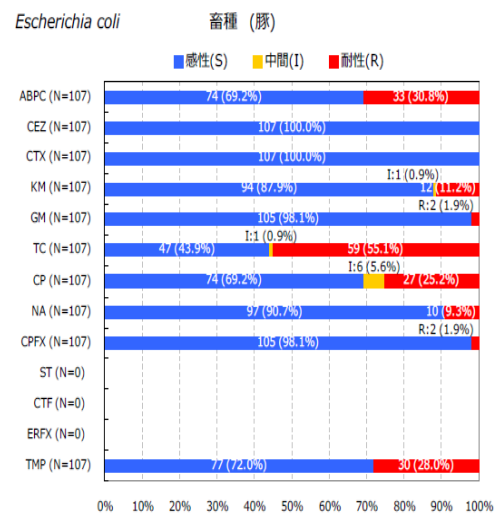
2015年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*



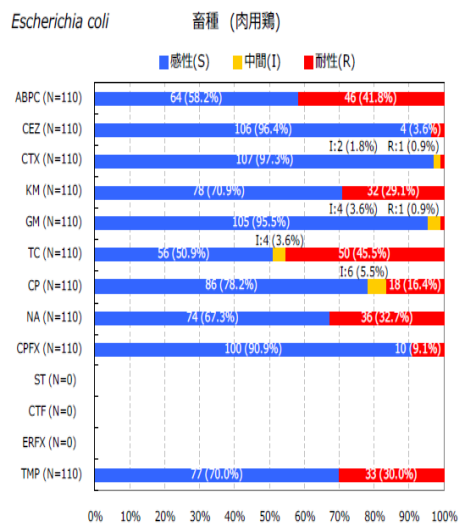
2015年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*



2015年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*



2015年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*

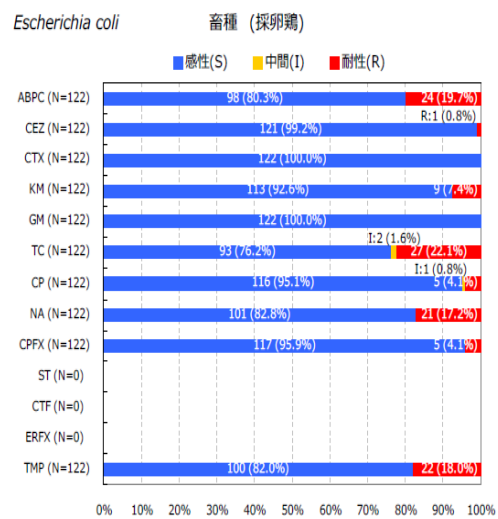
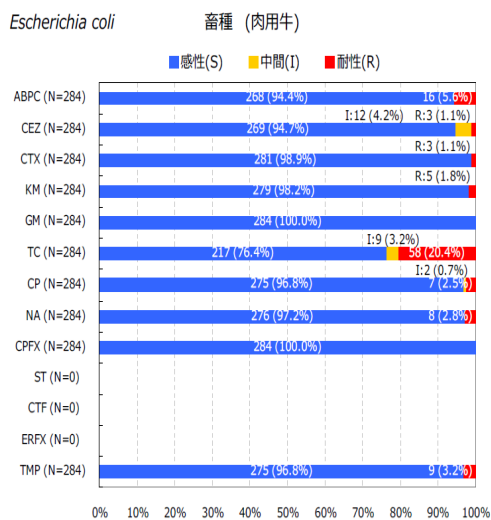


図 1. 2015 年 CLSI2007SIR 基準 JVARM 農場由来株のアンチバイオグラム

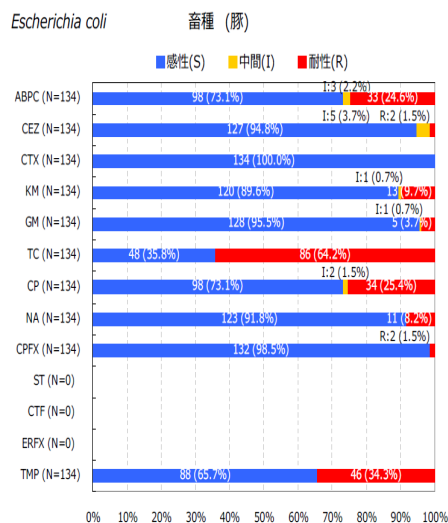
2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*



