

# 岐阜県臨床検査技師会誌

vol. 43 2号

ISSN1348-2203

通巻147号

vol  
43  
2号

ラテックス免疫比濁法による H-FABP 測定試薬 “ラテックス H-FABP キット「ヤマサ」”の基礎的検討 …… 田内 里奈 ほか	1
腸管内細菌叢の監視培養検査が有用であった造血管腫瘍患者における <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> による敗血症の1例 …………… 米玉利 準 ほか	6
直腸癌の抗癌剤治療中に血液培養から “ <i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> ”が分離・同定された1症例 … 桂川 晃一 ほか	10
小児の無呼吸発作における PSG 検査の有用性 …………… 石郷 景子 ほか	14
結核菌群検出における LAMP 法の日常検査への導入と 有用性の評価 …………… 大栗田香織 ほか	17
フィリピン帰国者の血液培養から <i>Burkholderia pseudomallei</i> を分離・同定した一例 …………… 八島 繁子 ほか	20
当院で分離された <i>Haemophilus influenzae</i> b 型株の検出状況と薬剤感受性に関する検討 …………… 八島 繁子 ほか	26
セファロsporin耐性腸内細菌の検出における AmpC/ESBL 鑑別ディスクの 有用性に関する検討 …………… 後藤 雪乃 ほか	30

通  
巻  
147  
号

# ラテックス免疫比濁法による H-FABP 測定試薬 “ラテックス H-FABP キット「ヤマサ」”の基礎的検討

田内 里奈<sup>1)</sup> 石田 秀和<sup>1)</sup> 片野由里子<sup>1)</sup> 中山 純里<sup>1)</sup> 中村 真大<sup>1)</sup>  
古田 伸行<sup>1)</sup> 伊藤 弘康<sup>1)</sup> 清島 満<sup>1)</sup>

## Key words

Heart type fatty acid binding protein (H-FABP),  
Latex Agglutination Turbidimetry (LA)

## 要 旨

心臓由来脂肪酸結合蛋白 (heart type fatty acid binding protein; H-FABP) は心筋傷害時に血中に逸脱するため急性心筋梗塞 (AMI) のバイオマーカーとして測定されている。H-FABP の測定は従来 Enzyme Linked Immuno Solvent Assay 法 (ELISA 法) や免疫クロマトグラフィー法による測定が主流であったが、今回ラテックス免疫比濁法を測定原理とするラテックス H-FABP 「ヤマサ」の検討を行う機会を得たのでその結果を報告する。

今回行った検討では再現性において変動係数 CV% が最大 9.26 とややバラツキを認めたが、その他の基礎的検討は良好な成績であったことより、日常検査における十分な基本性能を有しているものと考えられる。H-FABP は腎排泄の影響を受けるため CKD 病期分類別に H-FABP 測定値を比較した。ステージ G4 および G5 で他のステージと比較し有意に高値となる結果が得られたことから、eGFR29mL/min/1.73 m<sup>2</sup>未滿の腎機能異常患者では H-FABP の測定値の取り扱いに注意が必要であると考えられる。また、AMI 症例において他の心筋関連マーカーとともに時系列にて変動を確認したところミオグロビンとほぼ同時期に、CK-MB、トロポニン I よりも早期に変動していた。H-FABP はミオグロビンに比べ AMI に対する特異性が高いため、AMI の早期診断および治療効果判定への有用性が期待される。

本試薬は良好な基本性能を有し、汎用生化学自動分析装置に適用可能であることから、臨床的有用性の高い試薬であると考えられる。

## はじめに

心臓由来脂肪酸結合蛋白 (H-FABP) は、主に心筋細胞の細胞質に存在する約 15kDa の低分子可溶性蛋白であり、心筋細胞へのエネルギー供給に関与している<sup>1)</sup>。H-FABP は心筋虚血時の心筋細胞壊死に伴い血中に逸脱するため、急性心筋梗塞 (acute myocardial infarction; AMI) を含む急性冠症候群 (acute coronary syndrome; ACS) などの心筋傷害時にその血中濃度が上昇する。他の心筋マーカーに比べ早期に上昇するため、ACS の早期診断マーカーとしての有用性が高いとされている<sup>2-5)</sup>。

従来、H-FABP の測定には免疫クロマトグラフィー法や ELISA 法が用いられてきたが、免疫クロマトグラフィー法は簡便に測定が可能であるが定

量性に欠け、ELISA 法は測定時間が長いという欠点があった<sup>6-7)</sup>。今回筆者らはラテックス免疫比濁法 (latex agglutination turbidimetry; LA 法) を測定原理とし、汎用生化学自動分析装置に適応することで、従来法の欠点を補い、検体の到着から 30 分以内に結果報告が可能となる H-FABP 測定試薬 “ラテックス H-FABP キット「ヤマサ」” の基礎的検討を行う機会を得たので、その結果について報告する。

## I. 対象と方法

対象は当院検査部に提出された検体 237 例とした。

検討試薬はラテックス H-FABP キット「ヤマサ」(ヤマサ醤油株式会社) とし、JCA-BM6070 (日本

1) 岐阜大学医学部附属病院検査部

電子株式会社)にて測定を行った。また、対照試薬としてリブリアH-FABPおよびマーカーキットMH-FABP(何れもDSファーマバイオメディカル株式会社)を使用した。またAMI症例における有用性の確認のため、CK-MBをシグナスオートCK-MB MtO(シノテスト株式会社)を用いてJCA-BM6070にて測定し、トロポニンI(TnI)、ミオグロビン(MYO)については、ADVIA Centaur XP(シーメンスヘルスケアダイアグノスティクス株式会社)にて専用試薬を用いて測定を行った。

## II. 結果

### 1. 再現性

精度管理用コントロール2濃度を10回重複測定し、同時再現性を求めた。その結果、濃度1:  $6.27 \pm 0.556 \text{ ng/mL}$  (Mean  $\pm$  SD) で変動係数(CV%): 8.86, 濃度2:  $28.54 \pm 0.559 \text{ ng/mL}$  (Mean  $\pm$  SD) でCV%: 1.96であった。

同様に、精度管理用コントロール2濃度を10日間測定し、日差再現性を求めたところ、濃度1:  $6.24 \pm 0.436 \text{ ng/mL}$  (Mean  $\pm$  SD) でCV%: 6.98, 濃度2:  $25.95 \pm 2.403$  (Mean  $\pm$  SD) でCV%: 9.26とややバラツキが大きい結果であった(表1)。

表1 再現性

	同時再現性		日差再現性	
	Low	High	Low	High
Mean (ng/mL)	6.27	28.54	6.24	25.95
SD	0.556	0.559	0.436	2.403
CV%	8.86	1.96	6.98	9.26

### 2. 共存物質の影響

干渉チェックAプラスおよびRFプラス(シスメックス株式会社)を用いて共存物質の影響を確認した。その結果、直接型ビリルビン19.2mg/dL, 間接型ビリルビン20.1mg/dL, 溶血ヘモグロビン496mg/dL, 乳び1500FTU, リウマトイド因子550IU/mLまで何れの影響も受けないことを確認した(図1)。

### 3. 希釈直線性

高濃度検体を専用希釈液にて段階希釈し、希釈直線性を確認したところ、92.8ng/mLまで原点を通る良好な直線性を確認した(図2)。

### 4. 最小検出感度

低濃度検体を段階希釈し各々20回重複測定し、0濃度(試薬ブランク)のMean + 2SDとMean - 2SDが重ならない理論値濃度を最小検出感度とした。その結果、1.6ng/mLとなった(図3)。

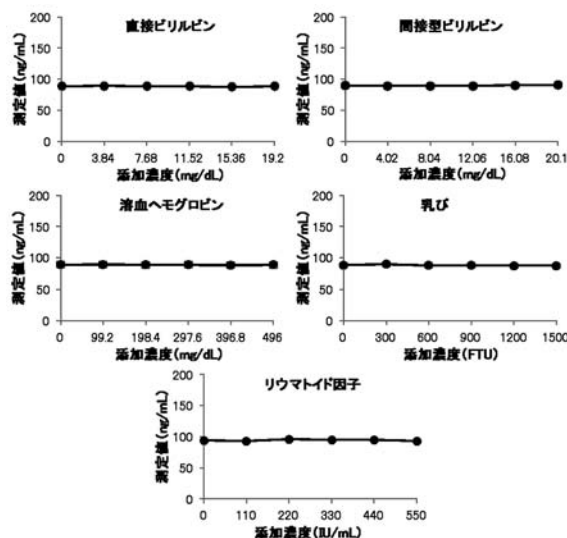


図1 共存物質の影響

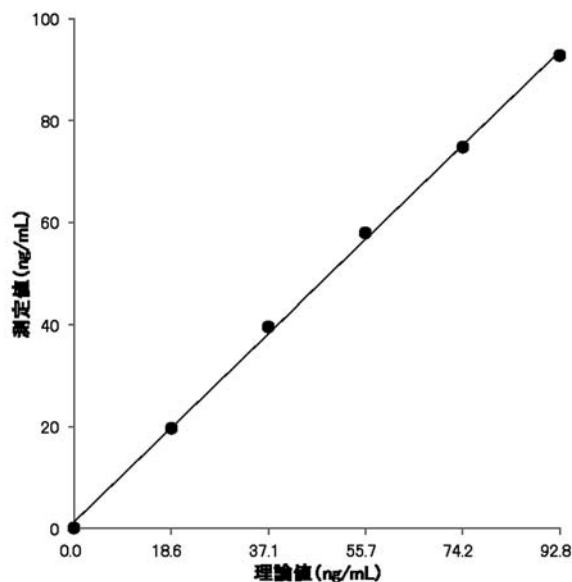


図2 希釈直線性

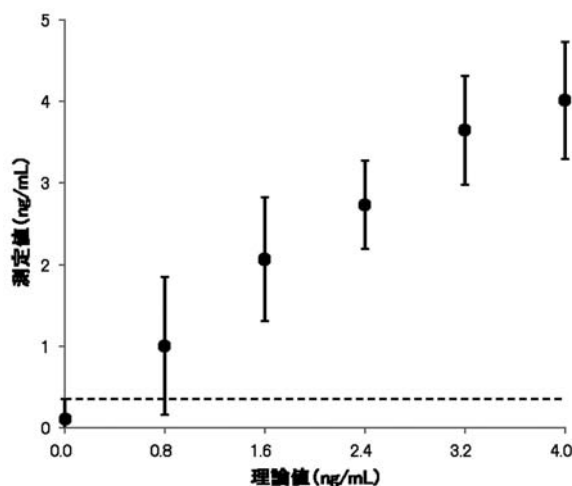


図3 最小検出感度

### 5. 特殊検体による添加回収試験

IgG, IgA, IgM, リウマトイド因子の高値検体において添加回収試験を行った。その結果, IgG5870 mg/dL: 回収率117.0%, IgA1783mg/dL: 回収率93.9%, IgM2347mg/dL: 回収率96.4%, リウマトイド因子2673IU/mL: 回収率116.2%であった(表2)。

表2 特殊検体による添加回収試験

	添加抗原量 (ng/mL)	測定値 (ng/mL)	回収率
IgG (5870 mg/dL)	14.08	16.47	117.0%
IgA (1783 mg/dL)	14.08	13.22	93.9%
IgM (2347 mg/dL)	14.08	13.57	96.4%
リウマトイド因子 (2673 IU/mL)	14.08	16.36	116.2%

### 6. 対照法との相関

リブリア H-FABP と本試薬の相関性を確認したところ, 相関係数  $r=0.987$ , 回帰式  $y=0.83x-1.93$  ( $N=54$ ) であり, 良好な相関性は得られたが約20%低値傾向が確認された(図4a)。

同じく, マーケット M H-FABP との相関性を確認した結果, 相関係数  $r=0.946$ , 回帰式  $y=0.93x-0.99$  ( $N=64$ ) と良好な相関性が認められた(図4b)。

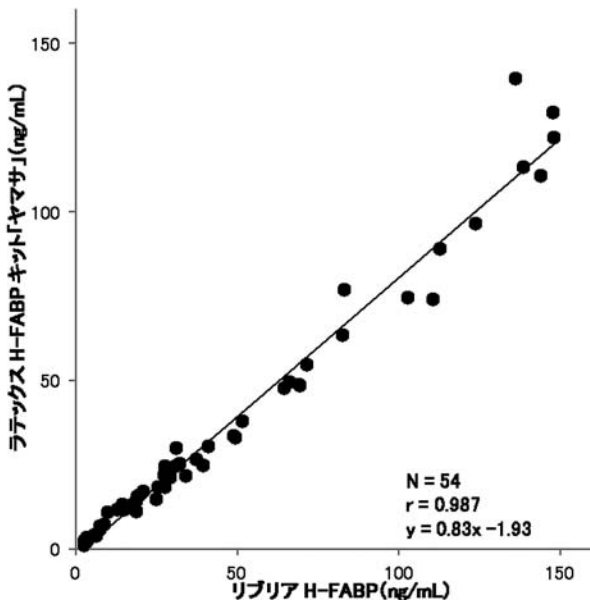


図4a 対照法との相関 (vs. リブリア H-FABP)

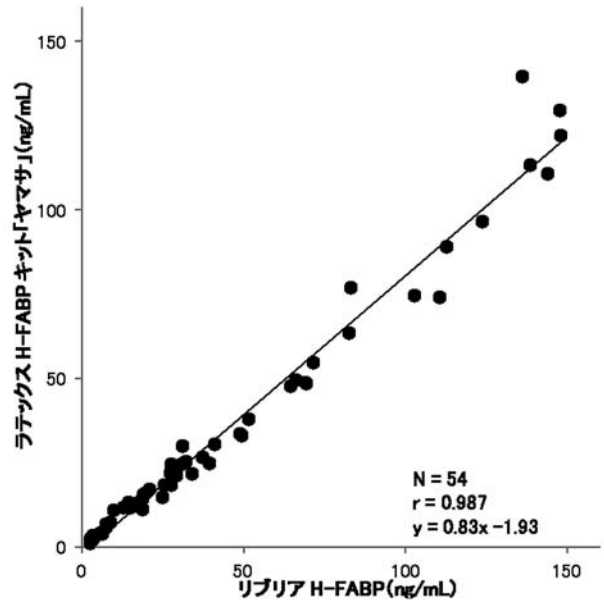


図4b 対照法との相関 (vs. マーケット M H-FABP)

### 7. 慢性腎臓病 (CKD) ステージ分類別 H-FABP 測定値の比較

非心疾患患者群において eGFR による CKD ステージ分類別に H-FABP 測定値の比較を行った。その結果, ステージの進行とともに H-FABP が増加し, ステージ G5 群と G4, G3b, G3aG2, G1 群, ステージ G4 群と G3a, G2, G1 群で  $p<0.01$  となった。また, ステージ G4 群と G3b 群, ステージ G3b 群と G1 群で  $p<0.05$  となった(図5)。

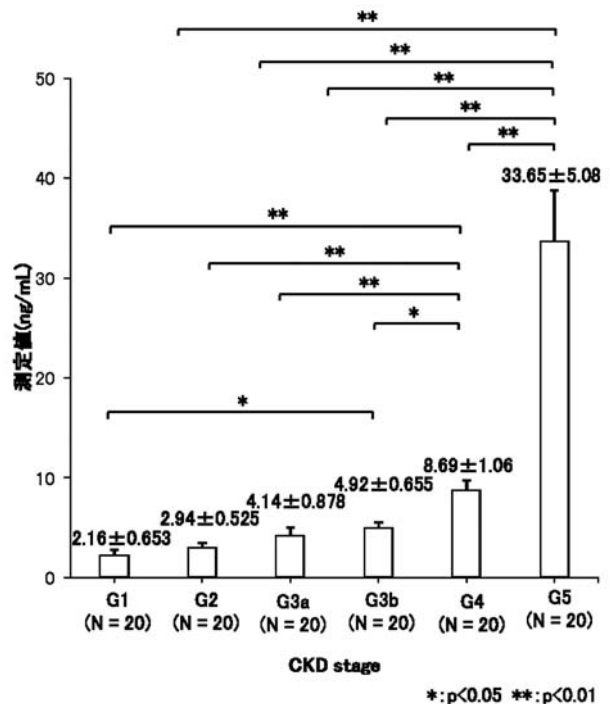


図5 CKD ステージ別測定値

### 8. 慢性心疾患群における H-FABP 測定値の比較

拡張型心筋症 (N = 6), 大動脈弁狭窄症 (N = 10), 特発性心筋炎 (N = 5), 不安定狭心症 (N = 4), 閉塞性肥大型心筋症 (N = 3), 慢性うっ血性心不全患者 (N = 27) において H-FABP 測定値を確認した。その結果, 拡張型心筋症で 1 例, 閉塞性肥大型心筋症で 3 例, 慢性うっ血性心不全で 9 例にカットオフ値 (6.2ng/mL) を超える症例が存在した (図 6)。

