

2010年1月27日

## 鶏肉におけるボルトン-CCDAの検出系で雑菌として分離される菌株 に関する検討結果報告書

国立医薬品食品研究所  
食品衛生管理部 五十君静信 殿

関東化学株式会社 久保 亮一  
中野 倫太  
戸田 政一

この度、お預かり致しました3菌株(大腸菌およびクレブシエラ2株)に付きまして解析致しましたので、お知らせいたします。このうちクレブシエラ KT106 につきましては、検討に使われた従来のボルトン-CCDA 培地系で抑制されていたので、発育を認めた2株について報告いたします。

ボルトン-CCDA の検出系で雑菌が著しく発生し、検出成績を低減させていたと言うことで、この菌株を頂きましたが、過去において大腸菌やクレブシエラによって影響を受けたことが無いことから、耐性菌を疑い検討致しました。

### 【検討内容】

- 国立医薬品食品研究所にて分離された腸内細菌3株について、カンピロバクター選択増菌培地、及び分離培地における発育性を調査いたしました。
- 上記3株について6種類の抗菌薬における最小発育阻止濃度(MIC)を測定いたしました。
- 既法に従ってESBL および AmpC 産生菌の推定を行いました。

### 【結果の概要】

- *Klebsiella* sp. KT106 は、今回検討したすべての選択増菌培地、及び分離培地によって発育が抑制されました。
- *E.coli* KT105 は、Bolton selective broth、及びCCDA(Ox)において発育が抑制されませんでした。また、CPZ 耐性を示し、MIC はCCDA(Ox)の添加濃度より高値を示しました。
- *Klebsiella* sp. KT104 は、Bolton selective broth、CCDA(Ox)、Skirrow 処方において発育が抑制されませんでした。また、CPZ、CAZ、CTX に耐性を示し、CPZ のMIC はCCDA(Ox)の添加濃度より高値を示しました。
- *E.coli* KT105、*Klebsiella* sp. KT104 ともCTX-M型のESBLであることが疑われました。

【結語】

今回の検討に用いた *E.coli* KT105 と *Klebsiella* sp. KT104 は、Bolton selective broth、及び CCDA(Ox)に含まれている CPZ に耐性を示す株でした。クラブラン酸で阻害がかかることから CLSI ガイドラインに従って、ESBL 産生菌とみられ、さらに CTX を優位に分解しているために現在、食鳥を中心に汚染が広がっているとされている CTX-M 型の ESBL と推定されました。

ボルトン-CCDA 培地の系以外が比較的成績がよかったのは、これらの系に使用されている培地に選択剤として ESBL に有効と思われるコリスチンやポリミキシン B が利用されているからと思われる。

試験方法および結果の詳細

【試験菌株】

*Escherichia coli* ATCC25922  
*Klebsiella* sp. KT104

*E.coli* KT105  
*Klebsiella* sp. KT106

【使用培地】

SCD agar	自家調製
CCDA (SEL)(関東化学)	Lot.9V1391
CCDA(Ox) (関東化学)	Lot.9W0921
Bolton selective broth	自家調製*
Preston selective broth	自家調製*
Nutrient broth (5%馬血液含む)	自家調製*
Skirrow 処方	自家調製*
Butzler 処方	自家調製*
Campylobacter Blood-Free Selective agar base (OXOID)	
Muller-Hinton agar (OXOID)	

\*: OXOID 社の基礎培地、サプリメントを使用して自家調製

【抗菌薬】

セフトジジム (CAZ)* <sup>1</sup>	セフトキシム (CTX)* <sup>1</sup>
セフトペラゾン (CPZ)* <sup>1</sup>	ピペラシン/タゾバクタム (PIP/TAZ=8/1)* <sup>2</sup>
アズトレオナム (AZT)* <sup>3</sup>	セフトペラゾン/スルバクタ (CPZ/ABT=1/1)* <sup>4</sup>

\*1: Sigma 社

\*2: ゾシン 静注用 (大正富山薬品)