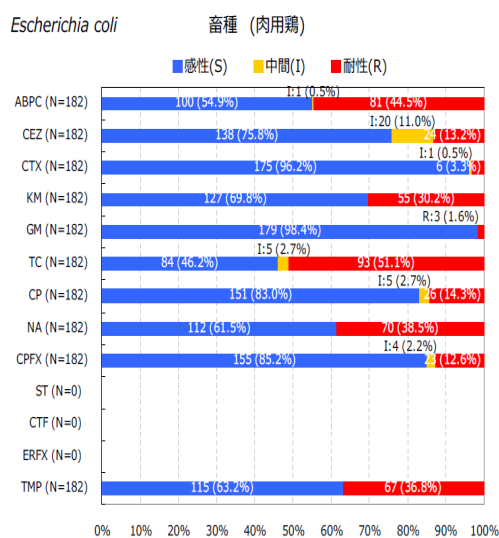
2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*



2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*



2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*

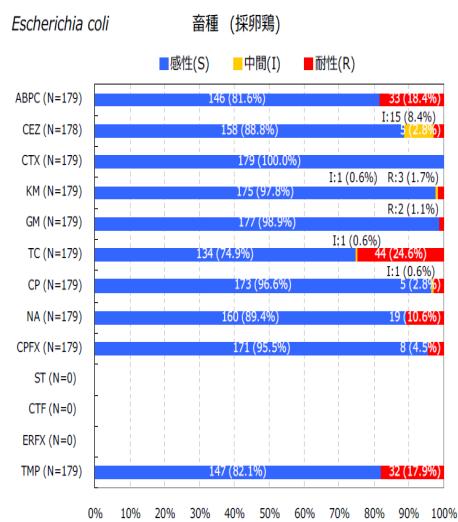
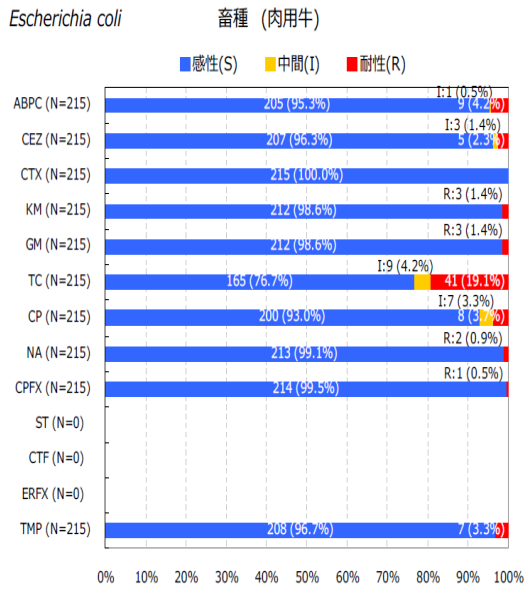


図 2. 2014年 CLSI2012SIR 基準 JVARM 農場由来株のアンチバイオグラム

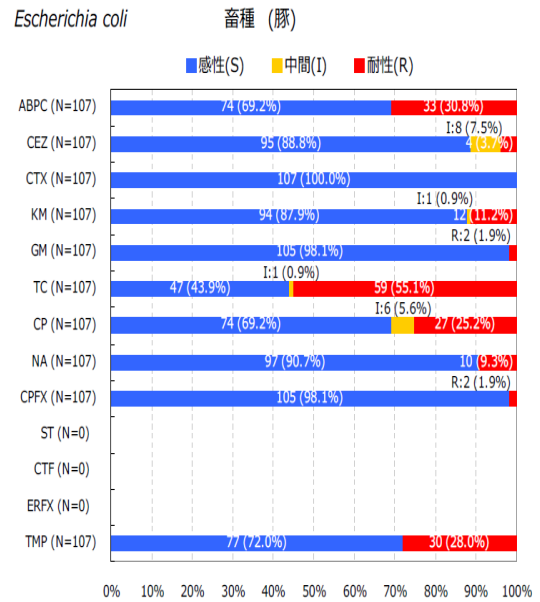
2015年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*