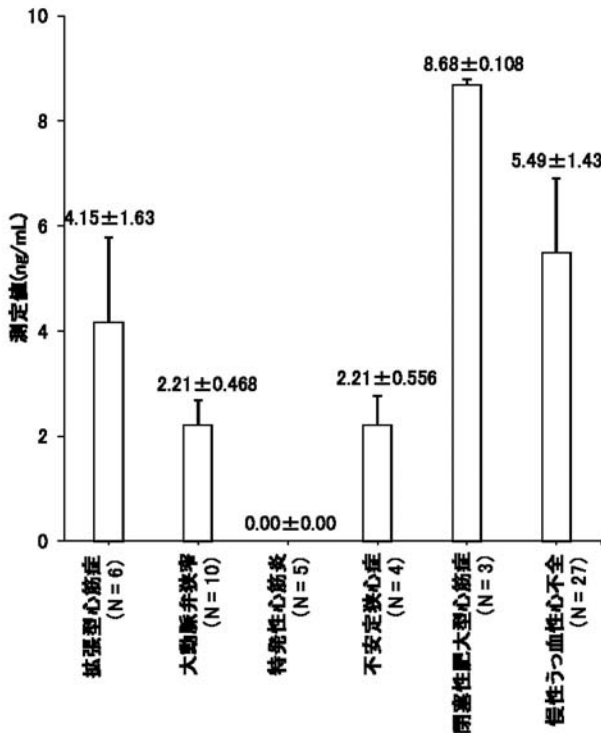


図 6 慢性心関連疾患群での測定値

### 9. AMI 症例における H-FABP 測定値の経時変化

#### 1) 症例 1

AMI 患者において H-FABP の経時変化を CK-MB, TnI および MYO と併せて確認した。Day 1 に AMI を発症し当院に緊急搬送され, Day 10 に死亡した症例である。広範囲の心筋壊死を伴う重篤な AMI 症例であり, H-FABP および TnI, MYO は緊急搬送された直後の検体ですでに H-FABP 160ng/mL, TnI 50ng/mL, MYO 1000ng/mL の測定範囲を超える値を示しており, 遅れて CK-MB がピークに達した。その後, CK-MB にやや遅れ, MYO と同時期に減少を始め, 完全に消失する前に Day 9 の MYO, Day 10 に H-FABP の再上昇を認めた (図 7)。

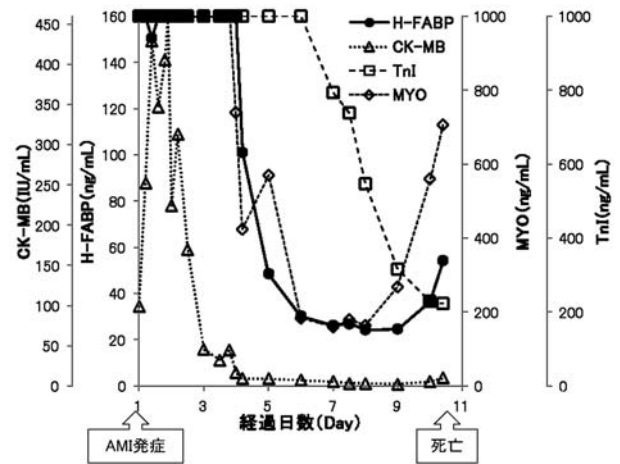


図 7 症例 1

#### 2) 症例 2

S 状結腸癌にて当院消化器外科に外来受診中の患者で, Day 9 に左前胸部痛を訴え独歩にて来院した。来院直後の検体では, H-FABP, CK-MB, TnI, MYO すべてにおいてピークに達していたが, 本症例は軽症であったため, 何れのマーカーも Day 11 以降は症例 1 に比べ低値を示していた (図 8)。

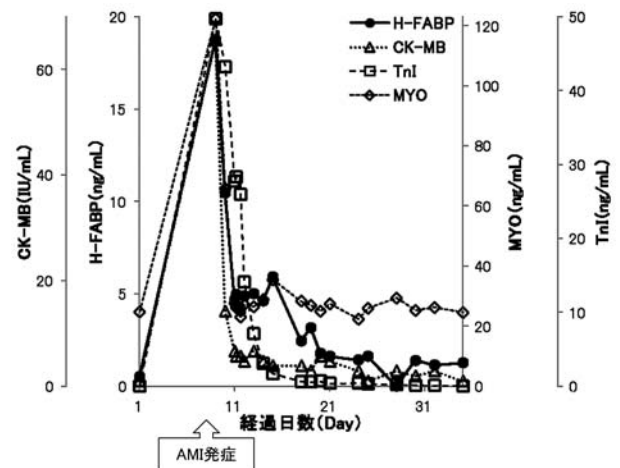


図 8 症例 2

## III. 考 察

厚生労働省発表の平成 24 年 (2012) 人口動態統計の概況によると高血圧症を除く心疾患での死亡者数は約 20 万人で死亡総数に占める割合は 15.8% と悪性新生物に次いで多く, 中でも AMI による死亡は約 4 万人となっている。AMI の診断には数多くのバイオマーカーが利用されているが, その中でも H-FABP は心筋損傷後, 早期に上昇するとされ, AMI を含む ACS の早期診断に有用とされる<sup>2-5)</sup>。H-FABP は従来 ELISA 法や免疫クロマトグラフィー法での測定が主流であったが, 測定時間が長いという問題を有する ELISA 法では緊急性に欠け, また

イムノクロマトグラフィー法では全血にて約15分で測定が可能であるが、定量性に欠けるという問題点があった<sup>6-7)</sup>。ラテックス H-FABP キット「ヤマサ」は LA 法を測定原理とし汎用生化学自動分析装置への適用が可能であり、AMI 診断への有用性が期待される。

今回行った検討では、再現性において CV% が最大で 9.26 とやや不良であったが、それ以外の基礎的検討においては良好な結果であった。また、対照法との相関では本試薬と同じく LA 法を測定原理とするリブリア H-FABP よりも約 20% 低値となったが、従来法であるマーカーキット M H-FABP (ELISA 法) と良好な相関性であったため、日常の臨床検査における十分な基本的性能を有していることが考えられる。

H-FABP は腎臓による排泄を受けるため<sup>4)</sup>、腎機能の影響を観察した。その結果、CKD ステージ分類のステージ G5 群と G4, G3b, G3a, G2, G1 群、ステージ G4 群と G3a, G2, G1 群で  $p < 0.01$  となった。また、ステージ G4 群と G3b 群、ステージ G3b 群と G1 群で  $p < 0.05$  となった。このことより糸球体濾過量 (GFR) が  $29\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$  未満の腎機能異常を有する患者では H-FABP 測定値の取り扱いに十分な注意が必要であると考えられる。また、慢性心疾患患者での H-FABP 値は添付文書によるカットオフ値である  $6.2\text{ng}/\text{mL}$  を超える症例が 55 例中 13 例存在したことから、慢性心疾患でも心筋傷害を伴う症例では H-FABP が高値となることが推測される。

AMI の 2 症例における H-FABP と CK-MB, TnI, MYO の変動を時系列で確認したところ、H-FABP は MYO とほぼ同時期に増減していた<sup>8)</sup>。また、H-FABP は CK-MB, TnI よりも早期に上昇し、再灌流後速やかに低下するとされている<sup>2)</sup>。さらには、AMI に対する特異性は MYO よりも優れるため<sup>3)</sup>、AMI の早期診断、治療効果判定に有用と考えられる。

#### IV. 結語

H-FABP は心筋傷害により速やかに血中に増加し、さらに治療効果を鋭敏に反映する優れたマーカーである。腎排泄を受けるため腎機能異常で高値となるが、定量値としてモニタリングすることによりその変動を以て診断可能であることが推測される。

ラテックス H-FABP キット「ヤマサ」は臨床検査試薬として良好な基本的性能を有し、汎用生化学分析装置に搭載可能であるため血清分離を含め約 30 分で定量測定が可能であることから、臨床の有用性が高いと考えられる。

#### 文献

- 1) Ockner RK, et al.: A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science* 1972; 177: 56-58
- 2) Ishii J, et al.: Serum concentrations of myoglobin vs human heart-type cytoplasmic fatty acid-binding protein in early detection of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 1997; 43: 1372-1378
- 3) 田中孝生ほか: ヒト心臓脂肪酸結合蛋白 (H-FABP) 測定の臨床的意義. 1997; 37: 1367-1383
- 4) 稲波浩ほか: 急性冠症候群診断マーカーとしてのヒト心臓由来脂肪酸結合蛋白 (H-FABP) の臨床的検討. *医学検査* 2003; 52: 1419-1424
- 5) 柴田泰史ほか: 急性期患者における血清心臓由来脂肪酸結合蛋白値と骨格筋傷害の関連性について. *医学検査* 2006; 55: 998-1002
- 6) 藤田孝ほか: ラテックス免疫比濁法によるヒト心筋型脂肪酸結合蛋白 (H-FABP) 測定試薬の基礎的検討. *機器・試薬* 2010; 33: 629-632
- 7) 難波俊二ほか: 心臓型脂肪酸結合蛋白の精密、かつ迅速測定可能な試薬の開発とその性能評価. *JJCLA* 2013; 38: 12-19
- 8) 吉野秀朗: 急性冠症候群と迅速診断法 (トロポニン T&I, 心臓型脂肪酸結合蛋白 (H-FABP), ミオグロビン全血迅速診断法). *ICU と CCU* 2005; 29: 27-35

# 腸管内細菌叢の監視培養検査が有用であった造血器腫瘍患者における

## *Stenotrophomonas maltophilia* による敗血症の 1 例

米玉利 準<sup>1)</sup> 大瀧 博文<sup>1)</sup> 中山 麻美<sup>1)</sup> 安藤 航平<sup>1)</sup> 宮崎 崇<sup>1)</sup>  
太田 浩敏<sup>1)</sup> 古田 伸行<sup>1)</sup> 兼村 信宏<sup>2)</sup> 大楠 清文<sup>3)</sup> 伊藤 弘康<sup>4)</sup>  
清島 満<sup>4)</sup>

### Key words

*Stenotrophomonas maltophilia*, bacterial translocation, 造血器腫瘍患者, 監視培養

### 要 旨

症例は49歳の男性。当院にて、急性リンパ性白血病と診断され、腫瘍に対する化学療法及び造血幹細胞移植を実施した。移植後に発熱を認め、vancomycin および meropenem が投与され、一旦解熱、軽快を認めた。しかし、数日後に再び、極度の好中球減少を伴う発熱を認めたため、血液培養検査と糞便培養検査が同日に実施された。血液培養検査は培養開始翌日に陽性となり、腸内細菌とは異なる細いグラム陰性桿菌を好気ボトルより認めた。一方で、糞便培養検査は、培養開始翌日にオキシダーゼ試験陰性のブドウ糖非発酵菌様の集落のみを認めた。この集落のグラム染色像が血液培養と同様であったことや抗菌薬投与歴の患者背景等から *S. maltophilia* の bacterial translocation による血流感染の可能性があることを中間報告として担当医に報告した。その後、2つの培養検査ともに、*S. maltophilia* と同定された。抗菌薬治療は、中間報告後に minocycline および tazobactam/piperacillin の併用投与に変更され、順調に回復した。本症例は、糞便検体を用いた腸管内細菌叢の監視培養により、早期に適正な抗菌薬による治療を開始できたため、造血器腫瘍患者における腸内細菌叢を報告することの重要性を示唆した1例であった。

### I. はじめに

*Stenotrophomonas maltophilia* は、好気性グラム陰性桿菌であり、ブドウ糖非発酵菌として分類される。通常は環境中に存在しており、病原性も低いため、健常者の感染症の起炎菌となることは少ないが、易感染性宿主に対して、人工呼吸器関連肺炎<sup>1)</sup> やカテーテル関連血流感染<sup>2)</sup>、腸管内からの bacterial translocation による血流感染<sup>3)</sup> を起こすことが知られている。本菌は、染色体上に L-1 型メタロ-β-ラクタマーゼの遺伝子をコードしているため<sup>4)</sup>、カルバペネム系抗菌薬を始めとしたすべてのβ-ラクタム系抗菌薬に耐性を示すことが多い。よって、本菌による感染症においては、適正な抗菌薬による治療が要求される。今回は、発熱性好中球減少症を伴

う造血器腫瘍患者に発症した *S. maltophilia* の敗血症において、糞便検体を用いた腸管内細菌叢の監視培養が早期治療に寄与した1例を報告する。

### II. 症例

患者：49歳、男性。

既往歴：特記すべきことなし。

現病歴：2012年4月より発熱、背部の違和感のため近医受診。血液検査にて、血小板数減少、凝固異常、LD 高値、炎症反応高値を認めたため、敗血症性の DIC を疑い治療が開始された。しかし、LD 高値に改善がないため、造血器腫瘍の可能性が考慮され当院転院となった。

臨床経過：当院の初診時血液検査データにて、blast cell  $26.2 \times 10^3/\mu\text{l}$  であったため、造血器腫瘍が強く

1) 岐阜大学医学部附属病院 検査部

2) 岐阜大学医学部附属病院 輸血部

3) 岐阜大学大学院医学系研究科 病原体制御学分野

4) 岐阜大学大学院医学系研究科 病態情報解析医学分野

表1 発熱時血液検査結果

Peripheral blood	
Erythrocyte	291 × 10 <sup>4</sup> cells/μL
Hemoglobin	8.8 g/dL
Hematocrit	24.2%
Platelet	2.6 × 10 <sup>4</sup> cells/μL
Leukocyte	30 cells/μl
Neutrophil	0 %
Lymphocyte	100 %
Monocyte	0 %
Eosinophil	0 %
Basophil	0 %
Blood chemistry	
Total protein	5.1 g/dL
Albumin	3.0 g/dL
Aspartate aminotransferase	15 IU/L
Alanine aminotransferase	10 IU/L
Lactate dehydrogenase	279 IU/L
Alkaline phosphatase	261 IU/L
Creatinine	0.98 mg/dL
Urea nitrogen	26.2 mg/dL
Sodium	131 mEq/L
Potassium	3.8 mEq/L
Chloride	97 mEq/L
Total bilirubin	0.7 mg/dL
Glucose	116 mg/dL
CRP	5.35 mg/dL

疑われ、骨髄穿刺液における blast cell 88%, ミエロペルオキシダーゼ陰性、フィラデルフィア染色体陽性の結果により、急性リンパ性白血病と診断され

た。2012年5月より、寛解導入療法が開始され、6月から地固め療法、8月から造血幹細胞移植が開始された。移植後の9月に発熱を認めたため、vancomycin (VCM) および meropenem (MEPM) が投与され、一旦解熱、軽快を認めた。しかし、その5日後より再び発熱(40℃)を認め、さらに、炎症反応の上昇、極度の好中球減少(表1)を伴うことから、血液培養検査と糞便培養検査が実施された。そして、2つの培養検査ともに、*S. maltophilia* が検出された。抗菌薬は、推定同定の段階で minocycline (MINO) および tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC) の併用投与に変更し順調に回復した。

### Ⅲ. 細菌学的検査

糞便培養検査においては、好気培養開始翌日にトリプチケースソイ5%ヒツジ血液寒天培地(バクトン・ディッキンソン)およびBTB乳糖加寒天培地(バクトン・ディッキンソン)に乳糖非分解、オキシダーゼ陰性のブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌様の集落のみの発育を認めた。集落のグラム染色は、腸内細菌とは異なる細めのグラム陰性桿菌であった。この時点で、抗菌薬投与履歴、集落形態、オキシダーゼ試験結果、グラム染色像から *S. maltophilia* の bacterial translocation による血流感染の可能性があると担当医に参考所見として中間報告を行った。この集落の同定および薬剤感受性試験をRAISUS(日水製薬)にて行ったところ、*S. maltophilia* と同定され、表2に示す薬剤感受性試験結果が得られた。一般的に *S. maltophilia* に無効とされるβ-ラクタム系薬剤はすべて耐性であったが、有効とされる trimethoprim/sulfamethoxazole (ST) 合剤や levofloxacin (LVFX)、MINO は良好な感受性を示した。血液培養検査は、BD バクテック FX

表2 薬剤感受性試験結果

Antimicrobial agent	MIC (μg/ml)	
	Stool culture	Blood culture
Piperacillin	>64	>64
Ceftazidime	4	16
Ceftriaxone	>32	>32
Cefozopran	>32	>32
Cefmetazole	>32	>32
Aztreonam	>16	>16
Imipenem	>8	>8
Gentamicin	>8	>8
Amikacin	>32	>32
Minocycline	≤2	≤2
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	≤1	≤1
Levofloxacin	≤2	≤2



システム（ベクトン・ディッキンソン）にて、血液培養レズンボトルを用いて実施した。そして、培養開始翌日に糞便培養で分離された菌と同様の形態のグラム陰性桿菌を好気ボトルより認めた。サブカルチャーの後に同定および薬剤感受性試験を RAISUS にて行ったところ、*S. maltophilia* と同定され、薬剤感受性試験結果は糞便培養由来の菌株とほぼ同様の結果であった。