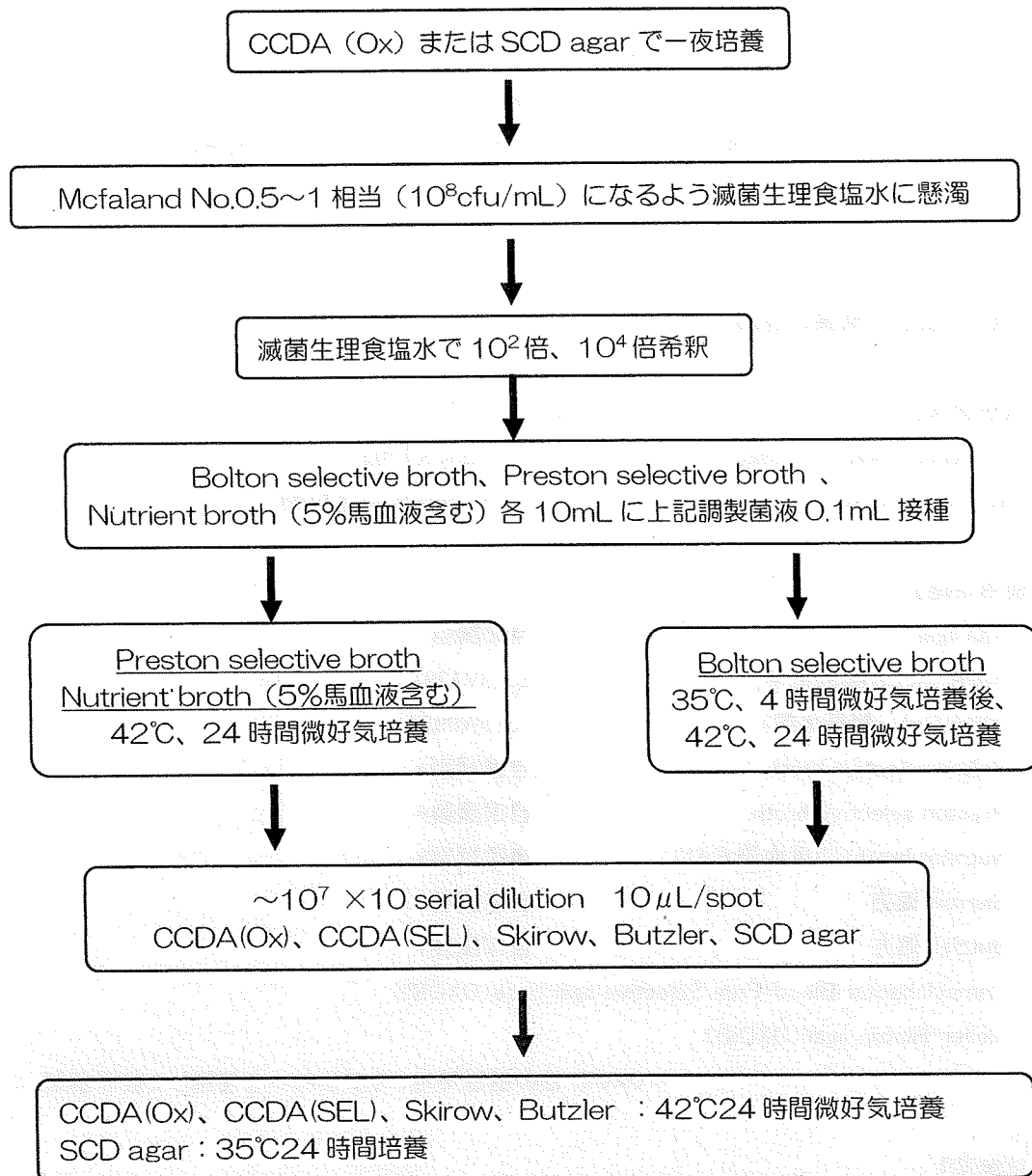
\*3: アザクタム 静注用 (エーザイ)

\*4: スルペラゾン (ファイザー)

【試験方法】

1) 選択性の追試

下図に示す方法にて実施した。



## 2) MIC の測定

CLSI の寒天希釈法に準じて実施し、Muller-Hinton agar は 35°C20 時間培養、Campylobacter Blood-Free Selective agar base は 42°C24 時間好気培養(発育が見られない濃度は 48 時間まで延長)後に判定した。

## 3) ESBL、AmpC の推定

ESBL は CLSI の disk 法による判定、AmpC は Arakawa らの方法(J.Clin.Micro., 2551-2558、2005)にしたがって行った。

### 【結果】

#### 1) 選択性の追試

4 菌株の試験結果を表 1-4 に示した。*E.coli* ATCC25922 と *Klebsiella* sp. KT106 は、検討に用いた全ての選択増菌培地、及び分離培地において発育が抑制された。一方、*E.coli* KT105 は Bolton selective broth と CCDA(Ox)において発育が抑制されなかった。また、*Klebsiella* sp. KT104 は Bolton selective broth、CCDA(Ox)、Skirrow 処方において発育が抑制されなかった。