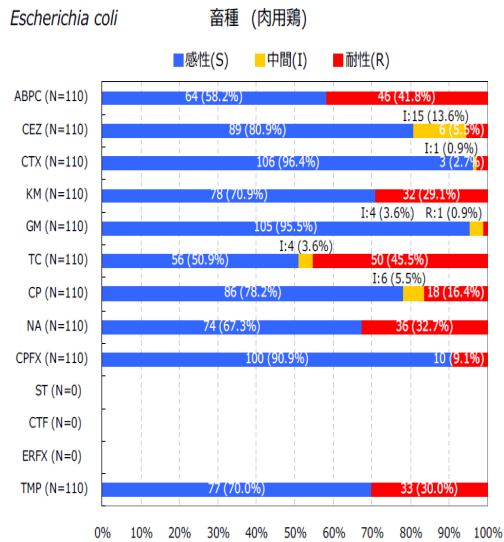
2015年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*



2015年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*



2015年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*

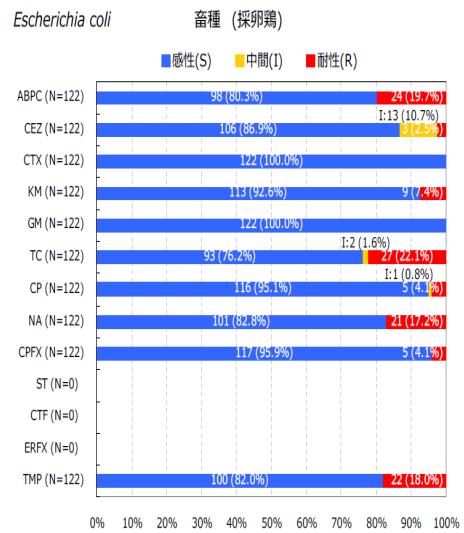
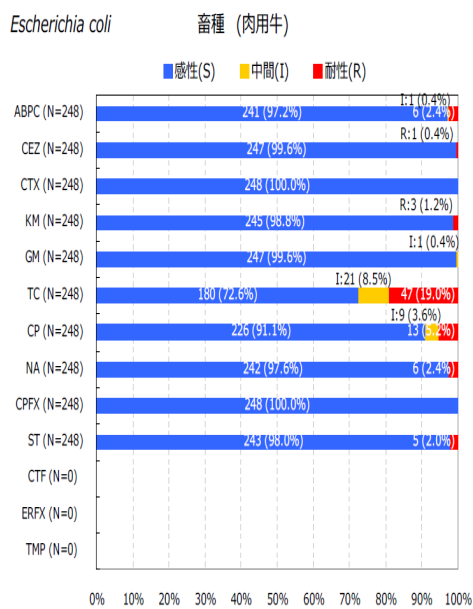


図3. 2015年 CLSI2012SIR 基準 JVARM 農場由来株のアンチバイオグラム

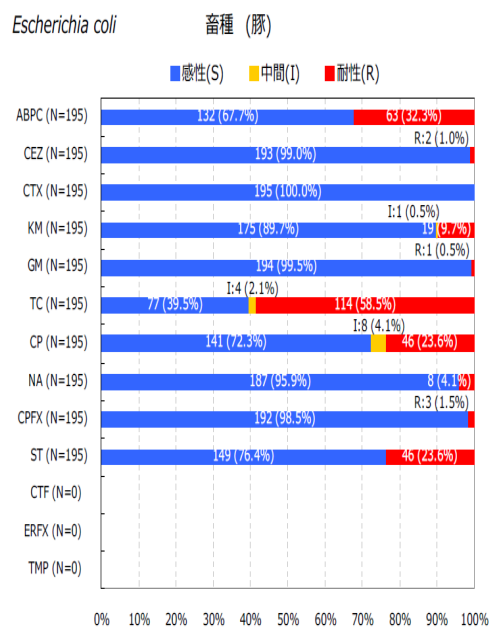
2012年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*



