

# カンピロバクターの薬剤感受性試験法の現状

高橋敏雄

農林水産省動物医薬品検査所 (〒185-8511 国分寺市戸倉1-15-1)

## 1. はじめに

抗菌性物質が、畜産分野でも利用されるようになって約半世紀が過ぎようとしている。動物用抗菌性物質は、主として細菌感染症の治療や成長促進などを目的として広く畜産に利用された結果、畜産の安定経営や安全な畜産物の安定供給に多大な貢献をしてきた。反面、動物に対して各種の抗菌性物質を使用することが広く普及するに伴い、食用動物における耐性菌の出現という新たな問題が提起された。そこでは特に、食用動物に抗菌性物質を使うことにより薬剤耐性菌が選択され、新たに出現した耐性菌もしくは耐性遺伝子が食物連鎖を介して人へ伝播し、人の細菌感染症の治療を困難にするという潜在的な危険性に対して焦点が当てられてきた。今回のテーマである薬剤感受性試験は、抗菌性物質に対する細菌の感受性の程度を調べるための検査法で、耐性菌を検出するための最も基本的な方法であり、この耐性菌問題の根幹に係わる事項であるとも考えられる。

カンピロバクター（主に *Campylobacter jejuni*）は、家禽などの食肉を原因食品としたヒトの下痢症（食中毒）の原因菌として国際的に注目されている。本菌は食品媒介性病原菌のひとつであり、感染源としての保菌動物の関与などを考えると、公衆衛生上ならびに家畜衛生上も極めて重要な細菌である。ここ数年来、本菌は国内の細菌性食中毒事件での原因菌としては、サルモネラや腸炎ビブリオとともに常に上位に位置し、原因菌別の食中毒事件数で見ると全体の約25%を占めている。

既に米国では、カンピロバクターが食中毒原因菌の第一位となっている。

また、最近ではフルオロキノロンに対して耐性を示すカンピロバクターが、ヒトの症例や畜産食品などから分離されるとの文献報告が散見される。2000年10月、米国FDAは、家禽用経口投与型フルオロキノロン剤の承認取り消し通知を発出した。その背景にはヒトのカンピロバクター食中毒の感染源は畜産食品、特に家禽肉であり、畜産分野で獲得されたフルオロキノロン耐性のカンピロバクターに汚染された食品をヒトが摂取すること、あるいはそれに接触することが、ヒトの健康において脅威となった点が挙げられている。いずれにせよ、この裏付けとなっているものが、分離菌株の薬剤感受性試験データを中心とした疫学情報とリスク分析の結果であったことは明白な事実である。

現在、耐性菌問題に対する獣医領域の主要な対応策は人の医療分野と同様であり、国際的な共通認識となっている「慎重使用の原則」の遵守である。すなわち、抗菌性物質の使用の現場においては、原因菌の薬剤感受性試験データや添付文書などの有用な基本情報（抗菌スペクトル、薬物動態など）に基づく慎重な薬剤選択が益々重要である。

本稿においては、その抗菌剤選択の基礎となる *in vitro* 薬剤感受性試験法の一般論をブレイクポイントの考え方も含めて概説するとともに、これまで国際的に議論の多いカンピロバクターの薬剤感受性試験法の現況について紹介したい。

## 2. 薬剤感受性試験法の種類

現行の薬剤感受性試験法は、大きく拡散法と希釈法とに分けられる〔4〕。

### 1) ディスク拡散法

ディスク拡散法は、わが国において臨床検査室におけるルーチンの薬剤感受性試験法としては最も普及した方法であり、一濃度法、三濃度法および濃度勾配ディスク法の三種類がある。一定量の薬剤を含んだディスクを予め被検菌を接種した寒天培地の上に置いて培養すると、薬剤は次第に寒天培地中を拡散し、ディスクを中心に一定の濃度勾配をつくる。その結果、被検菌の感受性の度合いに応じてディスク周囲に発育阻止帯が形成され、その阻止円の広さで感受性の程度を調べるものである。一般に、本法には、①国際法である米国臨床検査標準化委員会 (National Committee for Laboratory Standards: NCCLS) 法、②国内法である一濃度ディスク法 (昭和)、三濃度ディスク法 (栄研) および、③濃度勾配ディスク法 (Eテスト) などが知られている。理論的には、出現した阻止円の直径から最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) の近似値を推定することは可能であるが、基本的にはブレイクポイントを中心に感受性か耐性かを定性的に判定するものであると考えるべきである。