菌株	培地	発育
<i>E. coli</i> ATCC25922	Bolton selective broth	+
	CCDA(Ox)	+
	Skirrow	+
	分離培地	+
<i>E. coli</i> KT105	Bolton selective broth	+
	CCDA(Ox)	+
	Skirrow	+
	分離培地	+
<i>Klebsiella</i> sp. KT104	Bolton selective broth	+
	CCDA(Ox)	+
	Skirrow	+
	分離培地	+
<i>Klebsiella</i> sp. KT106	Bolton selective broth	+
	CCDA(Ox)	+
	Skirrow	+
	分離培地	+

表1 *Klebsiella sp.* KT104

増菌培地	接種菌の 希釈倍率	平板培地	希釈段階						
			原液	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
Nutrient broth (5%馬血液含)	10 <sup>2</sup>	SCD	+	+	+	+	20-30	0	1
		CCDA (OX)	+	+	+	+	18	2	1
		CCDA (SEL)	30-40	2	1	0	0	0	0
		バツラー	+	20-30	1	0	0	0	0
		スキロー	+	+	+	+	18	4	0
	10 <sup>4</sup>	SCD	+	+	+	+	18	2	0
		CCDA (OX)	+	+	+	+	16	2	0
		CCDA (SEL)	30-40	2	0	0	0	0	0
		バツラー	+	+	2	1	0	0	0
		スキロー	+	+	+	+	18	2	0
Preston selective broth	10 <sup>2</sup>	SCD	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (OX)	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	0	0	0	0	0	0	0
		スキロー	0	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>4</sup>	SCD	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (OX)	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	0	0	0	0	0	0	0
		スキロー	0	0	0	0	0	0	0
Bolton selective broth	10 <sup>2</sup>	SCD	+	+	+	+	20-30	3	0
		CCDA (OX)	+	+	+	+	20-30	2	1
		CCDA (SEL)	30-40	2	1	0	0	0	0
		バツラー	+	3	0	0	0	0	0
		スキロー	+	+	+	+	18	1	0
	10 <sup>4</sup>	SCD	+	+	+	+	14	1	0
		CCDA (OX)	+	+	+	+	20-30	0	0
		CCDA (SEL)	40-50	1	0	0	0	0	0
		バツラー	+	2	0	0	0	0	0
		スキロー	+	+	+	+	10	1	0

表 2 *E.coli* KT105

増菌培地	接種菌の 希釈倍率	平板培地	希釈段階						
			原液	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
Nutrient broth (5%馬血液含)	10 <sup>2</sup>	SCD	+	+	+	+	30-40	4	0
		CCDA (OX)	+	+	+	+	20-30	4	1
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	+	0	0	0	0	0	0
		スキロー	+	9	2	0	0	0	0
	10 <sup>4</sup>	SCD	+	+	+	+	30-40	3	1
		CCDA (OX)	+	+	+	+	+	6	0
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	+	0	0	0	0	0	0
		スキロー	+	4	0	0	0	0	0
Preston selective broth	10 <sup>2</sup>	SCD	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (OX)	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	0	0	0	0	0	0	0
		スキロー	0	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>4</sup>	SCD	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (OX)	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	0	0	0	0	0	0	0
		スキロー	0	0	0	0	0	0	0
Bolton selective broth	10 <sup>2</sup>	SCD	+	+	+	+	30-40	2	1
		CCDA (OX)	+	+	+	+	20-30	3	0
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	+	0	0	0	0	0	0
		スキロー	+	3	0	0	0	0	0
	10 <sup>4</sup>	SCD	+	+	+	+	40-50	5	0
		CCDA (OX)	+	+	+	+	40-50	4	1
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	+	0	0	0	0	0	0
		スキロー	+	0	0	0	0	0	0

表 3 *Klebsiella sp.* KT106

増菌培地	接種菌の 希釈倍率	平板培地	希釈段階						
			原液	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
Nutrient broth (5%馬血液含)	10 <sup>2</sup>	SCD	+	+	+	+	8	0	0
		CCDA (OX)	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	0	0	0	0	0	0	0
		スキロー	+	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>4</sup>	SCD	+	+	+	+	8	0	0
		CCDA (OX)	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	0	0	0	0	0	0	0
		スキロー	+	0	0	0	0	0	0
Preston selective broth	10 <sup>2</sup>	SCD	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (OX)	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	0	0	0	0	0	0	0
		スキロー	0	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>4</sup>	SCD	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (OX)	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	0	0	0	0	0	0	0
		スキロー	0	0	0	0	0	0	0
Bolton selective broth	10 <sup>2</sup>	SCD	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (OX)	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	0	0	0	0	0	0	0
		スキロー	0	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>4</sup>	SCD	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (OX)	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	0	0	0	0	0	0	0
		スキロー	0	0	0	0	0	0	0