2012年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*



2012年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*

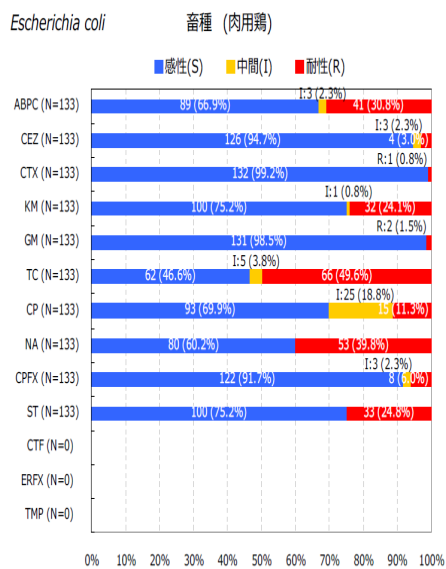
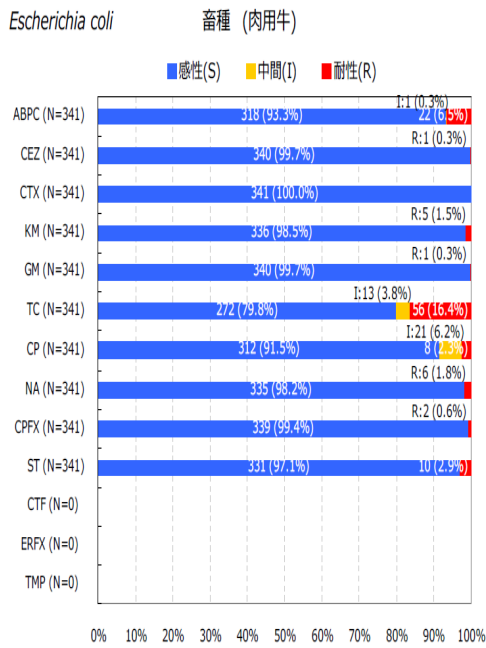


図 4. 2012年 CLSI2007SIR 基準 JVARM と畜場由来株のアンチバイオグラム



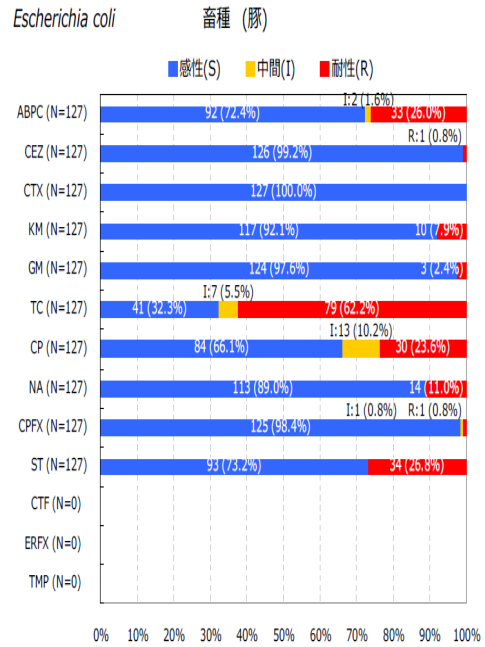
2013年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*



2013年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*



2013年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*

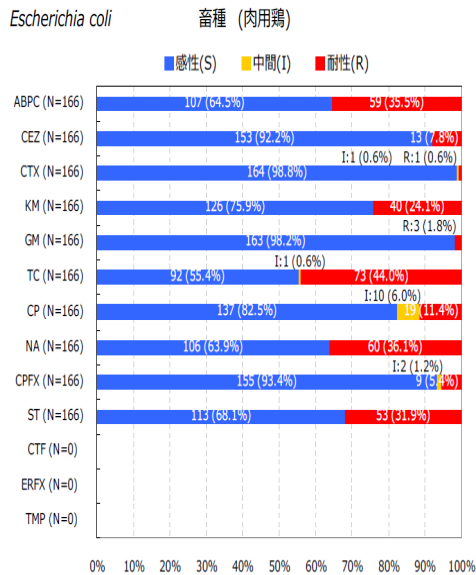
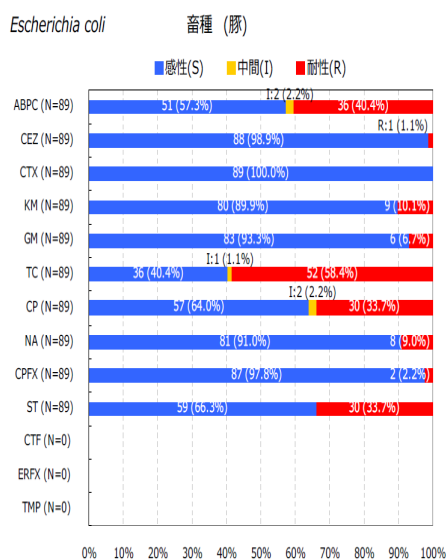


