

平成27－29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：小池 良治（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）

研究協力者：比企 基高（農林水産省消費・安全局）

研究協力者：鈴木 里和（国立感染症研究所）

研究協力者：柴山 恵吾（国立感染症研究所）

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、①動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM) の農場由来（平成 26 年～27 年）、と畜場及び食鳥処理場由来（平成 24～27 年度）大腸菌及びサルモネラの MIC データを国立感染症研究所で作成されたアンチバイオグラム作成ソフトに入力し、アンチバイオグラムを作成した。また、②JANIS 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（セフトキシム；CTX、レボフロキサシン；LVFX 及びシプロフロキサシン；CPFX、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（セフトフル；CTF、エンロフロキサシン；ERFX、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。CTF と CTX、ERFX と LVFX と CPFX、ABPC と PIPC については、相関係数、感度、特異度ともに良好な値を示し、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。

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。さらに、伝達性耐性遺伝子 *mcr-1* が国産の鶏肉からも検出されており、新たなプラスミド性コリスチン耐性遺伝子 *mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4*、*mcr-5* が国内外

で報告されていることから平成 24～27 年度に食鳥処理場及びと畜場で分離された大腸菌におけるコリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* から *mcr-5* の保有状況について確認した。その結果 *mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4* は検出されず、*mcr-1* 及び *mcr-5* 遺伝子は検出されたが低率であった。

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、動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM) のデータを、国立感染症研究所で作成されたソフトに入力し、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、セファロスポリン系、フルオロキノロン系、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。

さらに伝達性耐性遺伝子 *mcr-1* が国産の鶏肉から

も検出されおり、新たなプラスミド性コリスチン耐性遺伝子 *mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4*、*mcr-5* が国内外で報告されていることから、家畜で使用されるコリスチンのヒト医療への影響について評価するために家畜におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況を把握することを目的とした。

B. 研究方法

(1) JVARM のアンチバイオグラムの作成

平成 26～27 年度農場由来大腸菌及び平成 24 年～27 年度と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌及びサルモネラの MIC データを、国立感染症研究所で作成されたアンチバイオグラム作成ソフトに入力し、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 (セフトオフル CTF、エンロフロキサシン; ERFX、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 (セフトオタキシム; CTX、レボフロキサシン; LVFX 及びシプロフロキサシン; CPFX、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 μ 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。

(4) と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況について確認する。

平成 24～27 年度の MIC2mg/L 以上の株 (表 1) について遺伝子を抽出し、各コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* から *mcr-5* について既報の論文の PCR 法 (表 2) に基づき、遺伝子を検出した。

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 24～27 年度と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌及びサルモネラ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 (例: 図 1) とともに、動物医薬品検査所 HP

(http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3-1.htm 1) 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。CTX に対する CTF : 0.764、0.98、1.00。

LVFX に対する ERFX 及び CPFX : 0.763、1、0.899 及び 0.929、1、0.980。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 2～7)。

AMK と KM の相関係数が低かったが、特に KM の MIC が 128 μ g/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 μ g/mL) は 4 種類を保有していた (図 8)。

(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 は寒天平板希釈法及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 9～11) であった。

(3) と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況について

mcr-2、*mcr-4* 及び *mcr-3* 遺伝子についていずれの菌株からも分離されなかった。*mcr-1* は牛由来株からは検出されなかったが、豚由来株では平成 24 年 2 株 (1.0% : 割合は、各年の各動物種由来株全株に対するもの)、平成 25 年 1 株 (0.8%)、平成 26 年 1 株 (1.1%)、平成 27 年 0 株 (0%) 分離され、鶏由来株からは、平成 24 年 0 株 (0%)、平成 25 年 4 株 (2.4%)、平成 26 年 2 株 (1.2%)、平成 27 年 9 株 (4.9%) 検出された。また、*mcr-5* 遺伝子は牛由来株は平成 27 年のみ 1 株 (0.4%)、豚由来株では平成 24 年のみ 1 株 (0.5%) 分離され、鶏由来株からは、平成 24 年 3 株 (2.3%)、平成 25 年 3 株 (1.8%) 平成 26 年 1 株 (0.6%) 検出された (図 12)。

D. 考察

JVARM の家畜由来細菌におけ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 では平成 24 年度から、健康家畜由来のモニタリングについては農場由来株だけでなくと畜場及び食鳥処理場由来株について実施しており、平成 28 年度については農場由来株の調査を中止し、と畜場由来株のみとする。そのため、28 年度からは JVARM のと畜場及び食鳥処理場由来の大腸菌についてアンチバイオグラムを作成した。また、本事業において全国の地方衛生研究所において収集された食品由来のサルモネラのモニタリングが開始されたことから、平成 29 年度食鳥処理場由来のサルモネラについてもアンチバイオグラムを作成した。以上のように