表 4 *E.coli* ATCC25922

増菌培地	接種菌の 希釈倍率	平板培地	希釈段階						
			原液	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
Nutrient broth (5%馬血液含)	10 <sup>2</sup>	SCD	+	+	+	+	30-40	5	1
		CCDA (OX)	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	0	0	0	0	0	0	0
		スキロー	16	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>4</sup>	SCD	+	+	+	+	30-40	5	1
		CCDA (OX)	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	0	0	0	0	0	0	0
		スキロー	2	0	0	0	0	0	0
Preston selective broth	10 <sup>2</sup>	SCD	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (OX)	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	0	0	0	0	0	0	0
		スキロー	0	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>4</sup>	SCD	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (OX)	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	0	0	0	0	0	0	0
		スキロー	0	0	0	0	0	0	0
Bolton selective broth	10 <sup>2</sup>	SCD	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (OX)	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	0	0	0	0	0	0	0
		スキロー	0	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>4</sup>	SCD	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (OX)	0	0	0	0	0	0	0
		CCDA (SEL)	0	0	0	0	0	0	0
		バツラー	0	0	0	0	0	0	0
		スキロー	0	0	0	0	0	0	0



## 2) MIC

Muller-Hinton agar および Campylobacter Blood-Free Selective agar base における試験株の MIC を表5および表 6 に、CLSI の判定基準を表 7 に示した。

*E.coli* KT105 は CPZ 耐性を示し、MIC は CCDA(Ox)の添加濃度より高値を示した。

*Klebsiella sp.* KT104 は B また、CPZ、CAZ、CTX に耐性を示し、CPZ の MIC は CCDA(Ox)の添加濃度より高値を示した。また、PIPC/TAZ の MIC が CCDA(SEL)における添加濃度と同じであることから、1)の検討において高濃度菌液を接種した条件でコロニーが見られた結果は妥当であると考えられる。

表 5 Muller Hinton agar における MIC

	<i>E.coli</i> ATCC25922	<i>Klebsiella sp.</i> KT106	<i>E.coli</i> KT 105	<i>Klebsiella sp.</i> KT104
AZT	0.25	0.25	0.5	4
PIPC/TAZ	0.5/0.06	0.5/0.06	2/0.25	8/1
CPZ/SBT	0.25	0.25	1	8
CAZ	0.25	0.25	1	8
CTX	0.25	0.25	4	16
CPZ	0.5	1	64	128

表 6 Campylobacter Blood-Free Selective agar base における MIC

	<i>E.coli</i> ATCC25922	<i>Klebsiella sp.</i> KT106	<i>E.coli</i> KT 105	<i>Klebsiella sp.</i> KT104
AZT	0.25	0.25	0.5	4
PIPC/TAZ	0.5/0.06	1/0.125	4/0.5	16/2
CPZ/SBT	0.25	0.5	4	16
CAZ	0.25	0.25	1	16
CTX	0.25	0.25	4	16
CPZ	0.25	1	128	>128

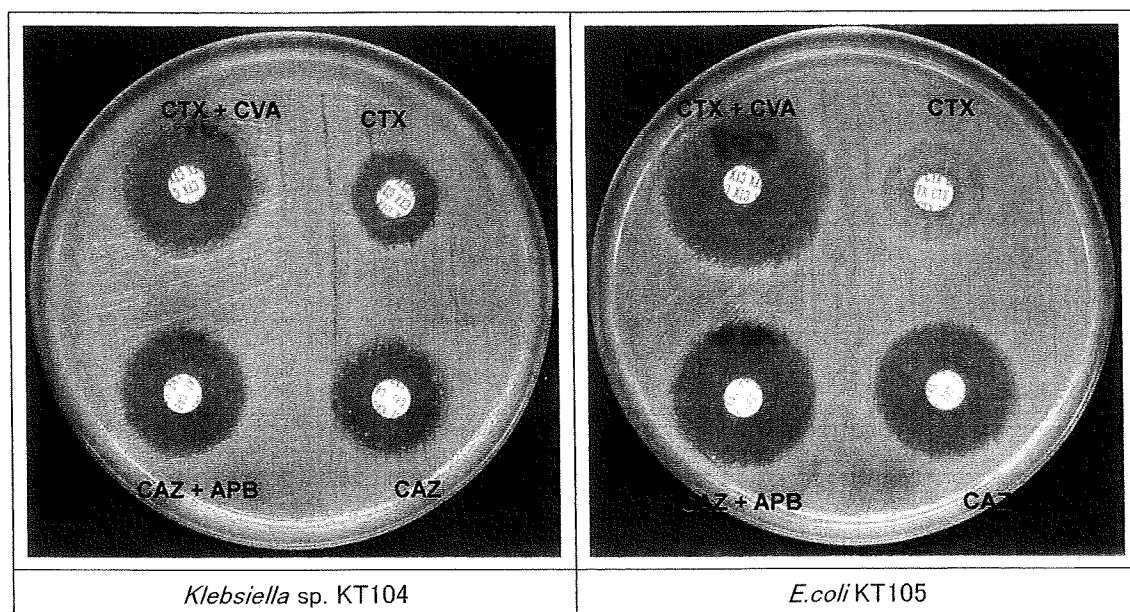
表 7 CLSI M100-S20 における判定基準 (\*:TAZ 4 μg/mL 固定)