図5. 2013年 CLSI2007SIR 基準 JVARM と畜場由来株のアンチバイオグラム

2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*



2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*

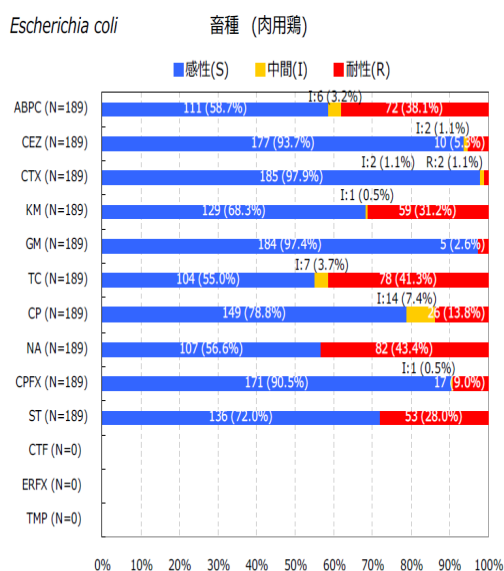
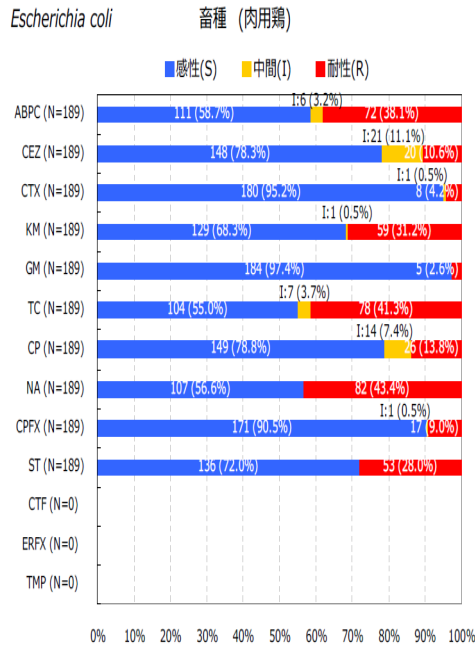


図 6. 2014 年 CLSI2012SIR 基準 JVARM と畜場由来株のアンチバイオグラム

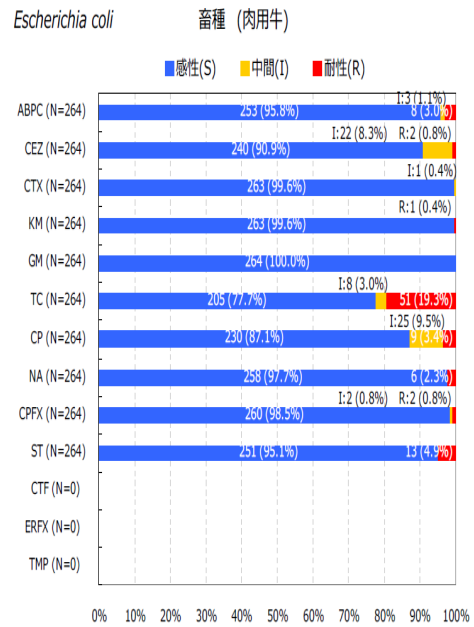
2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*