### 2) 希釈法

本法は、薬剤を寒天培地で希釈する寒天平板希釈法と液体培地で希釈する液体培地希釈法に大別される。希釈法は拡散法に比べるとコストの面でやや高くつくが、MIC を具体的に知ることができるため、病原微生物に対する抗菌力の詳細な比較をする際に有用性の高い方法である。また、液体培地希釈法としては、半自動化された微量液体希釈法が主流となっており、必要に応じて最小殺菌濃度 (minimum bactericidal concentration: MBC) についても測定することは可能である。希釈法については、日本化学療法学会と NCCLS がそれぞれ標準法を提唱しているが、現在では NCCLS 法が国内外ともに広く普及しつつある。

## 3. NCCLS の役割

NCCLS の薬剤感受性試験法小委員会では希釈法と拡散法の標準法を制定しており、現在では NCCLS 法が薬剤感受性試験法の最も標準的な国際法として認知されてきている。NCCLS は規制力をもたない任意団体であるが、その標準法が広範に受容されてきた背景には、広く意見を求めコンセンサスを得るための組織活動がある。1968年に設立されて以来、全米を中心に臨床検査室、臨床検査業者、医薬品製造メーカー、政府機関関係者、微生物学者および医師などの参加を得て、独特の意見合意のプロセスを経て最終的な標準法または指針を提起している。

NCCLS における意見合意のプロセスは、標準化すべきプロジェクトの決定に始まり、意見合意の各段階における文書の刊行、臨床検査の現場からのコメントへの対応、文書の改訂、最終合意の得られた段階での文書の刊行及び施行後の見直しまで、ひとつの標準法の提起までに5～6年の検討期間を費やしてきている。NCCLS 文書には、意見合意の段階に応じて、proposed (提案)、tentative (暫定案) および approved (承認条項) の三段階が設定されている。

## 4. ブレイクポイントの意義

ブレイクポイントとは、薬剤感受性試験で得られた抗菌性物質の MIC 値を臨床効果などとの関連性をもたせ、抗菌剤選択の際のより有効な指標となるように設定されたものである。一般にブレイクポイントは、細菌学的ブレイクポイントと臨床的ブレイクポイントに大別される。前者は、我々がこれまで実施してきている耐性菌調査のような全国レベルの調査において得られた薬剤の MIC 値の分布が二峰性を示した場合に、両ピークの谷間の値をもって設定され、疫学調査における耐性菌の検出などの目的での応用価値が極めて高い。一方、臨床的ブレイクポイントとは、薬物動態指標 (最高血中濃度、血中半減期、組織移行性、抗菌作用の特性など) および実際の臨床試験

データに基づき、臨床的有効性の境界点として主に理論的に設定された MIC 値である。細菌学的ブレイクポイントが、菌種-薬剤別に設定されるのに対し、臨床的ブレイクポイントは、基準値を菌種別ではなく、人の感染症別（呼吸器感染症、敗血症および尿路感染症）に設定されている〔2〕。いずれにせよ、日本化学療法学会が独自に提案しているこの臨床的ブレイクポイントは、全て人の医療上のブレイクポイントである。残念ながら、現在のところ獣医学領域においては、この種のブレイクポイントの設定は行われていない。一方、NCCLS が菌種別に提案しているブレイクポイント（感受性 S-中間 I-耐性 R の判定基準値）の設定は、日本化学療法学会のそれに比べて臨床的な意味合いが弱いと考えられる。最近では、NCCLS の提唱する標準試験法とそのブレイクポイントが国際的にも広く採用され始められている。

## 5. カンピロバクターにおける薬剤感受性試験法の現状と問題点

カンピロバクターは、耐性菌調査における対象菌種であるサルモネラ、腸球菌および大腸菌とは明確にその発育条件が異なる。この培養気相条件や感受性測定用培地の種類などがカンピロバクターの薬剤感受性試験における重要な変動要因のひとつとなっている。すなわち、本菌は微好気性菌であるというその細菌学的特性から、一般細菌の試験方法をそのまま適用できない本質的な問題点がある。本菌の薬剤感受性試験法については、NCCLS や日本化学療法学会なども標準的な方法をこれまで明示してこなかった。そのため、前述のようにカンピロバクターは耐性菌問題において現在、最も注目される細菌であるにも係わらず、世界各国の耐性菌モニタリング調査実施機関では様々な試験法が独自に考案・応用されてきたのが現状である。例えば、主要なモニタリングシステムである米国の NARMS では主に微量液体希釈法を、デンマークの DANMAP ではディスク法と寒天平板希釈法をそれぞれ採用している。この状況は、日本国内においても同様であり、医療・公衆