	S	I	R
AZT	≤4	8	≥16
PIPC/TAZ*	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4
CPZ/SBT	未記載		
CAZ	≤4	8	≥16
CTX	≤1	2	≥4
CPZ	≤16	32	≥64

### 3) ESBL および AmpC の推定

*E.coli* KT105、*Klebsiella* sp. KT104 とも CVA の添加により阻止円の増大が認められ、CAZ の MIC が CTX より低値であることから CTX-M 型の ESBL であることが疑われました。

*E.coli* KT105 は特に、阻止円の中に二重リングの形で発育環が認められ、同一株で感受性が異なる細胞が混在して群を作っているとみられます。阻止円内のコロニーが数個にとどまらないので突然変異型ではなく、阻止円外側より耐性の強い誘導型の耐性菌が疑われました。感受性試験(表6)において CTX の感受性が4と耐性判定であるが低い結果となったのは初期では誘導がからなかったと考え、内側リングを継代して現在、感受性検査を行っています。



#### 【結語】

今回の検討に用いた *E.coli* KT105、*Klebsiella* sp. KT104 は CTX-M 型の ESBL であることが疑われ、現在検討されている ISO のカンピロバクター検査法のうち Bolton-mCCDA の検出系では発育阻止ができなかったことが考えられます。他方、他の系で比較的問題が少なかったのは、これらの培地に ESBL や多剤耐性緑膿菌に有効であるとされる細胞膜阻害作用のあるコリスチンやポリミキシン B が利用されているからであると思われます。但し、スキロー処方についてはポリミキシンを含むものの、従来から選択性が弱いことから雑菌の発育を許す可能性があると見られます。当社の CCDA 培地もこうした耐性菌を加味した処方であるために効果的な分離ができたものと思われる。タゾバクタムやスルバクタムは ESBL との結合体(アシル酵素の四面中間体)が安定で、これを可逆的に阻止するので CPZ や PIPC といった  $\beta$  ラクタム剤も有効にすることができます。

近年、糞便や食鳥などから ESBL/CTX-M 型が広がっていることが Livermore や石井らの指摘で明らかになってきていますが、ISO の検査法もこれらの耐性菌の広がりによって、従来は考えられなかった問題が起きてきた可能性があります。

参考:各選択培地における選択剤の処方

Skirrow 処方

選択剤	処方 (/L)
Vancomycin	10mg
Polymyxin B	2,500IU
Trimethoprim	5mg

Buzler 処方

選択剤	処方 (/L)
Bacitracin	25,000IU
Cycloheximide	50mg
Cephazolin	15mg
Novobiocin	5mg
Colistin sulphate	10,000IU

mCCDA 処方

選択剤	処方 (/L)
Cefoperazone	32mg
Amphotericin B	10mgIU

mCCDA(SEL)処方(新処方)

選択剤	処方 (/L)
Vancomycin	20mg
Amphotelicin B	20mg
AZT	10mg
抗 ESBL 剤	15mgIU

Preston 増菌培地選択剤

選択剤	処方 (/L)
Trimethoprim	5mg
Polymyxin B	5,000IU
Cycloheximide	50mg
Refampicin	5mg

Bolton 增菌培地選擇劑

選擇劑	処方 (/L)
Cephaloperazone	20mg
Vancomycin	20mg
Cycloheximide	50mg
Trimethoprim	20mg