2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*



2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性\*

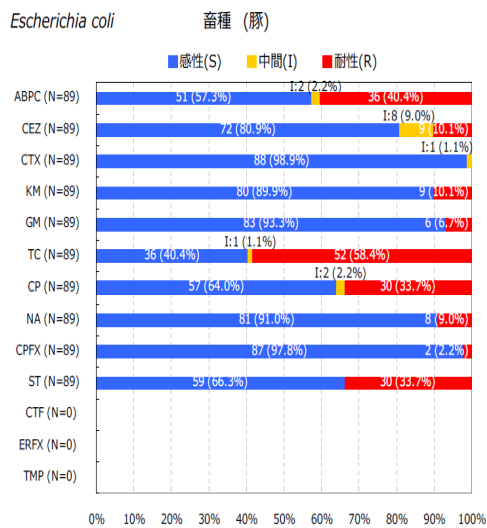


図 7. 2014 年 CLSI2007SIR 基準 JVARM と畜場由来株のアンチバイオグラム

## 結果: MINOとOTCの関係

寒天平板希釈法で測定したOTCのMIC (mg/L)	微量液体希釈法で測定したMINOのMIC (mg/L)								
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	総計
0.25	1								1
0.5		2							2
1			3						3
2				9		1			10
4					9	3			12
8						8	7		15
16							1		1
32		1							1
64					1				1
128						3	1		4
256				2	8	2	5	2	17
512				1	2	6	5	3	12
>512					2	1	1	1	5
総計		1	15	31	27	12	12	6	104

	MINO感受性	MINO耐性
OTC感受性	55	0
OTC耐性	31	18
総計	86	18

相関係数: 0.739

感度: 1 (18/18)

特異度: 0.64 (55/86)

図 8. MINO と OTC の MIC の相関

寒天平板希釈法で測定したABPCのMIC (mg/L)	微量液体希釈法で測定したPIPCのMIC (mg/L)												
	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	>512	総計
0.5	1												1
1		4											4
2			4										4
4				5									5
8					11								11
16						1							1
32							1						1
64								1					1
128									1				1
256										1			1
512											1		1
>512												1	1
総計	1	17	47	10	2	2	4	3	10	8	20		104

	PIPC感受性	PIPC耐性
ABPC感受性	71	0
ABPC耐性	8	25
計	79	25

相関係数: 0.709

感度: 1 (25/25)

特異度: 0.899 (71/79)

図 9. PIPC と ABPC の MIC の相関

## 結果:AMKとKMの関係

寒天平板希釈法で 測定したKMの MIC(mg/L)	微量液体希釈法で測定したAMKのMIC (mg/L)						総計
	1	2	4	8	16	32	
1	1						1
2	2	11	7				20
4	6	22	14	2	1		45
8	1	7	8		2		18
16		2	1		1		4
32			1				1
64							
128		2		1			3
256							
512							
>512	1	3	5		1		11
総計	11	47	36	3	5		103

	AMK感受性	AMK耐性
KM感受性	89	0
KM耐性	13	1
計	102	1

相関係数:0.241  
 感度:1(1/1)  
 特異度:0.873(89/102)

図 10. AMK と KM の MIC の相関

株	MIC (μg/mL)		アミノグリコシド耐性遺伝子					
	AMK	KM	strA	strB	aph(3')-lia	aac(3)-lia	aac(6')-lb	ant(3'')-la
21-Ec-C-67	1	>512	-	+	+	-	-	+
21-Ec-C-54	2	128	-	-	-	-	-	+
21-Ec-C-66	2	128	-	+	-	+	-	+
21-Ec-L-99	2	>512	-	+	+	-	+	-
21-Ec-P-43	2	>512	-	-	+	-	-	+
21-Ec-P-95	2	>512	-	-	+	-	-	-
21-Ec-C-28	4	>512	-	+	+	-	-	-
21-Ec-C-70	4	>512	-	+	+	-	-	-
21-Ec-C-89	4	>512	-	+	+	-	-	-
21-Ec-L-44	4	>512	-	-	-	-	-	-
21-Ec-L-98	4	>512	-	+	+	-	+	-
21-Ec-C-53	8	128	-	-	-	-	-	-
21-Ec-P-91	16	>512	-	+	+	-	-	-
21-Ec-P-110	64	>512	-	+	+	-	+	+

図 11. KM 耐性株におけるアミノグリコシド耐性遺伝子

### 結果:微量液体希釈法とE-testの関係性

E-testによる MIC( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	微量液体希釈法によるMIC( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )							
	$\leq 0.125$	0.25	0.5	1	2	4	8	total
0.047	1	1	1					3
0.064		1	2	1				4
0.094	11	9	6	10	1	1		38
0.125	3	10	7		10			30
0.19	3	3	3	1				10
0.25								0
0.5								0
1								0
2					2	2		4
3					5	3		8
4					3	14		17
6					1	8		9
8						1	1	2
12						1		1
total	18	24	19	12	22	30	1	126