#### IV. 考察

今回の症例においては、造血器腫瘍患者における発熱性好中球減少症の発症時に、血液培養検査と糞便培養検査が同時に実施された。血液培養検査は培養開始翌日に陽性となり、グラム染色所見が得られた。一方で、糞便培養検査は、培養開始翌日に単一の細菌の発育を認め、集落形態、グラム染色所見、オキシダーゼ試験結果が得られた。血液培養と糞便培養におけるグラム染色所見が共に腸内細菌とは異なる細い形態であったことやオキシダーゼ試験陰性、抗菌薬投与歴から *S. maltophilia* の bacterial translocation による血流感染の可能性があると担当医に報告し、その後、担当医による抗菌薬の変更が行われた。そして、結果的に2つの培養検査ともに *S. maltophilia* と同定された。すなわち、糞便検体による腸管内細菌叢の監視培養を同時に実施していたことで、早期に抗菌薬を変更することが可能であった。日常検査で分離されるブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌においてオキシダーゼ試験陰性を示す菌は、*Acinetobacter* spp. と *S. maltophilia* が上げられるが<sup>5)</sup>、*Acinetobacter* spp. は球菌様の染色所見を示すことが多く、容易に鑑別することが可能であると思われた。

造血器腫瘍患者で造血幹細胞移植を実施する場合においては、移植前の化学療法や放射線治療により口腔から腸管にかけて粘膜障害を引き起こすことが多い。よって、好中球減少時における口腔や腸管からの bacterial translocation による敗血症に対する治療を考慮しなければならない。発熱性好中球減少症の治療においては、第4世代セファロsporin系抗菌薬の cefepime が保険承認されており、広域スペクトラムを有するカルバペネム系抗菌薬とともに多くの症例で使用されている。よって、この時期に実施する糞便の監視培養では、これらの薬剤に耐性を有するメチシリン耐性ブドウ球菌や腸球菌、グラム陰性桿菌が検出されることが多い<sup>6)</sup>。糞便の監視培養を実施する際は、これらを念頭に置き、本症例の様に通常の腸内細菌叢とは異なる結果が得られた場合には、積極的に検査を実施し、迅速に報告する必要があると考えられた。

*S. maltophilia* は環境中に存在してしており、特に、水回りや土壌、植物から検出されることが多い。

一般的に、市中感染の原因菌とされるケースは極めてまれであり、病院内感染がほとんどである<sup>7)</sup>。*S. maltophilia* による感染のリスク因子として、重度の易感染性宿主、血管内カテーテルの留置、人工呼吸器管理、広域抗菌薬投与等が上げられる。特に、造血器腫瘍患者等で、好中球減少が長期間継続した状態や、粘膜炎症を伴っている場合は *S. maltophilia* の血流感染のリスクが上昇するとされる<sup>3)</sup>。また、染色体上に L-1 型メタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を保有しているため、カルバペネム系薬剤を含むすべての  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬が無効であることが多く、血流感染を起こした場合においては、早期の報告が極めて重要となる。一般的に、同定が確定していない段階でのグラム陰性桿菌感染症に対する初期治療には、カルバペネム系抗菌薬や第4世代セファロsporin系抗菌薬が選択されるケースが多く、*S. maltophilia* に有効とされる ST 合剤や MINO、キノロン系抗菌薬が選択されるケースは少ない。発熱性好中球減少症の患者において、lipopolysaccharide の影響を受けるグラム陰性桿菌の感染症が長期間継続している状態は予後に重大な影響を及ぼすと考えられるため、適正な抗菌薬治療が行われていない場合は一刻も早い抗菌薬変更が肝要である。今回の薬剤感受性試験結果においても、ceftazidime (CAZ) を除くすべての  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬に高度耐性を示した。CAZ は高度耐性を示さなかったが、MIC 値は糞便由来株で  $4 \mu\text{g/ml}$ 、血液由来株で  $16 \mu\text{g/ml}$  であるため実際の治療に使用されるべきではないと考えられた。しかし、CLSI document M100-S23<sup>8)</sup> は CAZ のブレイクポイントを設定しており、 $8 \mu\text{g/ml}$  以下の濃度であれば感性、 $32 \mu\text{g/ml}$  以上の濃度であれば耐性と判定している。このような場合は、担当医に臨床無効の可能性があると伝える必要があると考えられた。本症例においては、MINO の投与により治療が奏効した。当院の *S. maltophilia* のアンチバイオグラムにおいても、ST 合剤、MINO、LVFX に対する耐性株は非常に少ないため、本菌の感染症においては、まず同定結果を迅速に報告することが極めて重要であると思われた。しかし、文献上ではこれらの抗菌薬に対する耐性株も報告されているため<sup>7)</sup>、引き続き薬剤感受性試験結果を注視していく必要があると考えられる。

#### V. 結語

今回我々は、発熱性好中球減少症を伴う造血器腫瘍患者において、糞便検体を用いた腸管内細菌叢の監視培養により、早期に bacterial translocation による血流感染を察知することが可能であった。適正な抗菌薬による治療を迅速に開始できたため、造血器腫瘍患者における腸内細菌叢を報告することの重要性を改めて示すことができた。

## VI. 参考文献

---

- 1) Weber DJ et al: Microbiology of ventilator-associated pneumonia compared with that of hospital-acquired pneumonia, *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28: 825-831.
- 2) Boktour M et al: Central venous catheter and *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in cancer patients, *Cancer* 2006; 106: 1967-1973.
- 3) Araoka H et al: Risk factors for mortality among patients with *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in Tokyo, Japan, 1996-2009, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29: 605-608.
- 4) Denton M et al: Correlation between genotype and beta-lactamases of clinical and environmental strains of *Stenotrophomonas maltophilia*, *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 555-558.
- 5) 小栗豊子：臨床微生物検査ハンドブック第4版, p124-125, 三輪書店, 東京, 2011.
- 6) 池ヶ谷論史ほか：血液疾患における Febrile neutropenia に対する抗菌剤のサイクリング療法, *感染症誌*2004 ; 78 : 241-247.
- 7) Looney WJ et al: *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen, *Lancet Infect Dis* 2009; 9 : 312-323.
- 8) Clinical and Laboratory Standards Institute: M100-S23 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, p 69, CLSI, USA, 2013.

# 直腸癌の抗癌剤治療中に血液培養から

## “*Desulfovibrio fairfieldensis*” が分離・同定された 1 症例

桂川 晃一<sup>1)</sup> 大楠 清文<sup>3)</sup> 岸 留美<sup>1)</sup> 波多野正和<sup>1)</sup> 砂川 祐輝<sup>2)</sup>  
田中香お里<sup>4)</sup>

### Key words

*Desulfovibrio fairfieldensis*, 遺伝子解析, 血液培養, 嫌気性菌

### Abstract

症例は71歳, 男性. 進行性直腸癌とイレウスのため人工肛門造設を施行された. その後, 外来通院で抗癌剤治療中に食欲低下や貧血を呈し, 当院に入院となった. 入院7日目の発熱時に実施された血液培養検査で5日目に嫌気ボトルのみ陽転し, 湾曲状のグラム陰性桿菌が観察された. サブカルチャーの嫌気培養48時間後に微小な集落を認め, デスルフォビリジンテスト陽性であったことから, *Desulfovibrio* 属菌と推定された. その後, 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の相同性によって, “*Desulfovibrio fairfieldensis*” と同定された. *Desulfovibrio* 属菌はヒトの腸管に存在しており, 腸管粘膜に障害がある患者や腸管の手術を契機にバクテリアル・トランスロケーションによって敗血症を惹起した症例が散見される. *Desulfovibrio* 属菌の同定においては, 患者背景, 臨床症状や病態, 治療経過を把握した上で, グラム染色所見や集落の性状, さらには生化学的性状などから菌種を推定することが可能である. 特に, 大腸癌や肝胆道系感染症の患者で, 嫌気ボトルのみが陽性となり, グラム染色にて湾曲状の菌体を認めた場合は, *Desulfovibrio* 属を念頭において検査を進めることが重要である.

## 序文

*Desulfovibrio* 属は, 湾曲あるいは螺旋状で運動性のある偏性嫌気性グラム陰性桿菌である. 硫酸還元性を有し, 大量の硫化水素を産生することが特徴である. 淡水, 海洋, そして汽水などの自然界に広く分布しており, 石油生産プラントや他の工業用水にも存在し<sup>1)</sup>, 金属やコンクリートを腐食させるため, 問題となっている<sup>1,2,3)</sup>. 一方で, ヒトや動物の腸管や口腔にも常在している. 近年, 本菌による感染症の報告が散見されるようになり, その病態は腹腔内膿瘍, 敗血症, 脳膿瘍など多岐にわたっている. 今回, われわれは進行性直腸癌の抗癌剤療法中に敗血症を発症し, 血液培養の嫌気ボトルから “*Desulfovibrio fairfieldensis*” を分離・同定した症例を経験したので, 本菌種の特徴と文献的な考察を含めて報告する.

## I. 症例

症例: 71歳, 男性.  
主訴: 食欲低下, 立ちくらみ.  
既往歴: 高血圧, 糖尿病.  
現病歴: 10か月前に進行性直腸癌・イレウスに対してS状結腸双孔式で人工肛門造設術が施行された. その後, 術後補助化学療法である oxaliplatin と capecitabine の併用療法が5ヶ月間実施された. 入院7日前より tegafur・gimeracil・oteracil potassium と irinotecan の併用療法が導入され, 通院の抗癌剤治療を行っていた. 化学療法で外来を受診したところ, 食欲低下や低血圧がみられ, 血液検査にて貧血や脱水を認めたため, そのまま入院となった(表1).  
臨床経過(図1): 入院日に輸血が行われ, 第2病日より G-CSF, cefepime の投与が開始された. 第

1) JA 岐阜厚生連中濃厚生病院 検査科,

2) JA 岐阜厚生連中濃厚生病院 外科,

3) 岐阜大学大学院医学系研究科 病原制御学分野,

4) 岐阜大学生命科学総合研究支援センター 嫌気性菌研究分野

表1 血液検査所見

項目	入院7日前	入院時	
WBC	/ $\mu$ l	9,300	3,200
RBC	$10^4$ / $\mu$ l	297	239
Hb	g/dl	8.4	6.8
Ht	%	26.6	20.5
PLT	$10^4$ / $\mu$ l	42.3	31.9
CRP	mg/dl	12.21	
ALB	g/dl	2.3	1.9
BUN	mg/dl	16.7	40.1
CRE	mg/dl	0.59	1.18
T-BIL	mg/dl	0.4	
AST	IU/l	13	9
ALT	IU/l	19	15
LD	IU/l	166	131
ALP	IU/l	417	
Na	mEq/l	140	134
K	mEq/l	3.9	3.3
Cl	mEq/l	101	99
CEA	ng/ml	223.6	
CA 19-9	U/ml	1037.7	

7病日に悪寒，発熱，意識レベルの低下を認めため，血液培養が2セット採取された。第8病日にさらに状態が悪化したので，緩和医療の方針となった。第9病日に肛門部から露出した腫瘍による自潰を認め，metronidazoleの軟膏が処方された。第13病日には意識レベルが低下し，永眠された。

## II. 微生物学的検査

### 1. 血液培養検査とサブカルチャー

入院7日目の発熱時に血液培養が2セット採取された。血液培養検査は，全自動微生物培養検出装置 BacT/ALERT 3D（シスメックス・ビオメリュー）を用いて実施した。培養5日目，提出された2セットのうち，嫌気のSNボトル1本のみが陽転した。培養液のグラム染色を実施したところ，グラム陰性の湾曲状の桿菌が確認された（図2）。そこで，サブカルチャーは微好気，炭酸ガス，嫌気の3つの環境下で実施した。すなわち，微好気培養は，*Campylobacter*属や*Helicobacter*属を疑い，TSA II 5%ヒツジ血液寒天培地，CCDA培地（関東化学）を使用し，ダイア微好気パック標準ジャー用（三菱化学メディエンス）と2.5Lのジャーを用いて35℃と42℃で培養した。5%炭酸ガス環境下では，TSA II 5%ヒツジ血液寒天培地（日本ベクトン・ディッキンソン，以下日本BD）を使用して35℃で培養した。さらに，嫌気培養は，TSA II 5%ヒツジ血液寒天培地を使用し，ダイア嫌気パックジャー用（三菱化学メディエンス）とパウチ袋を用いて嫌気状態にして35℃で培養した。その結果，嫌気培養48時間後に，0.1~0.3mmの非常に小さい半透明で非溶血のスムーズな集落の発育が認められた（図3）。一方，炭酸ガス培養および微好気培養では7日間培養を継続したが，集落の発育を認めなかった。

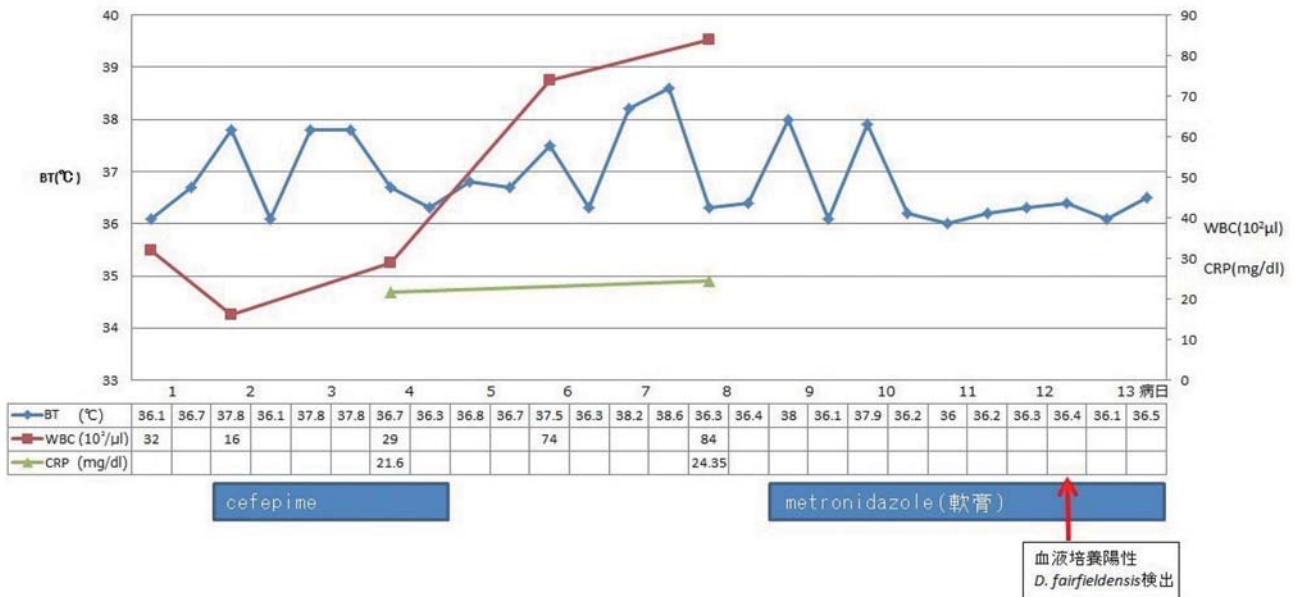


図1 臨床経過

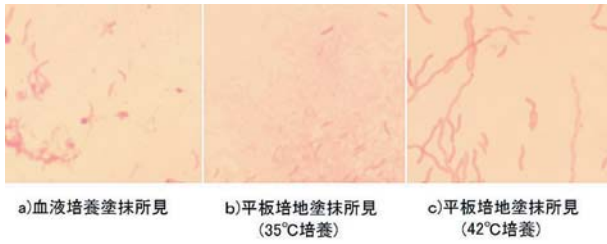


図2 分離菌株のグラム染色像 (B&M法×1,000)

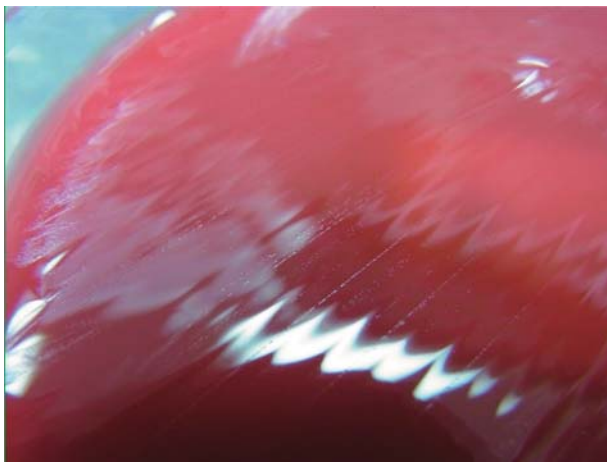


図3 嫌気培養2日後のヒツジ血液寒天培地上の集落外観

## 2. 同定検査

菌種の同定はBD BBLCRYSTAL ANA (日本BD)を用いて実施したが、判定不能であった。そこで、嫌気ボトルのみが陽性となり、嫌気条件下で発育を認め、菌体が湾曲状であったことから *Desulfovibrio* 属の菌種を疑い、デスルフォビリジンテストを実施した。すなわち、コロニーを綿棒で拭い、2NのNaOHを菌塊に1滴滴下して暗所で紫外線を照射したところ、赤色蛍光を示したため、陽性と判定した。当院検査室では、これ以上の詳細な菌種の同定は困難と判断して、岐阜大学病原体制御学分野に遺伝子学的な同定を依頼した。分離菌株の16SrRNA 遺伝子の塩基配列を決定した後、データベースで基準株の配列との相同性を検索したところ、“*Desulfovibrio fairfieldensis*” (GenBank accession No. U42221)と100% (1467/1467)一致したので本菌種と同定された。