JVRAM 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。今後「薬剤耐性ワンヘルス動向調査報告書」及び「ワンヘルス Web サイト」に活用することが可能であると考えられる。

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、CTX に対する CTF、LVFX 及び CPFX に対する ERFX、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。

また、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子の動向を把握するため、と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌における *mcr-1* ~ *mcr-5* 遺伝子の保有状況について確認したところ、*mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4* 遺伝子は検出されず、*mcr-1* 及び *mcr-5* 遺伝子は検出されたが低率であった。臼井らの日本の一部の豚由来株における報告 (2017 Int J Antimicrob Agents) においても、病畜由来株からは *mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5* が検出されているが、農場における健康な豚由来からは今回の調査と同様に *mcr-1* 及び *mcr-5* のみが低率に分離されている。

なお、コリスチン耐性については、食品安全委員会におけるリスクの程度は「中等度」との評価を受けて、農林水産省では動物用医薬品としては、これまでに食品安全委員会が「中等度」と評価した医療上重要度の高いフルオロキノロン製剤などと同様、

平成 30 年 4 月以降コリスチンを第二次選択薬として位置づけ、飼料添加物としては指定を取り消す予定である。

来年度以降コリスチンにおけるリスク管理措置の効果を検証し、ヒト医療への影響について評価するためにも引き続きと畜場及び食鳥処理場由来大腸菌におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子を調査していく必要がある。

E. 結論

農場由来大腸菌、と畜場及び食鳥処理場由来の大腸菌及びサルモネラについて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。セファロスポリン系、フルオロキノロン系及びペニシリン系について、JANIS と JVARM 間での測定薬剤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 値が低いものの、寒天平板希釈法、微量液体希釈法は相関係数、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。

と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の検出の結果、*mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4* 遺伝子は検出されず、*mcr-1* 及び *mcr-5* 遺伝子は検出されたが低率（各年、動物種毎に 5% 以下）であった。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiki M, Kawanishi M, Abo H, Kojima A, Koike R, Hamamoto S, Asai T. Decreased Resistance to Broad-Spectrum Cephalosporin in *Escherichia coli*

from Healthy Broilers at Farms in Japan After Voluntary Withdrawal of Ceftiofur. Foodborne Pathog Dis. 2015;12:639-43.

- 2) 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
- 3) Hiki M, Shimizu Y, Kawanishi M, Ozawa M, Abo H, Kojima A, Koike R, Suzuki S, Asai T, Hamamoto S. 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. 29(5):716-720 (2017).
- 4) 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
- 5) 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」日本獣医師会雑誌 2017 年、70 巻 1 号、p 14-17

2.学会発表

- 1) 川西路子、比企 基高、阿保 均、小澤 真名緒、小池 良治、濱本 修一、柴山恵吾、鈴木里和。院内感染対策サーベイランス (JANIS) と家畜由来細菌の薬剤耐性モニタリング (JVARM) の連携について第 158 回日本獣医学会学術集会 2015 年 9 月 青森
- 2) 比企 基高、清水裕仁、川西路子、阿保 均、小澤 真名緒、小池 良治、濱本 修一。家畜由来大腸菌におけるセフトロフルと人用の各種第 3 世代セファロスポリンとの最小発育阻止濃度 (MIC) の関係 第 158 回日本獣医学会学術集会 2015 年 9 月 青森
- 3) 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 2016 年 9 月 神奈川

- 4) 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 2016 年 9 月 神奈川
- 5) 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 2016 年 9 月 神奈川
- 6) 川西路子。食用動物由来のコリスチン耐性の現状とコリスチンのリスク評価及びリスク管理措置について」抗菌剤研究会シンポジウム 2017 年 4 月 東京
- 7) 川西路子。動物由来薬剤耐性モニタリング (JVARM) 第 27 回感染研シンポジウム 2017 年 5 月 感染研)
- 8) 川西路子。動物由来薬剤耐性モニタリング (JVARM) の概要と薬剤耐性日本公衆衛生学会一地方衛生研究所フォーラム-2017 年 10 月 鹿児島
- 9) 川西路子 動物由来薬剤耐性モニタリング (JVARM) の概要について 平成 29 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部研究会 2017 年 11 月 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