	微量液体希釈法 感受性	微量液体希釈法 耐性	
E-test感受性	91	6	感度 : 0.806 (25/31)
E-test耐性	4	25	特異度 : 0.958 (91/95)
total	95	31	相関係数(Pearson): 0.824 相関係数(Spearman): 0.684

図 12. コリスチンの微量液体希釈法と E-test の MIC の相関

### 結果:寒天平板希釈法とE-testの関係性

E-testによる MIC( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	寒天平板希釈法によるMIC( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )							
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	total
0.047		3						3
0.064		4						4
0.094	1	36			1			38
0.125		26	3		1			30
0.19		10						10
0.25								0
0.5								0
1								0
2					3	1		4
3					6	2		8
4					5	12		17
6						9		9
8							2	2
12							1	1
total	1	79	3	0	16	24	3	126

	寒天平板希釈法 感受性	寒天平板希釈法 耐性	
E-test感受性	83	14	感度 : 0.674 (29/43)
E-test耐性	0	29	特異度 : 1.000 (83/83)
total	83	43	相関係数(Pearson): 0.942 相関係数(Spearman): 0.819

図 13. コリスチンの寒天平板希釈法と E-test の MIC の相関

## 結果: 寒天平板希釈法と微量液体希釈法の関係性

微量液体希釈法によるMIC( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	寒天平板希釈法によるMIC( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )							
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	total
$\leq 0.125$	1	17						18
0.25		24						24
0.5		16	2		1			19
1		12						12
2		10	1		7	4		22
4					8	20	2	30
8							1	1
total	1	79	3	0	16	24	3	126

微量液体希釈法	寒天平板希釈法		感度 : 0.721 (31/43) 特異度 : 1.000 (83/83) 相関係数(Pearson): 0.843 相関係数(Spearman): 0.801
	感受性	耐性	
感受性	83	12	
耐性	0	31	
total	83	43	

図 14. コリスチンの寒天平板希釈法と微量液体希釈法の MIC の相

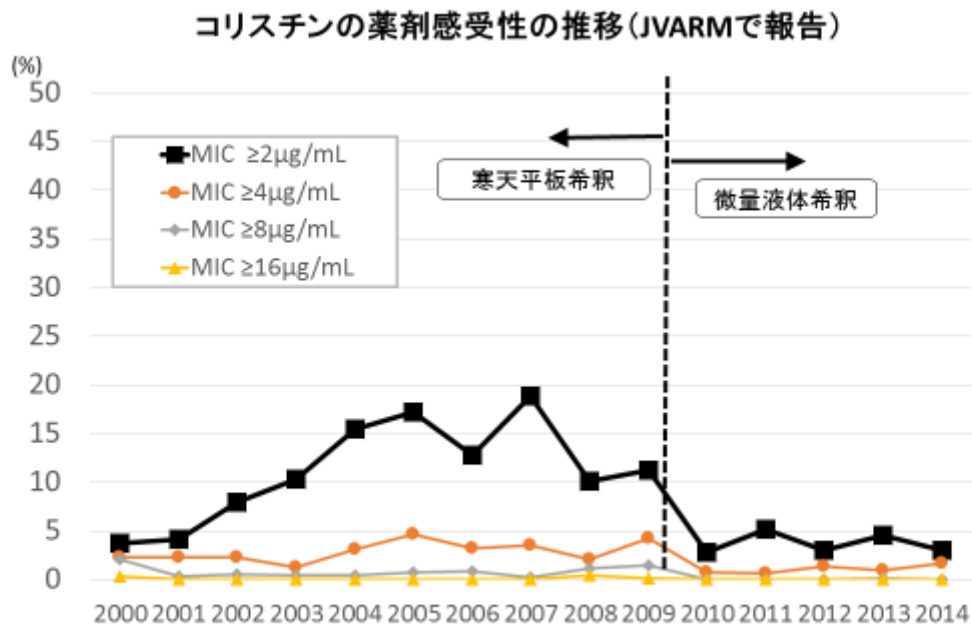


図 15. JVARM におけるコリスチンの薬剤感受性の推移