## 3. 薬剤感受性試験およびβラクタマーゼ試験

薬剤感受性試験はNakaoら<sup>4)</sup>の方法に従い、E-test (シスメックス・ビオメリュー)を用いて岐阜大学嫌気性菌研究分野でMIC値の測定を行った。その結果、piperacillin, tazobactam/piperacillin, ceftazidimeの各抗菌薬のMIC値は高かったが(いずれも256μg/ml), sulbactam/ampicillin, clindamycin, metronidazoleには感性であった(表2)。また、ニトロセフィン法のセフィナーゼディスク(日本

表2 薬剤感受性試験の結果

薬剤名	MIC判定基準値* (μg/ml)		MIC (μg/ml)	判定
	S	R		
ampicillin	≤0.5	≥2	8	R
sulbactam/ampicillin	≤4/8	≥16/32	8	S
piperacillin	≤32	≥128	>256	R
tazobactam/piperacillin	≤4/32	≥4/128	>256	R
ceftazidime			>256	
imipenem/cilastatin	≤4	≥16	2	S
meropenem	≤4	≥16	3	S
clindamycin	≤2	≥8	0.047	S
minocycline			6	
metronidazole	≤8	≥32	<0.016	S

\*:CLSI document M11-A7

S: susceptible, R: resistant

表3 *Desulfovibrio* 属の4菌種と分離菌株の生化学的な性状の比較

表現型の特徴	臨床分離株	<i>D. fairfieldensis</i>	<i>D. desulfuricans</i>	<i>D. vulgaris</i>	<i>D. piger</i>
運動性	+	+	+	+	-
カタラーゼ	+	+	V	-	-
インドール	-	-	-	+	-
ウレアーゼ	NT	-	+	-	-
硝酸塩還元	NT	V	+	-	-
H <sub>2</sub> S産生性	+	+	+	+	+
胆汁での発育	+	+	-	+	+

+:陽性, -:陰性, V:不定, NT:未実施

BD)を用いてβラクタマーゼ試験を実施したところ、陰性であった。

## Ⅲ. 考察

*Desulfovibrio* 属の細菌は硫酸還元能を有するため、硫酸塩を還元する過程で生成される硫化水素により、腸粘膜の炎症や潰瘍形成を惹起し、潰瘍性大腸炎の原因菌として報告されている<sup>2,3,4,5)</sup>。本属には2013年12月現在、65菌種、8亜種が記載されており、これらのなかでヒトからの分離頻度が高いのは、*D. desulfuricans*, *D. piger*, *D. vulgaris*の3菌種である<sup>4,6)</sup>。これら3菌種のほか、本症例で今回分離された“*D. fairfieldensis*”は、まだ正式な記載が行われておらず、未承認の菌種であるため、通称名(俗称)ではあるものの、近年、本菌による感染症の報告例が散見される。“*D. fairfieldensis*”が原因菌となった感染症は、1996年にTEEらが報告<sup>1)</sup>した肝膿瘍が初めてであり、それ以降、敗血症、腹腔内膿瘍、歯周炎などの症例が報告されている<sup>7)</sup>。また、大腸癌、虫垂穿孔などの腹腔内疾患や腸管の手術を契機に敗血症を起こした症例も数例報告されている<sup>2,5,7,8)</sup>。われわれの症例も直腸癌・イレウスに対して、人工肛門造設が行われ、術後に抗癌剤の化学療法中の患者であった。したがって、“*D. fairfieldensis*”による感染症は、大腸癌、潰瘍性大腸炎、肝胆道系感染症、さらには抗癌剤の投与などの基礎疾患がある易感染性宿主に発症することが多く、腸管粘膜の防御機構の破綻によって、バクテリアル・トランスロケーションを引き起こし、敗血症に至ると推察される。

*Desulfovibrio* 属の同定は、デスルフォビリジンテストの陽性が最大のポイントである。しかしながら、*Bilophila wadsworthia*も本試験が陽性となる

ため、本菌種との鑑別が重要である。これら2菌群については、*Desulfovibrio*属菌は菌体が湾曲状である一方、*B. wadsworthia*の菌体は湾曲していない一般的な桿菌であること、さらに、*Desulfovibrio*属菌のカタラーゼ試験は陰性（“*D. fairfieldensis*”は弱陽性）であるが、*B. wadsworthia*は強陽性を示す点で鑑別できる。

*Desulfovibrio*属菌でヒトの臨床材料から分離される4菌種と今回、われわれの分離菌との生化学的性状を比較した<sup>2,3,5,6,7,8)</sup> (表3)。硫化水素産生の判定においては、*D. desulfuricans*と*D. vulgaris*は24時間後に全体的に黒くなるものの、“*D. fairfieldensis*”と*D. piger*、では一部分のみが黒変して全体が黒くなるまでに数日間かかり、その速度は“*D. fairfieldensis*”が最も遅い<sup>6)</sup>。事実、本症例の菌株は24時間後では穿刺部のみが黒変し、その後3～5日かけてSIM培地全体が黒変した。したがって、“*D. fairfieldensis*”は日常検査において硫化水素産生による培地の黒変の度合いとその速度が重要な鑑別ポイントになると考えられる。*D. piger*は*Desulfovibrio*属で例外的に運動性がないこととカタラーゼ試験が陰性であることから“*D. fairfieldensis*”と鑑別できる。

*Desulfovibrio*属菌の薬剤感受性の特徴は、metronidazoleやclindamycinに良好な感受性を示すが、piperacillin, tazobactam/piperacillinには高度耐性である。特に、“*D. fairfieldensis*”は他の菌種と比較してセファロsporin系薬やキノロン系薬、imipenemを除くカルバペネム系薬に対するMIC値が高く低感受性～耐性を示すという報告がある<sup>2,3,4,6,7)</sup>。われわれの分離菌においても同様な傾向を示したが、カルバペネム系薬についてはimipenem, meropenemともに感性であった(2および3 µg/ml)。カルバペネム系薬の薬剤感受性に関してはまだ情報が少ないため、今後のデータの蓄積を待ちたい。

#### IV. 結語

以上のように、“*D. fairfieldensis*”は、臨床的には分離頻度の少ない菌種であるが、患者背景、臨床症状や病態、治療経過を把握した上で、グラム染色所見や集落の性状、さらには生化学的性状などから病院検査室の現場でも菌種を推定することが可能である。とりわけ、大腸癌や肝胆道系感染症の患者で、嫌気ボトルのみが陽性となり、グラム染色にて湾曲状の菌体を認めた場合は、*Desulfovibrio*属を念頭において検査を進めることが肝要である。さらに、本属菌は血液培養では3～7日後に陽性になるとの報告がある<sup>2,3,5,7,8)</sup>ため、上述のような患者背景から本属菌の関与が疑われた場合には、血液培養を7日間まで延長して培養することも重要である。

#### 文献

- 1) Tee W et al.: Probable New Species of *Desulfovibrio* Isolated from a Pyogenic Liver Abscess, *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 1760-1764.
- 2) Loubinoux J et al.: Bacteremia Caused by a Strain of *Desulfovibrio* Related to the Provisionally Named *Desulfovibrio fairfieldensis*, *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 931-934.
- 3) McDougall R et al.: Bacteremia Caused by a Recently Described Novel *Desulfovibrio* Species, *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 1805-1808.
- 4) Nakao K et al.: Susceptibilities of 23 *Desulfovibrio* Isolates from Humans, *Antimicrob. Agents Chemother* 2009; 53: 5308-5311.
- 5) 大楠清文, 江崎孝行: 臨床的に重要な珍しい細菌の培養・同定のポイント, *臨床と微生物* 2013; 40: 621-625
- 6) Warren YA et al.: Biochemical Differentiation and Comparison of *Desulfovibrio* Species and Other Phenotypically Similar Genera, *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 4041-4045.
- 7) Urata T et al.: Bacteremia caused by *Desulfovibrio fairfieldensis*, *J Infect Chemother* 2008; 14: 368-370
- 8) Pimentel JD et al.: *Desulfovibrio fairfieldensis* Bacteremia Associated with Cholelithiasis and Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography, *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45: 2747-2750.

# 小児の無呼吸発作における PSG 検査の有用性

石郷 景子<sup>1)</sup> 中島 直美<sup>1)</sup> 澤村 聖子<sup>1)</sup> 大橋 依子<sup>1)</sup> 樋口 修<sup>1)</sup>  
伊藤 真隆<sup>2)</sup> 見松はるか<sup>2)</sup> 兵藤 玲奈<sup>2)</sup> 前田 剛志<sup>2)</sup> 本部 和也<sup>2)</sup>

## Key words

無呼吸性てんかん 新生児無呼吸 脳波モニタージュ 呼吸イベント 酸素飽和度

## I. はじめに

通常てんかん発作か否かを診断するには発作時の脳波が必要になる。その発作が無呼吸を伴っているような場合は、通常の脳波検査だけではなく多くの情報を同時に測定できるポリグラフで測定したほうがより診断の補助になる。今回、無呼吸発作で入院し脳波、及びポリソムノグラフィ（以下 PSG）検査を実施した小児 2 症例を報告する。

## II. PSG 検査の目的・意義

### 1. 睡眠関連てんかん

てんかん発作のほとんどが睡眠段階 2 の non REM 期で始まる。PSG 検査で発作中の心拍数、血圧、呼吸に一時的な自律神経系変化が確認されることもある。てんかんが疑われる場合は標準的な 16～20 チャンネルの脳波を日中にも行うべきである<sup>1)</sup>。

### 2. 乳幼児期の原発性睡眠時無呼吸

身体の小さな早産児で最もよく観察される無呼吸は混合性睡眠時無呼吸で、無呼吸全体の 50～75% を占め、閉塞性無呼吸は 10～25% である。PSG 検査は乳児の睡眠呼吸障害の診断において、チャンネルの少ない記録でも臨床的概要をみるためには極めて有用である<sup>2)</sup>。

## III. 方法

### 1. 装着方法（図 1）

- 1) 体位センサ：身体が小さいことと寝返りをしないため体には装着せず、児の横においた。
- 2) 電極：頭の上で束ね、伸縮包帯で巻いた。
- 3) SpO<sub>2</sub> センサ：成人用を使用し足に装着した。
- 4) それ以外は成人の検査法に準じた。

### 2. 検査時間帯

発作を捉える目的であるため発作の起こりやすい

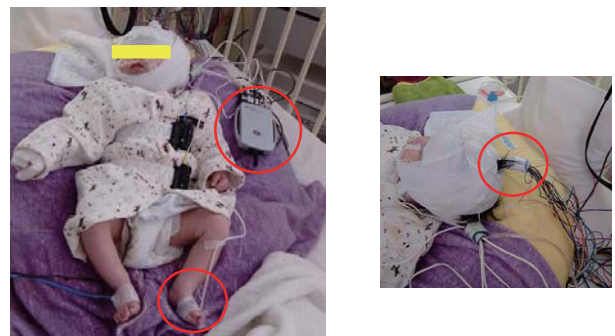


図 1. 装着方法

時間帯とした。

### 3. モンタージュ（図 2）

当院のモンタージュは現在成人用、小児用、新生児用の 3 種類を使用している。症例 1 のモンタージュは使用機器が Alice 4 のため電極の追加が限られていたため従来のモンタージュに F3、F4、T3、T4 を加えたもので使用した。症例 2 は使用機器がエンブラ使用のため電極の追加は自由に出来た。1 回目は新生児用（1 ヶ月時）を、2 回目は小児用（3 ヶ月時）を使用した。いずれもルーチン脳波のモンタージュである。

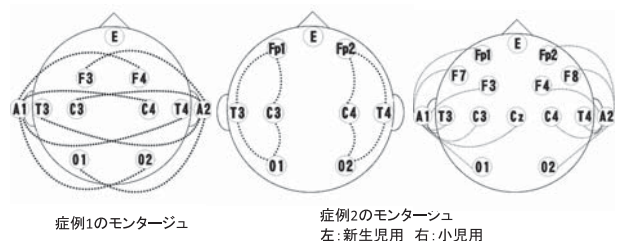


図 2. モンタージュ

1) 大垣市民病院 医療技術部 診療検査科 生理機能室  
2) 大垣市民病院 小児循環器・新生児科

#### 4. 解析

脳波において2ヶ月未満は新生児の判定基準<sup>3)</sup>を、2ヶ月以上はAASMによる判定マニュアルに準じた<sup>4)</sup>。呼吸イベントもAASMによる判定マニュアルに準じ<sup>4)</sup>、児の睡眠時の2呼吸分とした。

### IV. 症例 1

4ヶ月 男児。主訴 無呼吸。在胎38週、3010gで出生。生後より哺乳不良。4ヶ月検診で固視、追視、あやし笑いがなく、未定頸を指摘された。4ヶ月時に突然、無呼吸、チアノーゼを呈し当院受診。その後も同発作を繰り返すため小児科入院となった。発作を記録するため21回の脳波検査と1回のPSG検査を実施した。PSG検査は1歳時に実施した。記録は昼から翌朝まで行い、呼吸イベントは5秒で判定した。結果は検査中、発作22回で、無呼吸を伴う発作は19回であった。内訳は中枢性無呼吸7回、低呼吸12回であった。無呼吸を伴わない発作は3回であった。最低SpO<sub>2</sub>は84%、最長呼吸イベント時間 58.0秒であった。

発作の始まりは徐波が出現しだいに周波数の少ない振幅の高い波にと変化していった(図3)。発作はまず脳波に変化が現れ、無呼吸となりSpO<sub>2</sub>の低下の順に出現した(図4)。

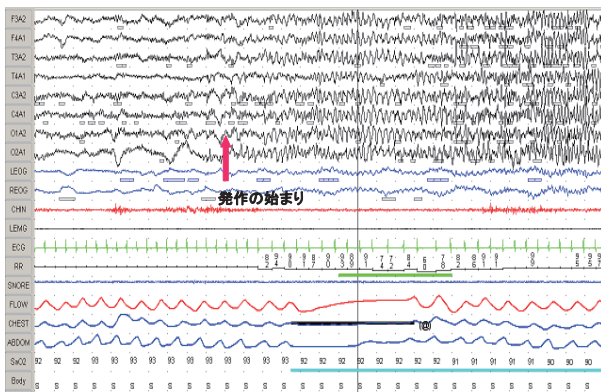


図3. 症例1 (脳波の発作のはじまり)

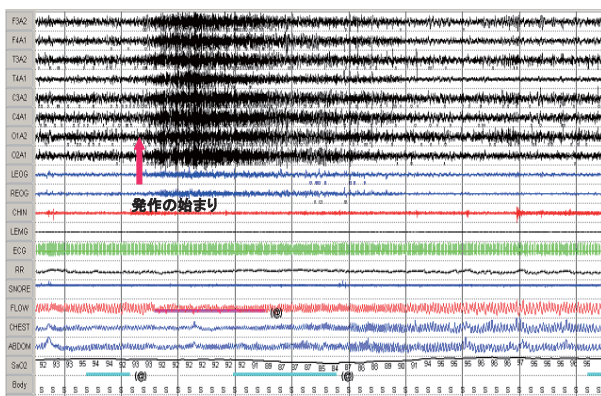


図4. 症例1 (発作の全体像)

### V. 症例 2

1ヶ月 女児。主訴 無呼吸。在胎36週、2098gで出生。早期産低出生体重のため、他院より新生児搬送された。日齢2日目より無呼吸発作あり。頭部エコーでは明らかな異常は認めず、哺乳も順調に増量でき日齢20日目で退院した。日齢32日目の朝11時頃母乳を飲んで寝た後、突然チアノーゼとなり呼吸をしていなかったため救急車を要請、入院となった。入院中も何度か無呼吸症状があり、2回の脳波と1回のPSG検査を実施した。乳幼児感知センサのベビーセンスをレンタルして退院となった。退院後、外来で1回PSG検査を実施した。PSG検査は1ヶ月時と3ヶ月時に実施し、記録は日勤帯で行い、呼吸イベントは5秒で判定した。結果は1回目AHI16.9回/時、最低SpO<sub>2</sub>70%、最長呼吸イベント時間 29.8秒、呼吸イベントは中枢性無呼吸と低呼吸であった。2回目AHI3.9回/時、最低SpO<sub>2</sub>287%、最長呼吸イベント時間 11.2秒、呼吸イベントは脳波に変化なく中枢性無呼吸が出現した(図5)。