衛生分野と家畜衛生分野の種々な機関においてはディスク法、寒天平板希釈法および微量液体希釈法など、その手法は多種多様であり、全く統一化が図られてこなかった。1999 年以降、国内で実施している家畜由来細菌の薬剤耐性モニタリング調査 (JVARM) においては、試行的に一濃度ディスク拡散法（推定 MIC 値の算出）と寒天平板希釈法を併用してきた。各供試薬剤の MIC 値を指標とした場合、両法間には必ずしも高い相関性は認められなかった。

しかし、幸いにもつい最近 NCCLS はカンピロバクターについては唯一、寒天平板希釈法を「approved standard」として、その標準的試験法を明示した〔1〕。そこで以下に、NCCLS により提唱された試験方法の概略を紹介する。

### 1) 供試材料

- ①感受性測定用培地：5%羊脱線維素血液加ミューラーヒントン寒天培地
- ②菌浮遊用液：ミューラーヒントンブローズ、滅菌精製水または生理食塩液
- ③薬剤原液の希釈用液：滅菌精製水またはリン酸塩緩衝液
- ④供試薬剤：後述

### 2) 薬剤の調製

#### ①薬剤の入手

常用標準品またはその同等品を入手して供試する。

#### ②薬剤（標準品粉末）の保存方法

薬剤は、吸湿防止のためにデシケーター中で $-20^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。使用に際しては、常温に戻してから秤量する。吸湿性のものであるので、秤量は相対湿度 45%以下の条件下で行う。

#### ③薬剤の溶解

水溶性の薬剤は原則として、滅菌精製水を用いて溶解する。水に不溶性ないし難溶性の薬剤については、必要に応じてエタノールや水酸化ナトリウム溶液などの溶媒を用いて、できるだけ少量に溶解した後、精製水で希釈して薬剤原液を調製する。薬剤原液は、いずれも通常、 $5,120\ \mu\text{g}/\text{ml}$  又は $\mu\text{g}$ (力価)/ml の濃度に調製する。

殆どの薬剤原液は、ポリエチレンまたはポリプロピレン製の滅菌びんに入れて、-70℃以下の保存条件で、約6ヶ月間は使用可能である。ただし、一度溶解したものは全ての日のうちに使用しなければならない。

#### ④薬剤濃度の調整法

供試薬剤を秤量後、規定の溶媒で溶解するが、予め下記の計算式に基づき必要溶媒量を計算しておく。

溶媒量計算式；

$$\text{溶媒量 (ml)} = \frac{\text{薬剤の力価} (\mu\text{g/ml}) \times \text{秤量 (mg)}}{\div \text{原液の濃度} (\mu\text{g/ml})}$$

### 3) MIC 測定法の実際

#### ①薬剤の希釈

表1に示した具体的な方法に従い、5,120 $\mu\text{g/ml}$ を薬剤原液とした2倍段階希釈列を作成する。

表1 寒天平板希釈法に用いる抗菌薬の希釈調整法  
マスター液希釈

	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	処方		
A液	5,120			
B液	1,280	A液	1容+蒸留水	3容
C液	160	B液	1容+蒸留水	7容
D液	20	C液	1容+蒸留水	7容
E液	2.5	D液	1容+蒸留水	7容

#### 抗菌薬の溶液

段階	マスター液 ( $\mu\text{g/ml}$ )	容量 (ml)	+蒸留水 (ml)	中間濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	寒天での1:10希釈での最終的な濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\log_2$
1	A液 (5,120)	—	—	5,120	512	9
2	A液 (5,120)	1	1	2,560	256	8
3	A液 (5,120)	1	3	1,280	128	7
4	B液 (1,280)	1	1	640	64	6
5	B液 (1,280)	1	3	320	32	5
6	B液 (1,280)	1	7	160	16	4
7	C液 ( 160)	1	1	80	8	3
8	C液 ( 160)	1	3	40	4	2
9	C液 ( 160)	1	7	20	2	1
10	D液 ( 20)	1	1	10	1	0
11	D液 ( 20)	1	3	5	0.5	-1
12	D液 ( 20)	1	7	2.5	0.25	-2
13	E液 ( 2.5)	1	1	1.25	0.125	-3