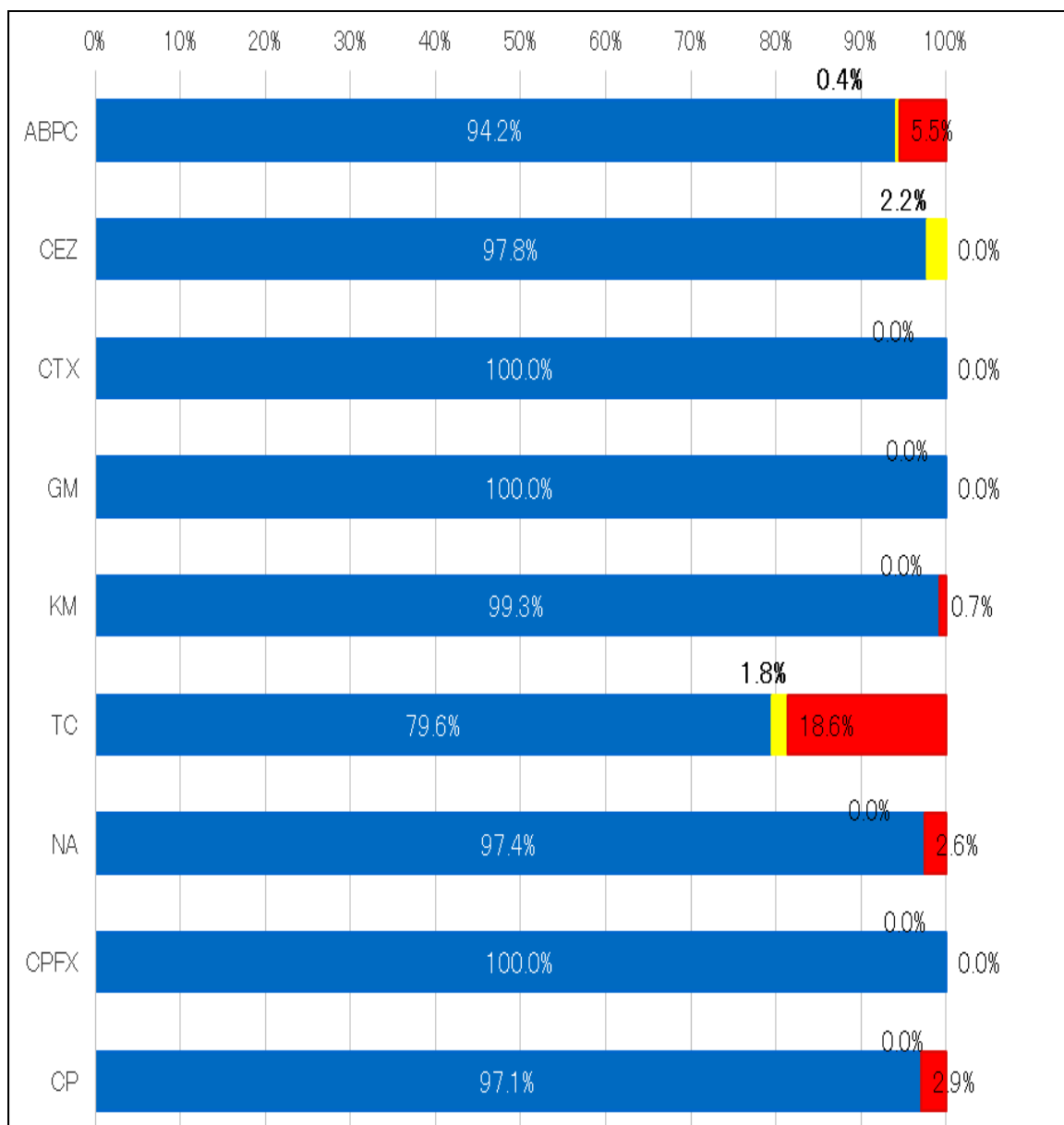
※ JVARM事業を通して菌株の提供等ご協力いただきました全国の家畜保健衛生所の諸先生方に深謝いたします。

図1 アンチバイオグラムの例（2015年 と畜場由来株）

主要菌の抗菌薬感受性

Escherichia coli 畜種（肉用牛 N=274）

■ 感性(S) ■ 中間(I) ■ 耐性(R)



寒天平板希釈法で測定したCTFのMIC (mg/L)	微量液体希釈法で測定したCTXのMIC (mg/L)								Total	
	≤0.5	1	2	4	8	16	32	64		>64
0.5	4		1							5
1	4									4
2	1	3	4							8
4		1	1	2						4
8				6	7					13
12				8	12	6	1			27
>12				5	13	13	6	12	8	57
Total	9	4	6	21	32	19	7	12	8	118

	CTX感受性	CTX耐性
CTF感受性	19	2
CTF耐性	0	97
Total	19	99

相関係数(スピアマン): 0.764
 感度: 0.980(97/99)
 特異度: 1.00(19/19)