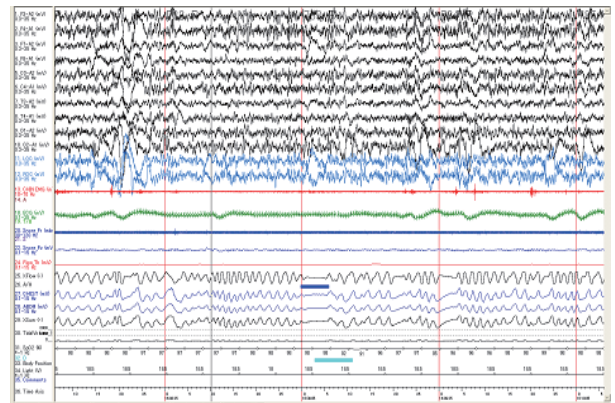


図5. 症例2 (中枢性無呼吸)

### VI. 考察

1症例目は無呼吸てんかん、2症例目は新生児無呼吸と診断された。日本では新幹線の運転手の事故以来、PSG検査は睡眠時無呼吸症候群の検査として注目されてきた。だが、睡眠時無呼吸症候群は睡眠障害の一部に過ぎず、広い意味では色々な疾患にも実施されるべきである。通常、てんかんの診断には脳波検査が必須だが、今回のような無呼吸を伴う場合にはSpO<sub>2</sub>センサをはじめ多くのデータが得られるPSG検査は有用である。今までのPSG検査における脳波は睡眠段階をみるために利用されてきた。しかし最近のPSG機器は通常の脳波の誘導が測定できる機器もでてきた。そのため年齢や検査の目的により脳波電極の数を増やしたり、誘導の組み直しをしたりして使用することでより多くの情報が



得られる。今後、PSG 検査は睡眠時無呼吸症候群の検査にとどまらず検査の幅が広がると考えられる。そのためには年齢に応じた脳波の変化も念頭に入れて検査を実施していく必要がある。

## VII. 結語

小児の無呼吸を伴う疾患の違った2症例を報告した。通常てんかん発作か否かを捉えるには長時間脳波検査が実施される。しかし無呼吸やチアノーゼを伴う発作の場合は通常の脳波機器ではSpO<sub>2</sub>センサをチェックはできるが、PSG 機器のように波形としては記録されてこないとためポリグラフであるPSG 検査が有効である。それに反して記録中にリアルタイムに記録の誘導など変更できるのは脳波機器であり、Case by case によって使い分けを行うことも重要である。

## 参考文献

- 1) American Academy of Sleep Medicine：睡眠関連てんかん，244-247，睡眠障害国際分類第2版 診断とコードの手引，医学書院 東京 2010年
- 2) American Academy of Sleep Medicine：乳幼児期の原発性睡眠時無呼吸，49-52，睡眠障害国際分類第2版 診断とコードの手引，医学書院 東京 2010年
- 3) 奥村彰久，新島新一 他：新生児の脳波パターン，誰でも読める新生児脳波 新生児脳波の読みかた&考えかた，19-30，診断と治療社 東京 2008年
- 4) American Academy of Sleep Medicine：視察判定ルール，AASM による睡眠および随伴イベントの判定マニュアル，32-35，株式会社ライフ・サイエンス 東京 2010年

# 結核菌群検出における LAMP 法の日常検査への導入と有用性の評価

大栗田香織<sup>1)</sup> 藤木 誠<sup>1)</sup> 諏訪 浩<sup>1)</sup>

## Key words

結核 LAMP 法 PURE 法

## 要 旨

結核菌の迅速かつ正確な検出と同定は、患者の適切な治療を行うためだけでなく、当院においては、近隣の結核病床を有する施設への緊急搬送を行う上でも極めて重要な検査である。今回、われわれは、Procedure for ultra rapid extraction (PURE) 法と Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を組み合わせた結核菌の検出・同定法を日常検査に導入し、その有用性について、塗抹検査、培養検査の成績および結果報告に要した時間を含めて比較・検討した。2011年11月から2013年10月までに当院細菌検査室に抗酸菌検査を目的として提出された検体のうち、LAMP 法の依頼があった235件を対象とした。対象検体中、塗抹検査において25件が陽性となり、このうち、LAMP 法陽性は9件であった。これら9件は、培養検査においてもすべて結核菌群が分離・同定された。一方、LAMP 法陰性検体では、いずれの培養検査においても結核菌群は陰性であった。したがって、LAMP 法の信頼度評価は感度100%、特異度100%であった。また、結果報告までの所要時間に関しては、LAMP 法導入以前は遺伝子検査を外部委託していたため、検査結果の報告までに2日を要していたが、LAMP 法の導入後は約1時間であり、迅速な報告が可能となった。以上の成績より、結核菌群診断における LAMP 法の日常検査への導入は、非常に有用性が高いことが示唆された。

## 序文

結核をはじめとした抗酸菌感染症の診断や結核と非結核性抗酸菌症の鑑別を行うことは、治療法の選択と予後の推測に極めて重要である。近年、結核菌や非結核性抗酸菌の迅速な検出と同定のために、従来からの塗抹・培養検査に加え、遺伝子検査も実施されている<sup>1)</sup>。当院ではこれまで、塗抹・培養検査のみを院内で実施し、遺伝子検査は外部の検査所に委託していた。そのため、抗酸菌染色で菌体が観察された場合には、結核菌か非結核性抗酸菌かの鑑別を行うことができないまま、患者を結核症疑いとして院内感染対策も考慮し近隣の結核病床を有する施設へ搬送する必要があった。今回、検査材料から約1時間で結核菌群の検出が可能な PURE-LAMP 法を院内検査として導入し、その結果と有用性について検討を行ったので報告する。

## I. 対象および方法

### 1. 対象

2011年11月から2013年10月までの2年間に当院細菌検査室に抗酸菌検査を目的として提出された検体のうち、LAMP 法の依頼があった235件(喀痰233件、胃液1件、腹水1件)を対象とした。

### 2. 方法

塗抹検査は、直接塗抹にてチール・ネールゼン染色を行い、結核菌検査指針2007の菌数表記に従い報告した<sup>1)</sup>。培養検査は、4%NaOHで前処理した検体の0.1mlを2%および3%小川培地へそれぞれ接種し、35℃にて8週間培養した。

LAMP 法は、Loopamp PURE-DNA 抽出キット(栄研化学)および Loopamp 結核菌群検出キット(栄研化学)を用い、いずれもメーカーにて推奨される方法に準拠して行った。なお、核酸の抽出に際

1) 岐阜県立下呂温泉病院 臨床検査部

して検体の前処理を行わない直接法で行った。さらに、培養検査において抗酸菌の発育を認めた検体に対しても LAMP 法を実施し、結核菌群の有無を確認した。

## II. 結果

2 年間に提出された 235 検体中、塗抹検査陽性検体は 25 件であった（陽性率 10.6%）。塗抹陽性の 25 件中、LAMP 法陽性は 9 件、陰性は 16 件であった（表 1）。LAMP 法で陽性の 9 件は培養検査においてもすべて結核菌群が検出され、LAMP 法と培養法の一貫率は 100% であった（表 2）。また、塗抹検査陽性かつ LAMP 法陰性の 16 件中 8 件は培養検査

にて抗酸菌の発育を認めたため、これらの菌株を LAMP 法にて検査したところ、すべての菌株において、結核菌群は陰性であった（表 3）。これら 8 件のうち、4 件は外部委託での遺伝子検査によって *Mycobacterium avium* complex (MAC) が検出され、残る 4 件は、その他の非結核性抗酸菌が推定された。なお、塗抹検査陰性、LAMP 法陰性の 210 件のうち 3 件は抗酸菌の発育を認めたが、いずれも結核菌群は陰性であった。

## III. 考察

LAMP 法は栄研化学が開発した、迅速かつ簡易な等温遺伝子増幅法である。本法は、標的遺伝子の

表 1 LAMP 法と直接塗抹検査の相関性

		LAMP法		合計
		陽性	陰性	
直接塗抹	陽性	9	16	25
	陰性	0	210	210
合計		9	226	235

検体数 n=235 一致率 93% (219/235)

表 2 LAMP 法と培養検査の相関性

		LAMP法		合計
		陽性	陰性	
培養	陽性	9	0	9
	陰性	0	0	0
合計		9	0	9

検体数 n=9 一致率 100% (9/9)

表 3 塗抹検査または培養検査の陽性検体における LAMP 法の結果

症例 No.	年齢	性別	検体	塗抹	培養	LAMP法 (検体)	LAMP法 (培養菌株)
1	92	女性	喀痰	1+	+	+	+
2	90	男性	喀痰	±	+	-	-
3	69	女性	喀痰	±	-	-	未実施
4	88	男性	喀痰	1+	-	-	未実施
5	78	男性	喀痰	±	-	-	未実施
6	91	女性	喀痰	±	+	+	+
7	73	女性	喀痰	1+	+	+	+
8	87	女性	喀痰	2+	+	+	+
9	85	女性	喀痰	1+	+	-	-
10	78	女性	喀痰	-	+	-	-
11	61	女性	喀痰	1+	+	-	-
12	90	女性	喀痰	2+	+	+	+
13	94	女性	喀痰	1+	+	+	+
14	73	女性	喀痰	1+	+	+	+
15	91	女性	喀痰	-	+	-	-
16	92	女性	喀痰	-	+	-	-
17	94	女性	喀痰	1+	+	+	+
18	95	女性	喀痰	±	+	-	-
19	89	男性	喀痰	1+	-	-	未実施
20	87	男性	喀痰	1+	+	-	-
21	73	男性	喀痰	±	-	-	未実施
22	96	男性	喀痰	±	-	-	未実施
23	74	女性	喀痰	1+	-	-	未実施
24	86	女性	喀痰	1+	+	-	-
25	88	女性	喀痰	1+	+	-	-
26	81	男性	喀痰	±	+	-	-
27	80	女性	喀痰	±	-	-	未実施
28	87	女性	胃液	1+	+	+	+

6つの領域に対して4種類のプライマーを設定し、置換反応を利用して一定温度で増幅反応させることを原理としている。すなわち、対象遺伝子、プライマー、鎖置換型DNA合成酵素、基質等を混合し、65°C付近で保温することによって反応が進み、検出までの工程を1ステップで実施できることが利点である<sup>2)</sup>。

当院はこれまで、結核菌群の遺伝子検査を外部へ委託していた。しかし、今回、遺伝子を短時間で増幅できるLAMP法が保険収載され、結核菌群検出が一般的な医療機関でも実施できる状況になった。このような背景のなか、当院においても、LAMP法と操作が簡便で迅速に核酸抽出が可能なPURE法とを組み合わせた遺伝子検査法を導入して、その有用性の検討を行った。

今回の検討において、235検体中、LAMP法陽性であった9件は、培養検査においてもすべて結核菌群が検出され、LAMP法と培養法の一致率は100%であった。さらに、塗抹陽性かつ培養陽性検体における感度、および特異度は共に100%であり、非常に良い成績を示した。また、直接塗抹検査が陰性かつLAMP法陰性の210件のうち3件は抗酸菌の発育を認めたが、いずれも結核菌群は陰性であった。他の施設においても、LAMP法は、塗抹検査陽性の場合、感度96.9%、特異度100%であったとの報告<sup>3)</sup>があることから、塗抹検査陽性時でのLAMP法の特異度は高いことが推察される。今回の当院での検討では、培養検査でのみ結核菌群が検出されたケースは認めなかった。しかしながら、塗抹検査陰性かつ培養陽性検体でのLAMP法の感度は55.6%との報告<sup>4)</sup>があるため、LAMP法が陰性であっても結核を否定できるのではなく、結果の解釈には注意が必要であり、培養法の重要性はいささかも変わらない。

一方、直接塗抹検査が陽性かつLAMP法で陰性の検体において、培養検査でMACが検出された検体が4件含まれていた。よって、検体数は少ないものの、LAMP法においては、MACとの交差反応性がないことが示唆され、過去の報告<sup>5)</sup>と同様の結果であった。

これまで当院では、塗抹検査が陽性との結果だけで、結核症疑いとして近隣の結核病床を有する施設へ患者を緊急搬送していたため、LAMP法の導入により、真の結核患者だけの搬送が可能になった。このことより、移動による患者の精神的・肉体的負担を軽減することが可能になっただけでなく、搬送に必要な人員および費用の削減も実現できた。さらに、LAMP法導入以前は遺伝子検査の結果報告に2日を要していたが、院内へのLAMP法導入によって、最短1時間での結果報告が可能となり、結核の疑いがある患者を事前に検査しておけば、結核

患者の入院を未然に防ぐことにも繋がった。

LAMP法は現在、喀痰のみが診療報酬対象である。しかし、今回の検討において、胃液検体を用いたLAMP法が陽性となり、診断が可能であった症例も経験した。胃液検体からの検出が可能であったことは他施設においても報告<sup>6)</sup>されており、LAMP法は喀痰以外の材料にも適応できる可能性が推察された。また、喀痰の排出が困難な患者においては胃液の採取と検査が推奨されていることから、今後、LAMP法の喀痰以外の検体における適応の拡大が望まれる。

## IV. 結語

今回、新たな結核菌群の遺伝子検査法であるLAMP法を院内検査として導入し、その結果と有用性について検討した。本法は、抗酸菌培養検査の結果と高い相関性を示し、さらに、約1時間で結核菌群検出の結果を報告できることから、日常検査において非常に有用な検査法である。さらに、当院のような結核病床を有しない施設では、LAMP法による結核の早期診断は患者の迅速な結核専門施設への搬送と感染制御においても重要な役割を果たすと考えられる。

謝辞 本論文の執筆に際しご指導いただきました。岐阜大学大学院医学系研究科病原体制御学分野の大楠清文先生に深謝いたします。

## V. 参考文献

- 1) 日本結核病学会 抗酸菌検査法検討委員会 編：結核菌検査指針2007, 財団法人結核予防会, 東京, 2007.
- 2) 御手洗聡：LAMP法を使った結核迅速診断キット, 複十字2011；339：11-13.
- 3) George G et al: Comparison of the efficacies of loop-mediated isothermal amplification, fluorescence smear microscopy and culture for the diagnosis of tuberculosis, PLoS One 2011; 6 : e 21007.
- 4) Mitarai S et al, Evaluation of a simple loop-mediated isothermal amplification test kit for the diagnosis of tuberculosis, Int J Tuberc Lung Dis 2011; 15: 1211-1217.
- 5) Iwamoto T et al, Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex, M. avium, and M. intracellulare in sputum samples, J Clin Microbiol 2003; 41: 2616-2622.
- 6) 森三郎ほか, 当院における結核菌群検出状況及びLAMP法を用いた結核菌群迅速簡易診断法について, 尾道市立市民病院医学雑誌2013；28：27-32.