#### ②薬剤含有感受性測定用培地の調製

ミュラーヒントン寒天培地を溶解、滅菌して48～50℃に保持する。使用時に5%の割合で羊脱線維素血液を添加し、感受性測定用培地とする。直径90mmサイズのシャーレを使用する場合には、前項で調製した薬剤の各希釈液2mlを入れ、これに培地18mlを加えて薬剤と十分混合した後に固化させる。最終的な寒天培地の厚さは、3～4mmにしなければならない。同時に、薬剤無添加の対照平板も作成する。室温で固化させた寒天培地は、使用前に、約30分間程度ふ卵器内で寒天表面を乾燥させ、表面に水滴が付いていないことを確認する。

#### ③接種用菌液の調製

5%羊脱線維素血液加ミュラーヒントン寒天平板培地で37℃48時間又は42℃24時間、微好気下(10%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 85%N<sub>2</sub>)で培養した被検菌株のコロニーをミュラーヒントンブロス、精製水または生理食塩液に直接浮遊させる。その菌液は約1～4×10<sup>8</sup>CFU/ml(McFarland標準液No. 0.5に相当)となるように濃度調整後、さらに10倍希釈して接種用菌液とする。なお、濃度調整した菌液は、調製後30分以内に使用しなければならない。

らない。

#### ④接種用菌液の平板への接種

前項で調製した接種用菌液を、マイクロプランター（直径 3mm の金属製のピン）などにとり、これを静かに薬剤含有平板もしくは対照平板にスポットする。接種の順番は最初に対照平板へ接種し、次いで各薬剤ごとに最も低濃度の薬剤を含む平板培地から接種を開始し、次第に高濃度の培地に接種していく。雑菌の混入がないことを確かめるために、少なくとも最初と最後に対照平板に接種する。平板表面の菌液が乾いた後、シャーレを反転し、35～37℃ 微好気下（10%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 85%N<sub>2</sub>）で培養し、判定を行う。

#### ⑤エンドポイントの決定

原則、接種菌の薬剤含有培地での発育が対照培地のそれに比べて 80%以上減少している薬剤の最低濃度をエンドポイントと判定し、その値を MIC とする。単一のコロニーまたは軽微な発育は無視し、発育阻止とみなす。

#### ⑥精度管理

薬剤感受性試験法の精密性と正確性を確保する目的で、*Campylobacter jejuni* ATCC 33560（本菌種の基準株）を精度管理用菌株に定め、シプロフロキサシン、ナリジクス酸、エリスロマイシン、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、ゲンタマイシンおよびメロペネムの本菌株に対する精度管理限界値（MIC 値範囲）を試験成立要件として規定している。更に詳細な精度管理の手法については、参考文献を参照されたい。

## 6. おわりに

諸外国での最近の報告と同様に、国内においても 1999 年度以降の全国調査により健康な家畜家禽の糞便から分離されたカンピロバクターについて抗菌剤感受性を測定した結果、フルオロキノロン耐性株が分離株全体の 20%前後に確認された[3]。広域な抗菌スペクトルをもつフルオロキノロン剤は、一般的に食中毒も含めたヒトの腸管感

染症用治療薬として汎用性が高い。従って、鶏肉などの摂取によるフルオロキノロン耐性カンピロバクターのヒトの健康や医療に及ぼす影響に関するリスク評価は、フルオロキノロン剤が鶏大腸菌症とマイコプラズマ感染症の治療薬として認可されている日本国内においても急務の課題となってきた。リスク分析に資するデータの中心となるものは、やはり各分野での耐性菌調査成績であり、その適正なリスク評価の実施を促していく上で、基本となるものが本稿のテーマである薬剤感受性試験手法の統一であると理解している。

国内での動物由来株のフルオロキノロン耐性に関する過去の調査成績は、極めて少なく、その出現頻度の推移を厳密に比較・考察することは困難であるが、一部の地域・年次限定的な成績によれば、フルオロキノロン耐性の出現率は、ヒト由来株、食肉由来株および動物由来株ともに、増加する傾向が窺える。獣医領域でも最初の承認時である 1991 年以降、経口投与型を中心にフルオロキノロン剤の消費量が増加傾向を示し、その多くが鶏に用いられている現状などが、その原因のひとつであると推察されるが、現実には種々な要因が複雑かつ多元的に絡み合っており、その背景を直接的に特定することはできない。

今後とも国内においては、カンピロバクターのフルオロキノロン耐性に関しては、①全国レベルでの畜産分野における各種細菌の抗菌剤感受性動向を監視し、その試験成績を集積・解析するとともに、②家畜由来耐性株とヒト由来耐性株との関連性について、分子疫学手法を駆使して遺伝学的に解析していくことや、③動物由来耐性株のヒト医療に及ぼす影響に関するリスク分析を関係機関の協力・連携の下で実施することが必要である。