図2. CTF と CTX の MIC の相関

寒天平板希釈法で測定したERFXのMIC (mg/L)	微量液体希釈法で測定したLVFXのMIC (mg/L)										
	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	Total
0.125	20	5									25
0.25	11	13	5	5	9						43
0.5	3			2	8	1					14
1					4	2					6
2		1		1	2		1				5
4					1		2				3
8											
16								2	1		3
32										1	1
64									1	2	3
Total	34	19	5	8	24	3	3	2	2	3	103

	LVFX感受性	LVFX耐性
ERFX感受性	88	0
ERFX耐性	10	5
Total	98	5

相関係数(スピアマン): 0.763
 感度: 1(5/5)
 特異度: 0.899(88/98)

図3. ERFX と LVFX の MIC の相関

微量液体希釈法で 測定したCPF _X の MIC(mg/L)	微量液体希釈法で測定したLVFXのMIC(mg/L)										Total
	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	
0.03	34	18	2								54
0.06		1	3								4
0.125				5	1						6
0.25				3	18	1					22
0.5					5						5
1						2	1				3
2							2				2
4											
8								2	1	1	4
16									1		1
32										2	2
Total	34	19	5	8	24	3	3	2	2	3	103

	LVFX感受性	LVFX耐性
CPF _X 感受性	96	0
CPF _X 耐性	2	5
Total	98	5

相関係数(スピアマン):0.929
 感度:1(5/5)
 特異度:0.980(96/98)

図4. CPF_X と LVFX の MIC の相関

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	1		1				3
1			3	9	1				13
2				9	3	1			22
4				8	7				15
8				1		1			1
16		1					1		1
32								1	1
64				1					1
128					3	1	1		5
256				2	8	2	5	2	19
512				1	2	6	5	3	17
>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5. 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	1									9
2			5	11	1								17
4			4	21	1								26
8		1	2	7	6								16
16				2	1								3
32													2
64		1				1							2
128						1							3
256			1	2									4
512								1		1	2		4
>512								1	4	2	6	7	20
総計	1	17	47	10		2		2	4	3	10	8	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6. 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7. 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')-Iia	aac(3)-Iia	aac(6)-Ib	ant(3)-Ia
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8. 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($\mu\text{g}/\text{mL}$)							
	≤ 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9. 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10. 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
≤ 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

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

図 11. コリスチンの寒天平板希釈法と微量液体希釈法の MIC の相関

表1 と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌の菌株数及びMIC2 mg/L以上の菌株数

		平成 24 年	平成 25 年	平成 26 年	平成 27 年
全株数	牛	248	341	263	274
	豚	195	127	93	96
	鶏	133	166	172	184
MIC2mg/L 以上の株数	牛	3	4	5	3
	豚	7	2	2	2
	鶏	6	8	3	12

表2 コリスチン耐性遺伝子検出のPCR

コリスチン耐性遺伝子	プライマー配列	参考文献
<i>mcr-1</i>	F 5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3'	Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016;16(2):161-8.
	R 5'-CTTGGTGCGTCTGTA GGG-3'	
<i>mcr-2</i>	F 5' TGGTACAGCCCCTTTATT 3'	Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, <i>mcr-2</i> , in <i>Escherichia coli</i> , Belgium, June 2016. Euro Surveill. 2016;21(27):
	R 5' GCTTGAGATTGGGTTATGA 3'	
<i>mcr-3</i>	F 5'TTGGCACTGTATTTTGCATTT-3'	Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y. 2017. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene <i>mcr-3</i> in <i>Escherichia coli</i> . mBio 8:e00543-17.
	R 5' TTAACGAAATTGGCTGGAACA-3'	
<i>mcr-4</i>	F 5' ATTGGGATAGTCGCCTTTTT 3'	Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, Pezzotti G, Magistrati CF. Novel plasmid-mediated colistin resistance <i>mcr-4</i> gene in <i>Salmonella</i> and <i>Escherichia coli</i> , Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. Euro Surveill. 2017;22(31):
	R 5' TTACAGCCAGAATCATTATCA 3'	
<i>mcr-5</i>	F 5'-ATGCGGTTGTCTGCATTTATC-3'	Maria Borowiak, Jennie Fischer, Jens A. Hammerl, Rene S. Hendriksen, Istvan Szabo and Burkhard Malorn. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, <i>mcr-5</i> , conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi B. J Antimicrob Chemother doi:10.1093/jac/dkx327
	R 5'-TCATGTGGTTGTCCTTTCTG-3'	

図 12 と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌株の *mcr1* 及び *mcr5* 遺伝子保有株数及び保有率