# フィリピン帰国者の血液培養から

## *Burkholderia pseudomallei* を分離・同定した一例

八島 繁子<sup>1)</sup> 小森 康宇<sup>1)</sup> 美濃輪 縁<sup>1)</sup> 佐伯 浩和<sup>1)</sup> 関谷 怜子<sup>1)</sup>  
松川 洋子<sup>2)</sup>

### Key words

*Burkholderia pseudomallei* 類鼻疽 血液培養 グラム陰性桿菌

### 要 旨

我々は、血液培養から *Burkholderia pseudomallei* を分離・同定したので報告する。患者は41歳フィリピン人の男性。日本に帰国後、発熱し左股関節痛を認めたため前医を受診した。骨頭壊死と診断された後、翌朝に容態悪化したため当院へ転院搬送となった。入院時に採取された血液培養から培養開始後26時間でグラム陰性桿菌の発育を確認した。本菌はブドウ糖非発酵菌でオキシダーゼ試験陽性であり、当院で日常的に実施している同定検査を実施したところ、*B. pseudomallei* となった。確認のため、当院で実施可能な複数の同定キットを用いて同定検査を実施したところ、同様に *B. pseudomallei* の同定成績を得た。*Burkholderia* 属のうち、臨床で多く経験する *B. cepacia* とはリジンデカルボキシラーゼ、アラビノース分解能の結果から鑑別できた。

### 序文

*Burkholderia pseudomallei* は、東南アジアやオーストラリアの土壤中や水中に存在し、肺炎、軟組織や内臓の膿瘍形成、まれに関節炎の症状を示す類鼻疽の原因菌である<sup>1)</sup>。さらに敗血症に至った場合には、発症から数日で死亡することもある。また、菌を完全に排除することが難しく、難治性で再発率も高く、慢性症状を呈することもある。主な感染経路は、*B. pseudomallei* に汚染された土壌、粉塵、水等の吸引や、これらによる創面の汚染とされている<sup>2)</sup>。

今回、我々は関節炎や急性肺炎から急激な経過をたどったフィリピン人患者の血液培養より *B. pseudomallei* を分離したので報告する。

### I. 症例

- 1) 患者：41歳、フィリピン人男性  
5年間日本在住。期間は不明であるがフィリピンに滞在後、2013年2月16日に日本に帰国した。
- 2) 主訴：敗血症・肝機能障害・脱水

3) 現病歴：2月16日に発熱あり。その後、2月22日に左股関節痛を認めて動けなくなり、A病院を受診し骨頭壊死と診断され帰宅。しかし、2月23日1:00に会話不能となりA病院へ救急搬送され meropenem (MEPM) が投与された。同日7:30に眼球上方偏位・眼振・全身麻痺を認めたため当院へ転院搬送された。10:00に当院での救急外来受診時は意識レベルⅢ桁、急性呼吸不全による低酸素血症であり挿管にて呼吸管理となる。CT施行時に心肺停止をきたしたが、心臓マッサージ、エピネフリン静脈注射にて回復し、入院となった。

4) 入院時身体所見：心雑音なし、左肺野呼吸音の低下と胸部CTに左肺野肺炎像を認めた。頭部CTは明らかな出血はなく、腹部CTも明らかな肝硬変所見が認められなかったため、急性肺炎による敗血症からの多臓器不全と診断され、各種検査と治療が開始された。

5) 血液検査：入院時の血液検査結果を表1に示す。白血球数は正常であったが、CRPは26.72mg/dlと上昇していた。また、肝臓や腎臓などの状態を反映するマーカーにおいて、異常値が認められた。血小板数は  $6 \times 10^3/\mu\text{l}$  と低下しており、PT、

1) 岐阜県立多治見病院 臨床検査科  
2) 愛知医科大学 感染制御部

表1 入院時検査結果

Na	134	mEq/l	CPK	801	IU/L	PT	50.7 %
K	4.3	mEq/l	AMY	126	IU/L	INR	1.36
CL	92	mEq/l	BUN	76.0	mg/dl	APTT	45 秒
Ca	7.0	mg/dl	Cre	4.25	mg/dl	HIV	(-)
TP	3.90	g/dl	Glu	559	mg/dl	HTLV	(-)
Alb	1.80	g/dl	CRP	26.72	mg/dl	PCT	≥ 10 ng/ml
T-Bil	6.38	mg/dl	WBC	8.8	× 10 <sup>3</sup> /μl	エンドトキシン	≤ 3.5 EU/ml
ALP	853	IU/L	RBC	4.82	× 10 <sup>6</sup> /μl	β-D-グルカン	13 pg/ml
AST	440	IU/L	Hb	14.2	g/dl		
ALT	204	IU/L	Ht	42.9	%		
LDH	1028	IU/L	Plt	6	× 10 <sup>3</sup> /μl		
ChE	214	IU/L					

APTTの延長がみられた。プロカルシトニンは≥10ng/mlだったが、エンドトキシンは≤3.5EU/mlであり、β-D-グルカンは13pg/ml（カットオフ値：11pg/ml）であった。なお、血糖値は559mg/dlと高値であった。

6) 細菌検査：尿培養・喀痰培養・血液培養2セットが採取された。尿はグラム染色にて細胞成分と細菌はともに確認されず、細菌の発育は認められなかった。喀痰はMiller & Jonesの分類でM2、グラム染色所見は白血球：-、グラム陽性球菌：3+ 酵母：1+ 扁平上皮：1+であり、培養結果は口腔内常在菌(1+)、*Streptococcus agalactiae*(1+)、*Candida albicans*(1+)であった。そして、血液培養は培養開始後26時間で嫌気ボトルが陽性となり、グラム染色にて比較的濃く染まる長めのグラム陰性桿菌が確認された(図1)。その後、同一セットの好気ボトルと他セットの好気ボトルも陽性になった。ボトル培養液を羊血液寒天培地、チョコレート寒天培地、BTB乳糖寒天培地、マンニト食塩卵黄寒天培地、クロモアガーカンジダ培地、GAM半流動寒天培地に接種し、チョコレート寒天培地は

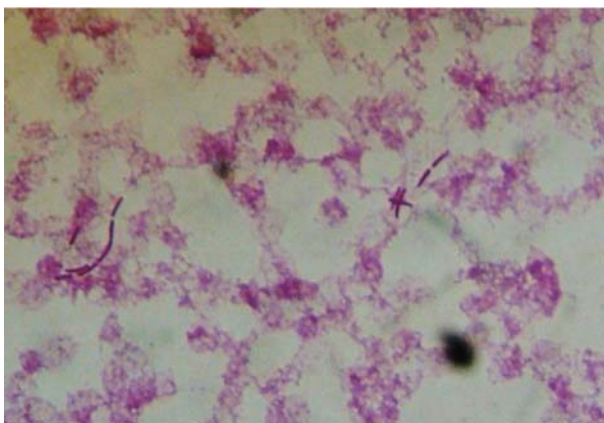


図1 血液培養ボトル(嫌気ボトル)のグラム染色像(×1,000)



a) 羊血液寒天培地



b) BTB乳糖寒天培地

図2 35°C好気培養 一夜培養後のコロニー

炭酸ガス培養を，その他の培地は好気培養（35℃）を実施した．一夜培養後の血液寒天培地のコロニー（図2）はオキシダーゼ試験陽性であり，グラム染色像は両極染色を示すグラム陰性桿菌であった（図3）．このコロニーを用いて VITEK 2（シスメックス・バイオメリュー）にて同定・薬剤感受性検査を実施したところ，同日の夕方に *B. pseudomallei*（確率95%）となった．*B. pseudomallei* は感染症法の4類感染症であり直ちに届出が必要であるが，確認のためにライサス（日水製薬）と ID テスト NF-18（日水製薬）にて同定検査を実施し，同時に TSI 培地と LIM 培地に接種した．TSI 培地と LIM 培地の一晩培養結果からブドウ糖非発酵菌と確認され（図4），同定試験結果は VITEK 2 と同様に，ライサス（絶対確率0.00100859，相対確率99.9%），ID テスト NF-18とも *B. pseudomallei* の同定結果を得た（表2）．*Burkholderia* 属の生化学的性状を表3に示す．*Burkholderia* 属のうち臨床分離菌として頻度の高い *B. cepacia* は，アルギニンジヒドロナーゼ陰性，リジンデカルボキシラーゼ陽性，アラビノース分解能陽性であり，*B. pseudomallei* と鑑



図4 TSI 培地と LIM 培地

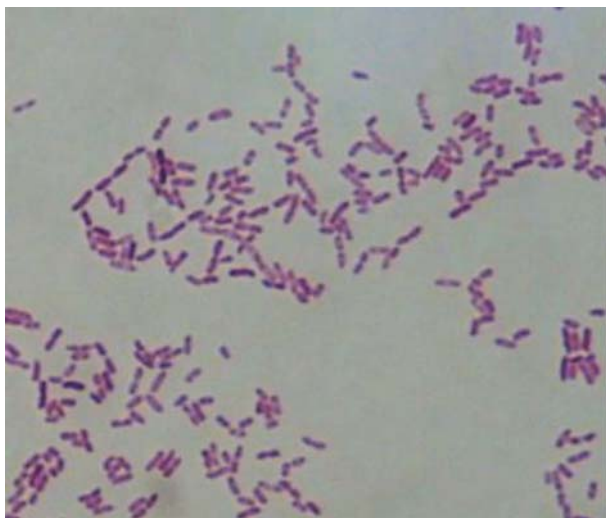


図3 35℃好気培養 一夜培養後のコロニーのグラム染色像（×1,000）

別できるとされている<sup>2)</sup>．本菌は，リジンデカルボキシラーゼ陰性，アラビノース分解能陰性であり，*B. cepacia* と鑑別できた．また，培地を引き続き好気培養を続けると，BTB 乳糖寒天培地のコロニーは黄変し（図5），羊血液寒天培地のコロニーは *B. pseudomallei* に特有の車輪状のコロニーとなった（図6）．なお，VITEK 2 で実施した薬剤感受性検査では，第1・2世代セフェム，アミノグリコシド，ニューキノロンなど種々の抗菌薬に耐性を示した（表4）．

7) 臨床経過：来院時の急性呼吸不全・心肺停止から回復後，doripenem (DRPM) と levofloxacin (LVFX) が投与され，エンドトキシン吸着療法が行われた．2月23日21：30に vancomycin (VCM) が追加投与されたが多臓器不全のため，2月24日14：30心停止となり死亡が確認された．

表2 各種同定検査結果

	カード・パネル種	同定菌名	バイオナンバー
VITEK2（シスメックス・バイオメリュー）	GN	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	00236535105110010
ライサス（日水製薬）	NGCN1	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	
IDテスト（日水製薬）	NF-18	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	773006

表3 *Burkholderia* 属の生化学的性状

テスト	<i>B. pseudomallei</i>	<i>B. mallei</i>	<i>B. thailandensis</i>
オキシダーゼ	+	v	+
発育：MacConkey	+	v	+
42°C	+	-	+
硝酸塩還元	+	+	+
硝酸塩からのガス産生	+	+	-
アルギニン ジヒドロラーゼ	+	+	+
リジンデカルボキシラーゼ	-	-	-
オルニチンデカルボキシラーゼ	-	-	-
加水分解：ウレア	v	v	v
クエン酸塩	v	-	v
ゼラチン	v	-	v
エスクリン	v	-	v
酸産生： グルコース	+	+	+
キシロース	+	v	+
ラクトース	+	v	+
シュークロース	v	-	v
マルトース	+	-	+
マンニトール	+	-	+
アラビノース	-	ND	+
運動性	+	-	+

+ : >90%陽性、 - : 90%陰性、 v : 不定、 ND:データ無



図5 BTB 乳糖寒天培地  
35°C好気培養48時間後

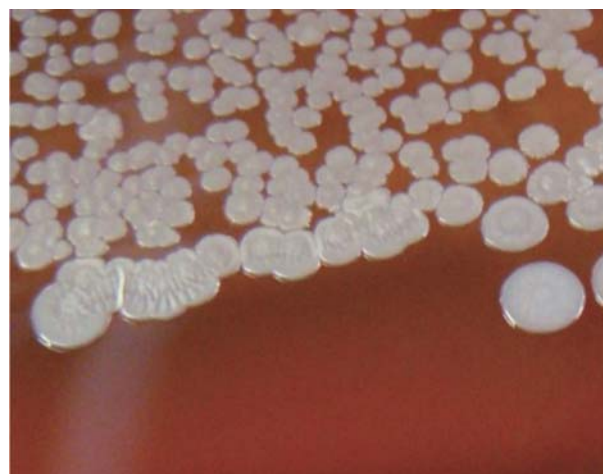


図6 羊血液寒天培地  
35°C好気培養72時間後



表4 薬剤感受性結果

ABPC	16	I	IPM	≤1	S
SBT/ABPC	4	S	MEPM	4	S
PIPC	≤4	S	AZT	16	I
CEZ	≥64	R	AMK	≥64	R
CTM	≥64	R	GM	≥16	R
CTX	4	S	LVFX	≥8	R
CAZ	≤1	S	CPFX	2	I
CMZ	≥64	R	MINO	8	I
FMOX	≥64	R	CP	16	I

## II. 考察

今回分離した菌は、血液培養ボトルとサブカルチャーでの発育は共に良好であり、培養検査にて分離・同定できたが、*B. pseudomallei*は日本国内では環境中に存在していないとされており<sup>3)</sup>、複数の同定キットで同定試験を実施して確認をしたため最終報告までに時間を要した。当院において過去に血液培養から分離されたグラム陰性ブドウ糖非発酵菌でオキシダーゼ試験陽性の菌は、*Pseudomonas aeruginosa*が最も多く、次いで*Burkholderia cepacia*となっている。サブカルチャー後の菌が、グラム陰性桿菌でオキシダーゼ試験陽性と判明した時点で*P. aeruginosa*を疑ったが、コロニー形状が異なる印象であった。さらに患者はフィリピン人であり、輸入感染症の可能性も考えられた。以上のことから、同定検査を実施する際に他キットによる検査も同時に実施していれば報告までの時間が短縮できたと思われる。

同定検査において本菌は、*B. cepacia*との鑑別で用いられるアルギニンジヒドロナーゼは陰性を示した。Dance<sup>4)</sup>は長期保存後の最初のアルギニンジヒドロナーゼ検査で偽陰性を示すことがあるとしているが、本菌は新鮮株であった。このように、アルギニンジヒドロナーゼ検査で不一致を認めたものの、高い同定確率とリジンデカルボキシラーゼ、アラビノース分解能の結果から*B. pseudomallei*と同定した。

一方、グラム染色像は両極染色性を示し、培養を延長すると車輪状のコロニーを形成する*B. pseudomallei*の特徴を持っていた<sup>5)</sup>。これは、日ごろ経験することの少ない菌の同定結果の精度を上げる重要な情報となった。また、血液培養陽性時とサブカルチャー後のグラム染色像が異なっていたため、培養条件ごとにグラム染色像を確認する重要性を感じた。

患者の既往歴は不明であったが、入院時の血糖値が559mg/dlであり、基礎疾患に糖尿病の存在が強く疑われた。類鼻疽を発症する患者の基礎疾患として糖尿病、過度の飲酒歴、慢性腎疾患などがあるとされており<sup>1)</sup>、さらに左股関節痛と肺炎から多臓器不全に陥った経緯は、*B. pseudomallei*が起因とな

る類鼻疽の症状と一致していた。治療は、急性期の初期療法で推奨されている<sup>6)</sup>MEPMの投与が行われたが、患者は急激な経過をたどり死亡した。この原因は、発熱から抗菌薬治療開始までの時間経過によるものか、菌の病原性が要因かは不明である。

我が国において類鼻疽は2007年以前には8例の報告があり<sup>7)</sup>、2007年以降は2010年に5例、2011年に3例、2013年に4例報告されており、届出都道府県は北海道から徳島県までに至っている<sup>8)</sup>。近年、在日外国人の増加や海外旅行が頻繁に行われているため、日常的な検査を実施する際に、患者背景を考慮し輸入感染症も念頭に置く必要がある。

類鼻疽は感染症法の4類感染症に指定されており、類鼻疽が疑われ、かつ、喀痰・血液などから分離・同定かPCR法による病原体の検出により類鼻疽と診断された場合は、ただちに届出が必要である。なお、臨床検体および臨床分離株の取り扱いには防護手袋、マスクなどの保護器具を使用して取り扱い、作業はBSL2実験室内の安全キャビネットで行う。また、*B. pseudomallei*は特定病原体第三種に指定されており、所持する場合は*B. pseudomallei*と同定されたのち7日以内に厚生労働大臣への届出が必要である。臨床検査室などでは検査終了時まで一時的に菌株を保管することができるが、嚴重に密閉した上で施錠できる場所に保管することとなっている。その際には-80℃に保管することが望ましく、滅菌処理を行う場合には所持の開始の日から10日以内に行うこととなっている。さらに、病原体の運搬をする際には、都道府県公安委員会に届け出なければならない<sup>9)</sup>。このように、微生物検査室から臨床へは、病原体の検出と菌名の報告のみではなく、法律に関わる情報も提供することが望まれる。

## III. 結語

今回、我々はフィリピン人患者の血液培養から*B. pseudomallei*を分離した。同定検査を実施するにあたり、グラム染色像・コロニー観察の重要性を再確認した。また、*B. pseudomallei*は特定病原体第三種であるため、菌の取り扱いについて再考する機会となった。

## IV. 文献

---

- 1) Cheng AC: Melioidosis: Epidemiology, Pathophysiology, and Management, Clin. Microb. Rev. 2005; 18 (2): 383-416.
- 2) 畠山 薫：国立感染症研究所 病原体検出マニュアル 2011
- 3) 真崎宏則：メリオイドーシス, 医学のあゆみ 2004; 208 (1): 64-68
- 4) Dance DA: Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practice: use of simple screening tests and API20NE, J. Clin. Pathol. 1989; 42: 645-648.
- 5) Chantratita N: Biological Relevance of Colony Morphology and Phenotypic Switching by *Burkholderia pseudomallei*, J. Clin. Microb. 2007; 189 (3): 807-817.
- 6) 渋谷英樹：メリオイドーシス, 呼吸 2012; 31 (3): 254-258.
- 7) 倉田季代子：ベトナムから帰国後空洞病変で発症し、再燃時多発肺結節を認めたメリオイドーシスの1例, 日呼吸会誌 2011; 9 (6): 443-448.
- 8) 国立感染症研究所 感染症発生動向調査 週報 (IDWR), <http://www.nih.go.jp/niid/ja/idwr.html>
- 9) 感染症法研修会：第二編逐条解説, 詳解 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律三訂版, 276-296, 中央法規出版株式会社, 東京, 2008

# 当院で分離された *Haemophilus influenzae* b 型株の 検出状況と薬剤感受性に関する検討

八島 繁子<sup>1)</sup> 美濃輪 縁<sup>1)</sup> 佐伯 浩和<sup>1)</sup> 関谷 怜子<sup>1)</sup> 小森 康宇<sup>1)</sup>