これまで、一連のリスク分析の妨げとなった原因のひとつが各国における薬剤感受性試験手法の不統一性であるとも考えられる。永年の懸案事項であったカンピロバクターの国際標準法が今回、NCCLS により初めて提案されたことを契機に、JVARM も含めた国内の各関係機関を手始めに世界各国のモニタリング手法が統一され、カンピロバクターの薬剤耐性に関する調査研究が確実に進展し、我々関係者の大命題でもある「動物から人

への薬剤耐性の伝播に関する適正なリスク評価の実施」に少しでも近づけることを期待したい。

## 要 約

カンピロバクターは、微好気性菌である特性から、一般細菌の試験方法をそのまま適用できないという本質的な問題点を抱えている。そのため、本菌は耐性菌問題において現在、最も注目されている細菌のひとつであるにも係わらず、世界各国の耐性菌モニタリング調査の実施機関では様々な試験法が独自に応用されてきたのが現状であった。一連のリスク分析の妨げとなった原因のひとつが、各国における薬剤感受性試験手法の不統一性であると言えるかもしれない。幸いにも、永年の懸案であったカンピロバクターの国際標準法が今年、NCCLSにより初めて提案された。本法は寒天平板希釈法であり、その特徴としては①感受性測定用培地は5%羊脱線維素血液加ミューラーヒントン寒天培地を使用すること、②接種用菌液は平板上の菌コロニーをミューラーヒントンブローンスなどに浮遊させて $1\sim 4\times 10^8$ CFU/mlとなるように菌数を調整し、さらに通常10希釈したものを使用すること、③接種後の培養は35～37

℃微好気下(10%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 85%N<sub>2</sub>)で行うことなどが挙げられる。標準法の提唱を契機に、国内の各関係機関をはじめ、世界各国のモニタリング手法が統一され、カンピロバクターの薬剤耐性に関する調査研究が各関係機関の連携の下で確実に進展していくことを期待したい。

## 参考文献

- 1) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Second edition, Approved Standard. NCCLS document Replaces M31-A2, vol. 22, no.6. NCCLS, Villanova. (2002)
- 2) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会：委員会報告，呼吸器感染症および敗血症におけるブレイクポイント，42，905-914. (1994)
- 3) 高橋敏雄，守岡綾子，石原加奈子ら：国内における家畜由来耐性菌について，動物抗菌会報，23，9-16. (2001)
- 4) 山口恵三：抗菌薬感受性測定法，日本臨床，52，350-354. (1994)

## Present Situation on Drug Sensitivity Test of *Campylobacter*

Toshio TAKAHASHI

*National Veterinary Assay Laboratory, 1-15-1, Tokura, Kokubunji, Tokyo 185-8511, Japan*

There are some of essential issues that the protocols of drug sensitivity test of general bacteria could not be applied easily to those of *Campylobacter* such as microaerophile. Although *Campylobacter* is recognized to be one of the most noteworthy bacteria in the process of recent discussion on the antimicrobial resistance, the various methods have been adopted individually in antimicrobial resistance monitoring program around the world. It is possible that a lack of unity of the protocols in each country is a cause to prevent accomplishment of a serial risk analysis. Fortunately, the international standard method of drug sensitivity test of *Campylobacter* remaining unsettled has been proposed by NCCLS in this year. The characteristics of present agar dilution method are as follows; ① using Muller-Hinton agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood as the medium for the sensitivity determination, ② using a bacterial suspension which is directly taken from colonies on the blood agar, adjusted to approximately  $1 \sim 4 \times 10^8$  CFU per ml and diluted generally to 10 times as inoculum to the medium, ③ Incubating the agar plate at 35 to 37 °C under microaerophilic condition (10%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 85%N<sub>2</sub>).

Taking the opportunity of NCCLS proposal of the standard method, we hope that the research on antimicrobial resistance of *Campylobacter* based on the monitoring tool harmonized among foreign countries as well as the domestic laboratories would be certainly advanced in cooperation with the related organization.

### 討 論 (座長：五十君静信 国立薬食研, 阪野哲也 全農家畜衛研)

#### 質問 (阪野哲也：全農家畜衛研)

ディスク法は定性に適してはいる反面、定量的使用には未だ不適とのことですが、カンピロバクター以外の大腸菌などにおいては如何でしょうか。

#### 答 (高橋敏雄：動薬検)

カンピロバクターだけでなく、大腸菌などにおいても、ディスク法は必ずしも定量的な方法であるとはいえないと思います。