## Key words

*Haemophilus influenzae* Hib ワクチン Hib 薬剤感受性

## 要 旨

2004年4月から2013年12月までの9年9カ月間に当院で分離された *Haemophilus influenzae* は2,307株であり、そのうち *H. influenzae* b 型株 (Hib) は146株であった。年次的な Hib の分離頻度は2005年に12.2%と最大であったが、徐々に減少して2008年に3.0%となり、その後は2012年1.7%、2013年1.1%と激減した。また、Hib が分離された検査材料別の割合は、髄液90.9%、血液70.0%、咽頭・鼻腔6.1%、喀痰4.0%、耳漏3.3%、その他14.8%であった。侵襲性感染症が示唆された血液と髄液から分離された Hib 株の ampicillin 感受率は38.1%であった。その他の抗菌薬については経年的な耐性化の傾向は認めず、良好な感受性を示した。

## 序文

*Haemophilus influenzae* は肺炎、気管支炎、中耳炎などの主要な起因菌である。さらに、b型莢膜株 (Hib) は、乳幼児において敗血症や髄膜炎などの侵襲性感染症を惹起するため、臨床的意義の高い菌である。我が国では諸外国から遅れて2008年12月より Hib ワクチンの任意接種が可能となった<sup>1)</sup>。さらに、2013年4月の予防接種法の改正に伴い Hib ワクチンは定期接種に組み込まれた。したがって、Hib 株の分離頻度や薬剤感受性の動向を検討することは重要である。当院では臨床材料から分離・同定された *Haemophilus influenzae* 株のすべてに対して Hib の血清型別の検査も行ってきた。今回、これらの検査結果をもとに、Hib の検出状況と薬剤感受性の年次的推移に関して検討を行ったので報告する。

## I. 対象と方法

### 1) 菌株

2004年4月から2013年12月までの9年9カ月間に当院細菌検査室に提出された全検査材料から分離された *H. influenzae* 2,307株を対象とした。

### 2) 培養検査

血液培養はバクテアラート 3D (シスメックス・

ジオメリュー)を使用した。各材料は血液寒天培地、チョコレート寒天培地に接種し、37℃ 5%炭酸ガス条件下で18~24時間培養した。髄液は遠心分離した沈渣を用いた血液寒天培地、チョコレート寒天培地の培養に加え、血液培養ボトルにて増菌培養を行った。チョコレート寒天培地上に発育した灰色~灰白色を示すコロニーを同培地と、ヘモフィリス ID 4 分画培地 (BD) に純培養し、XV 因子要求性およびウマ血液寒天培地の溶血性により *H. influenzae* と同定した。判定困難な場合は ID テスト HN-20 ラピッド (日水) にて同定した。

### 3) 血清型別

莢膜血清型別は、インフルエンザ菌莢膜型別用免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いてb型か否かの判別を実施した。

### 4) 薬剤感受性試験と経年的な評価

薬剤感受性試験は RAISUS (日水) を使用して、微量液体希釈法により各種抗菌薬の最小発育阻止濃度 minimum inhibitory concentration (MIC) を測定した。米国臨床検査標準委員会 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) にて *H. influenzae* の髄液分離株について日常的に報告することが適当<sup>2)</sup>とされている以下の薬剤について検討を実施した。ampicillin (ABPC)、cefotaxime (CTX)、ceftri-

1) 岐阜県立多治見病院 臨床検査科

axone(CTRX), chloramphenicol(CP), meropenem (MEPM), および levofloxacin (LVFX) の6薬剤である。

β-lactamase 産生の試験はニトロセフィン法であるセフィナーゼディスク (BBL) を用いて行った。β-lactamase が陽性の場合を β-lactamase-producing ampicillin resistance (BLPAR) とした。また, β-lactamase 産生試験が陰性の場合には CLSI の判定基準に従い, ABPC の MIC 値が 1 μg/ml 以下を β-lactamase-nonproducing ampicillin-susceptible (BLNAS), 2 μg/ml を β-lactamase-negative ampicillin intermediate (Low-BLNAR), 4 μg/ml 以上を β-lactamase-nonproducing ampicillin resistance (BLNAR) として分類した。

なお, 薬剤感受性の評価は, 侵襲性感染症を示唆する血液と髄液から分離された株を対象とし, 重複を避けるため同一患者は各年の初回に分離された株 (21株) を用いた。

## II. 結果

### 1) *H. influenzae* の分離状況

各年の分離数は200株以上を維持しており, 大きな変化は認められなかった。分離株数が多い診療科は小児科 (1,111株) であり, 次いで呼吸器内科 (511株), 耳鼻咽喉科 (402株), 麻酔科 (64株) の順であった。

材料別の分離株数は, 咽頭・鼻腔1,371株, 喀痰756株, 耳漏122株, その他 (眼脂・関節液・開放性膿等) 27株, 血液20株, 髄液11株であった。

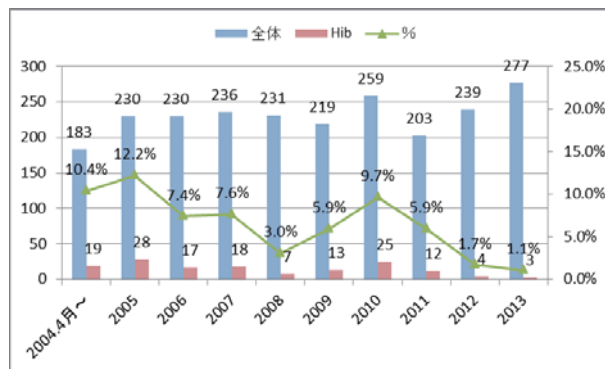
経年的な分離頻度の特徴として, 喀痰からの *H. influenzae* の分離数が2013年に例年よりも大幅に増加していたことであった。

### 2) Hib 株の分離状況

*H. influenzae* 2,307株中 Hib は146株であった。各年の Hib の割合は2005年に12.2%と最大になり, 徐々に減少して2012年1.7%, 2013年1.1%と激減した (図1)。

材料別の Hib の占める割合は咽頭・鼻腔6.1%, 喀痰4.0%, 耳漏3.3%, その他14.8%であり, 侵襲性感染症を示唆する血液と髄液は, それぞれ

図1 *H. influenzae* と Hib の分離株数の推移



70.0%, 90.9%と高い割合を占めた。また, 経時的には咽頭・鼻腔と喀痰での Hib の割合が減少傾向であった。なお, Hib 株は髄液から2011年までは毎年分離されていたが, 2012年と2013年には全く分離されなかった。

### 3) 患者の年齢別の分離頻度

*H. influenzae* が分離された患者の平均年齢は25.2歳であった。一方, Hib が分離された患者の平均年齢は14.7歳であった。

Hib 株が分離された患者の平均年齢を材料別にみると, 喀痰が51.7歳と最も高く, 喀痰以外においては咽頭・鼻腔5.0歳, 血液1.4歳, 髄液1.5歳であった。なお, 2013年に分離された唯一の Hib 株は2歳児の喀痰からであった。

血液か髄液のどちらかから *H. influenzae* が分離された侵襲性感染症患者 (21名) の年齢分布 (表1) は小児と高齢者の二相性のピークを示した。Hib はすべて4歳以下の患児から分離されており, 5歳以上の患者からは分離されなかった。

### 4) 薬剤感受性の経年的な評価

血液または髄液から分離された *H. influenzae* 21株の内訳は, Hib が14株, non-Hib が7株であった。BLNASが21株中8株で38.1%であり, BLPARは10年間で2株認められ, いずれも Hib であった。その他の抗菌薬において, 経年的変化は認められず低い MIC 値であった (表2)。

表1 血液または髄液から *H. influenzae* が分離された患者の年齢分布 ( ) 内は Hib

	0～3ヶ月	4～11ヶ月	1～4歳	5～9歳	10歳代	20歳代	30歳代	40歳代	50歳代	60歳代	70歳代	90歳代	総計
2004		1 (1)				1							2
2005		3 (3)		1							1		5
2006			1 (1)										1
2007			3 (3)										3
2008		1 (1)											1
2010			3 (3)									1	4
2011		1 (1)	1 (1)										2
2012		1											1
2013				1						1			2
総計		7 (6)	8 (8)	2		1				1	1	1	21

表2 血液または髄液由来 *H. influenzae* の各抗菌薬の MIC 分布推移

ABPC	Hib		non-Hib		CTX	Hib		non-Hib	
	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90		MIC50	MIC90	MIC50	MIC90
2004	2	2	2	2	2004	0.5	0.5	<=0.25	<=0.25
2005	2	16	0.25	4	2005	<=0.25	<=0.25	<=0.25	1
2006	1	1	—	—	2006	<=0.25	<=0.25	—	—
2007	2	2	—	—	2007	0.5	0.5	—	—
2008	2	2	—	—	2008	<=0.25	<=0.25	—	—
2009	—	—	—	—	2009	—	—	—	—
2010	2	2	2	2	2010	0.5	0.5	0.5	0.5
2011	1	>16	—	—	2011	<=0.25	0.5	—	—
2012	—	—	4	4	2012	—	—	1	1
2013	—	—	0.5	1	2013	—	—	<=0.25	0.5
総計	2	2	2	4	総計	<=0.25	0.5	0.5	1

CTR	Hib		non-Hib		CP	Hib		non-Hib	
	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90		MIC50	MIC90	MIC50	MIC90
2004	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25	2004	0.5	0.5	0.5	0.5
2005	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25	2005	1	1	0.5	0.5
2006	<=0.25	<=0.25	—	—	2006	>8	>8	—	—
2007	<=0.25	<=0.25	—	—	2007	0.5	1	—	—
2008	<=0.25	<=0.25	—	—	2008	1	1	—	—
2009	—	—	—	—	2009	—	—	—	—
2010	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25	2010	1	1	0.5	0.5
2011	<=0.25	<=0.25	—	—	2011	0.5	0.5	—	—
2012	—	—	<=0.25	<=0.25	2012	—	—	0.5	0.5
2013	—	—	<=0.25	<=0.25	2013	—	—	<=0.25	0.5
総計	<=0.25	<=0.25	<=0.25	<=0.25	総計	0.5	1	0.5	0.5

MEPM	Hib		non-Hib		LVFX	Hib		non-Hib	
	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90		MIC50	MIC90	MIC50	MIC90
2004	<=0.125	<=0.125	0.25	0.25	2004	<=0.5	<=0.5	<=0.5	<=0.5
2005	<=0.125	<=0.125	<=0.125	1	2005	<=0.5	<=0.5	<=0.5	<=0.5
2006	0.25	0.25	—	—	2006	<=0.5	<=0.5	—	—
2007	<=0.125	<=0.125	—	—	2007	<=0.5	<=0.5	—	—
2008	<=0.125	<=0.12	—	—	2008	<=0.5	<=0.5	—	—
2009	—	—	—	—	2009	—	—	—	—
2010	<=0.125	0.25	<=0.125	<=0.125	2010	<=0.5	<=0.5	<=0.5	<=0.5
2011	<=0.125	0.25	—	—	2011	<=0.5	<=0.5	—	—
2012	—	—	0.5	0.5	2012	—	—	<=0.5	<=0.5
2013	—	—	<=0.125	<=0.125	2013	—	—	<=0.5	<=0.5
総計	<=0.125	0.25	<=0.125	1	総計	<=0.5	<=0.5	<=0.5	<=0.5

### Ⅲ. 考察

我が国では2008年12月より Hib ワクチンが任意接種として導入され、2011年1月からは全国的に公費助成が開始されていた<sup>3)</sup>。さらに、2013年4月には定期接種に組み込まれたことにより、Hib による

髄膜炎や敗血症などの侵襲性感染症の減少が明らかになってきた。実際、当院では2004年から *H. influenzae* が毎年200株以上分離され続けていたが、Hib 株は2005年の28株から減少し、2013年には3株 (1.1%) となった。特に、髄液と血液からは2012年以降は1株も分離されておらず、Hib ワクチンの

効果が既に顕著となっている。

診療科別にみた *H. influenzae* の分離頻度は、小児科が一番高く、大半が咽頭・鼻腔由来であった。これは、当院では小児の喀痰採取が困難な場合には鼻咽喉からの検体採取を推奨しているためと思われる<sup>4)</sup>。喀痰由来の *H. influenzae* 分離株数は2013年に大幅に増加していたが<sup>5)</sup>、Hib は1株に留まっていた。しかし、この1株は2歳児から分離されており、侵襲性感染症を発症する可能性も否定できないため注意が必要と思われる<sup>5)</sup>。そのため、当院ではHibが検出された旨を結果報告時にコメントし、注意を促している。今後は、Hib株が分離された際にはHibワクチンの接種が行われていたかの確認も重要と考える。

血液または髄液から分離された *H. influenzae* の ABPC 感性率は BLNAS が38.1%であったが、福島県など9県を対象に MIC 値によって ABPC 感性率の検討をした報告 (49.5~56.9%)<sup>6)</sup> よりも低値であった。しかし、その他の各抗菌薬の MIC 値の分布の解析においては、細菌性髄膜炎の診療ガイドライン<sup>7)</sup>が推奨している CTX, CTRX, MEPM で良好な感受性を示していた。当院では LVFX の耐性菌は認められなかったが、我が国でもニューキノロン系薬剤の耐性菌が分離されている<sup>8)</sup>。頻度は1%程度と推定されているが<sup>9)</sup>、今後の動向に注視したい。

当院では *H. influenzae* の莢膜型は b 型の有無のみを確認しているため、血液または髄液から分離された non-Hib 7 株は型別不能株 (non-typable *H. influenzae*; NTHi) か、b 型以外の莢膜型 *H. influenzae* かの鑑別はできていない。海外では Hib ワクチンの導入後、b 型株以外の莢膜株や非莢膜株による侵襲性感染症の増加も報告されており、今後、我が国においてもこれらの菌株の分離頻度が増加する可能性がある。そのため、髄液を用いた Hib 検出の迅速診断試薬では検出できない *H. influenzae* 性髄膜炎も考慮して、グラム染色所見からの病原体の推定や培養後の検査にはよりいっそうの注意が必要である。さらに、莢膜株が分離された場合には、b 型株以外の a, c, d, e, f 型株か否かの検査も含めた検査項目の見直しや、これら莢膜菌株の出現とその頻度を注視していくことが重要と考える。

#### IV. 結語

我が国においても Hib ワクチンが導入され、Hib 株の分離頻度は減少した。今後は NTHi 株による感染症や b 型株以外の莢膜株による感染症が危惧されるため、血清型別検査の実施や引き続き、薬剤感受性の動向を監視していくことが肝要である。

#### V. 文献

- 1) 泉信夫：インフルエンザ菌 b 型ワクチン先行国における 5 歳未満児の状況，小児科臨床 2012；65（2）：280-285.
- 2) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. Vol.31. M100-S22. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2012
- 3) 西順一郎：Hib ワクチン—導入後の状況と安全性，小児科診療 2012；75（4）：660-664.
- 4) 西順一郎：小児感染症における検査・検体採取の留意点，薬局 2012；63（3）：369-374.
- 5) 大塚岳人：インフルエンザ菌 b 型 (Hib) 保菌が意味すること—時間軸・空間軸・塩基配列型でみた Hib 伝播—，感染症学雑誌 2013；86（2）：103-108.
- 6) 国立感染症研究所，厚生労働省健康局結核感染症課：〈特集〉侵襲性インフルエンザ菌感染症，病原微生物検出情報 (IASR) 2013；34（7）：185-218.
- 7) 細菌性髄膜炎の診療ガイドライン作成委員会：細菌性髄膜炎の診療ガイドライン，神経治療 2007；24（1）：1-64.
- 8) 野老洋夫ほか：成人の入院肺炎例より分離されたニューキノロン系薬剤耐性を含む多剤耐性インフルエンザ菌の遺伝子解析，日本臨床微生物学会 2011；21（2）：121-128.
- 9) 生方公子：インフルエンザ菌，日本臨牀 2012；70（2）：247-250.

# セファロスポリン耐性腸内細菌の検出における AmpC/ESBL 鑑別ディスクの有用性に関する検討

後藤 雪乃<sup>1)</sup> 安藤 航平<sup>1)</sup> 古川貴誉子<sup>1)</sup> 奥田 清保<sup>1)</sup> 平沢 弘行<sup>1)</sup>  
天野 和雄<sup>1)</sup>

## Key words

ESBL 産生菌, AmpC 型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌, AmpC/ESBL 鑑別ディスク

## 要 旨

2011年1月から2013年7月の2年7ヶ月間に、当院の臨床材料から分離されたセファロスポリン耐性腸内細菌を用いて、ESBL 産生菌と AmpC 型  $\beta$ -ラクタマーゼ (AmpC) 産生菌を同時検出できる AmpC/ESBL 鑑別ディスクの有用性について検討を行った。ESBL 産生菌54株における従来法と本鑑別ディスク法との一致率は100% (54株) であり、ESBL および AmpC 同時産生菌と判定した株はそのうち4株であった。さらに、この4株に対してはボロン酸を用いた AmpC 阻害試験を実施したところ、2株が阻害試験で陽性を示した。また、従来法で ESBL 非産生菌と判定した株35株において AmpC 産生菌と判定された株は22株 (62.9%) であり、ボロン酸を用いた AmpC 阻害試験では22株すべてにおいて阻害が確認された。AmpC/ESBL 鑑別ディスク法は、従来法との一致率も高く、操作も簡便であることから、セファロスポリン耐性腸内細菌の検出において、日常検査に導入すべき有用な方法であると考えられた。

## I. はじめに

近年、耐性菌をとりまく状況は大きく変化しており、日常検査の現場ではその対応に苦慮しているのが現状である。とりわけ、 $\beta$ -ラクタマーゼは、Ambler の分類でクラス A に分類される基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase : ESBL) や、クラス C に分類される AmpC 型  $\beta$ -ラクタマーゼ (AmpC)、クラス B に分類されるメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (MBL) などタイプが様々であり<sup>1)</sup>、その検出方法も多岐にわたる。各薬剤耐性菌は薬剤感受性パターンである程度の推測が可能である<sup>2)</sup>が、確定にはディスク拡散法による確認試験や遺伝子検査が必須である。現在、我々の施設では遺伝子検査の実施が困難な状況であるため、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に準拠したディスク拡散法による ESBL の確認試験のみで実施しているが、今回、ESBL 産生菌と AmpC 産生菌を同時に検出できる AmpC/ESBL 鑑別ディスク (関東化学) が上市されたのを機に、自施設にて分離された臨床分離株を用いて、従来法との比較検討を行う機会を得たので若干の考察をふまえ報告

する。

## II. 対象および方法

### 1. 対象

2011年1月から2013年7月の2年7ヶ月間に各種臨床材料から分離された菌株のうち、ESBL 検出におけるスクリーニング基準を満たし<sup>3)</sup>かつ第3世代セファロスポリン系薬剤のいずれかに耐性を示した *Escherichia coli* (*E. coli*)、*Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*)、*Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*) の中から89株を抽出し、下記の2つのカテゴリーに分けて検討を実施した。

#### 1) ESBL 産生菌

CLSI 準拠<sup>3)</sup>の ESBLs 確認用 KB ディスク (栄研化学) による ESBL 確認試験 (以下、従来法) で ESBL 産生菌と判定された54株で、その内訳は *E. coli* 43 株、*K. pneumoniae* 11 株である。

#### 2) セファロスポリン耐性 ESBL 非産生菌

従来法を用いて確認試験を行い、ESBL 非産生と判定された35株である。*E. coli* が30株、*K. pneumoniae* が2株、そして *K. oxytoca* が3株である。

1) 岐阜県総合医療センター 臨床検査科

## 2. 方法

### 1) ESBL の確認試験

ESBL の確認は、CLSI に準拠した ESBLs 確認用 KB ディスク (栄研化学) を使用した。Mueller-Hinton 寒天培地に被検菌を塗布し、35℃ で16~18時間培養後、ディスク阻止円径の拡大の差にて判定した (図1)。薬剤ディスクは ceftazidime (CAZ), cefotaxime (CTX), cefpodoxime (CPDX) の単剤ディスクおよび、これらの clavulanic acid (CVA) 配合ディスクを用いて実施した。

### 2) AmpC/ESBL 鑑別試験

AmpC/ESBL 鑑別ディスクの添付文書に基づい

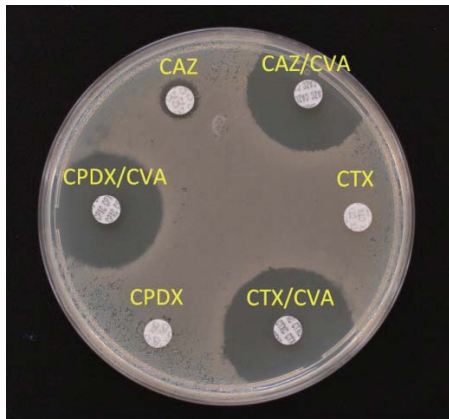


図1 CLSI 準拠ディスク拡散法 (KB ディスク: 栄研化学) による ESBL 確認試験

いずれかの薬剤ディスクにおいて、合剤の阻止円径が単剤の阻止円径より 5 mm 以上拡大した場合に ESBL 産生と判定される。

CAZ: ceftazidime, CTX: cefotaxime, CPDX: cefpodoxime

CVA: clavulanic acid

て実施・判定を行った。すなわち、McFarland 0.5 に調整した被検菌液を Mueller-Hinton 寒天培地に塗布し、35℃ で16~18時間培養後、阻止円径の測定を行い、その判定基準<sup>4)</sup>に従った (図2)。

### 3) ボロン酸を用いた AmpC 阻害試験<sup>5)</sup>

m-aminophenylboronic acid (wako 純薬) を用い、30mg/ml のボロン酸溶液を作製した後、ディスクに添加した。実際には、CLSI ディスク拡散法の要領<sup>3)</sup>に従い Mueller-Hinton 寒天培地に被検菌を塗布し、CAZ ディスク 2 枚および CPDX ディスク 2 枚のディスク間が 4 cm 以上となるように配置し、それぞれ一方の薬剤ディスクにボロン酸溶液 10μl を添加した。35℃ で16~18時間培養後、ボロン酸溶液添加ディスクにおける阻止円径の拡大が 5 mm 以上の場合に、ボロン酸による AmpC 阻害ありと判定した (図3)。

### 4) 同定・薬剤感受性試験

菌種の同定は、VITEK 2 (シスメックス・ビオメリュー) および GN 同定カードを用いて実施した。薬剤感受性試験は RAISUS (日水製薬) を使用し、当院の薬剤カスタムプレートにて測定した。

## III. 結果

### 1) 従来法で ESBL 産生菌と判定した株における ESBL および AmpC の検出状況

従来法で ESBL 産生菌と判定した 54 株のうち、AmpC/ESBL 鑑別ディスクで ESBL 産生菌と判定された株は 54 株 (100%) であった (表1)。また、ESBL 産生菌と判定した 54 株のうち ESBL と AmpC を同時に産生していると判定されたのは 4 株 (7.4%) ですべて *E. coli* であった。さらに、同時産生菌と判定した 4 株に対してボロン酸を用いた AmpC 阻害試験を実施したところ、2 株のみ阻害

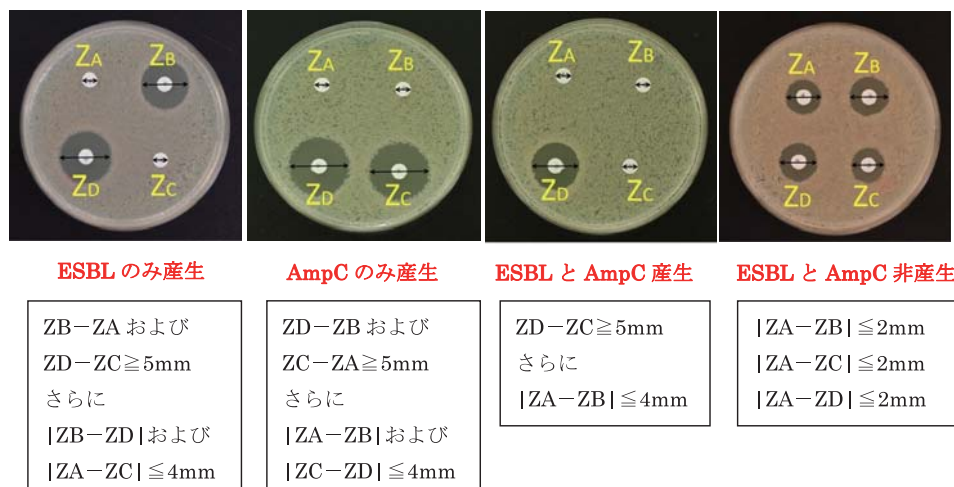


図2 AmpC/ESBL 鑑別ディスク (関東化学) における鑑別基準

ZA : CPDX 10μg ZB : CPDX 10μg + ESBL 阻害剤 ZC : CPDX 10μg + AmpC 阻害剤  
 ZD : CPDX 10μg + ESBL 阻害剤 + AmpC 阻害剤



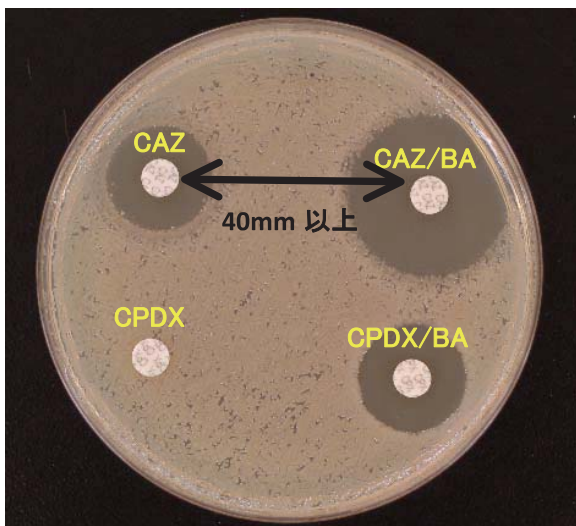


図3 ボロン酸を用いた AmpC 阻害試験

いずれかの薬剤ディスクにおいてボロン酸添加ディスクの阻止円径が、単剤の阻止円径より 5 mm 以上拡大した場合に AmpC 産生と判定される。

BA：ボロン酸

が確認された。

## 2) 従来法で ESBL 非産生菌と判定した株における ESBL および AmpC の検出状況

従来法において ESBL 非産生菌と判定した35株において、AmpC 産生菌と判定されたのは22株ですべて *E. coli* であり、ESBL 産生菌と判定された株は存在しなかった(表1)。これら22株に対してボロン酸を用いた AmpC 阻害試験を実施したところ、全ての株においてボロン酸による酵素阻害が確認された。

## IV. 考察

今回、われわれはセファロスポリン耐性腸内細菌の検出のために AmpC/ESBL 鑑別ディスクを用いた方法と従来法との比較・検討を行った。その結

果、従来法で ESBL 産生菌と報告された54株すべてにおいて AmpC/ESBL 鑑別ディスク法でも ESBL 産生菌と判定され、一致率は100%であった。また、54株のうち ESBL と AmpC の同時産生菌と判定されたのは4株であったが、ボロン酸による AmpC 阻害試験で阻害が確認されたのは2株であった。残る2株はボロン酸阻害なしと判定されたが、2株ともに判定境界域の値であった。すなわち、本ディスク法での耐性は、それぞれのディスク径を測定し、各ディスク間の阻止円径の差で判定するが、目視の測定誤差による誤判定が原因であったと考えられた。また、今回の検討後に、本ディスクでは ESBL、AmpC とともに非産生と判定されたが、薬剤感受性試験結果から ESBL 産生が強く疑われたため、従来法を用いて追加試験を行ったところ、ESBL 産生菌と判定された菌株が数件確認された(未公表データ)。これらはいずれも判定境界域の値であったため、本ディスクの判定基準について修正する必要があると思われた。さらに、本ディスク法で得られた結果だけではなく、薬剤感受性試験の結果を十分に考慮した上で適宜、再検査を行い耐性菌か否かを判断して報告することが肝要である。

Ambler は  $\beta$ -ラクタマーゼをアミノ酸の一次配列に基づきクラス A~D の4つに分類し<sup>1)</sup>、Bush-Jacoby は  $\beta$ -ラクタマーゼの基質特異性や阻害剤によって機能的な分類を提案している<sup>6)</sup>。これによると、ESBL は Ambler の分類ではクラス A、Bush-Jacoby の分類では group 2 be で、AmpC はそれぞれクラス C、group 1 となる。また、Giske らは感染制御の視点からの分類を提唱している<sup>7)</sup>。すなわち、ESBL は第4世代を含むすべてのセファロスポリン系薬剤を分解し、セファマイシン系およびオキサセフェム系薬剤を分解しない特徴を持ち、遺伝子型により SHV 型および TEM 型、CTX-M 型に分類される。各々の遺伝子型により分解しやすい薬剤も異なっており、薬剤感受性パターンから遺伝子型

表1 従来法と AmpC/ESBL 鑑別ディスクにおける薬剤耐性菌検出状況の比較

			AmpC/ESBL鑑別ディスク				計
			ESBL産生	AmpC産生	ESBL・AmpC産生	ESBL・AmpC非産生	
従来法	ESBL産生	<i>E. coli</i>	39	0	4	0	43
		<i>K. pneumoniae</i>	11	0	0	0	11
	ESBL非産生	<i>E. coli</i>	0	22	0	8	30
		<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	2	2
		<i>K. oxytoca</i>	0	0	0	3	3

の推測がある程度可能であると言われている<sup>8)</sup>。一方、AmpCは第3世代セファロスポリン系薬剤に加えてセファマイシン系およびオキサセフェム系薬剤も分解する。そして、ESBLとは異なり、SPACE菌群 (*Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp.) に代表される多くのグラム陰性桿菌では、染色体上にAmpC (染色体性AmpC) を保有している。また、プラスミド性のAmpCもあり、元来、染色体上にAmpCをコードしていない *Klebsiella* spp. では確認が容易であるが、その他の菌種では、染色体性AmpCかプラスミド性のAmpCかの鑑別は日常検査において容易でない。さらに、ESBLやAmpC以外にもMBLや *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) など、多種多様なβ-ラクタマーゼが存在しているため、我々が日常業務において各薬剤耐性菌を正確に検出することは困難が多いのが実情である。このような耐性菌をめぐる状況において、AmpCやESBL産生菌を効果的に検出することは感染症の治療のみならず、医療関連感染対策においても重要である。今回検討したAmpC/ESBL鑑別ディスク法は従来法との一致率も高く、操作も簡便であることからルーチン検査に有用であると考えられる。

今回の検討では、CLSI document M100-S19<sup>9)</sup>の判定基準に準拠した場合に、ESBLと判定した株ではCTXとCTRには耐性を示し、CAZには感受性を示している株が多く見られた。また、β-ラクタマーゼ阻害剤配合薬であるSulbactam/Ampicillin (SBT/ABPC) に対しても耐性を示す株が多かった。この薬剤感受性パターンはわが国で多く確認されるCTX-M型のESBLの特徴を示している<sup>9)</sup>。さらにESBLとAmpC同時産生菌と判定した株では、この特徴に加えてAmpCが効率良く分解するとされるセファマイシン系薬剤のcefmetazole (CMZ) やオキサセフェム系薬剤のflomoxef (FMOX) に対しても耐性であった。本検討では耐性遺伝子の確認は実施しなかったものの、薬剤感受性のパターンによる遺伝子型の推測がある程度可能であると思われる。

一方、本ディスクによりAmpC産生菌と判定された22株に対してボロン酸を用いたAmpC阻害試験を行ったところ、全てにおいて阻害が確認された。現在、我々の検査室ではESBL産生菌についてのみ報告しており、AmpCなどの薬剤耐性菌についてはコメントを付与していないが、ESBL非産生と判定したうちの約6割がAmpC産生菌と判定された結果を踏まえて、今後の薬剤耐性菌検査法と臨床側に対する結果報告の形式について、本ディスクの有用性を生かしつつ、再考する必要があると考えられた。

## V. 結語

ESBLやAmpCなどの薬剤耐性菌の検出は、抗菌薬治療や医療関連感染防止対策において、極めて重要である。しかし、日常業務においてすべての薬剤耐性菌を検出することは難しいのが実情である。今回、検討を実施したAmpC/ESBL鑑別ディスク法は、従来法で使用している同じ培地を用いてESBLとAmpCの判定が可能であることから、これらの薬剤耐性菌の簡便な検出と識別に有用である。また、多くの施設で積極的に報告することが少ないAmpC産生菌に関しては、臨床側に対する有益な情報<sup>10)</sup>として還元する手段を熟考しながら、自施設のワークフローの改良に努めていく必要があると考えられた。

謝辞 本論文の執筆に際しご指導いただきました、岐阜大学大学院医学系研究科病原体制御学分野の大楠清文先生に深謝いたします。

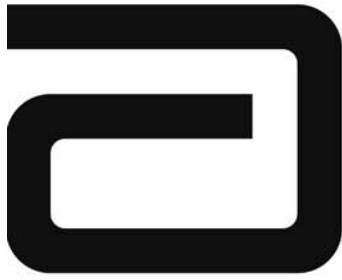
## VI. 文献

- 1) Ambler RP: The structure of β-lactamases, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289 (1036): 321-331
- 2) 中村文子, 近藤成美: 臨床検査ひとくちメモ, モダンメディア2010; 56: 250-256
- 3) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 19<sup>th</sup> informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
- 4) 森 千尋ら: AmpC/ESBL 鑑別ディスクによるβ-ラクタマーゼ分類法の検討, *日本臨床微生物学雑誌* 2012; 22: 187
- 5) Yagi T *et al*: Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2551-2558
- 6) Bush K, Jacoby GA: Updated Functional Classification of β-Lactamases, *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 969-976
- 7) Giske CG *et al*: Redefining extended-spectrum β-lactamases: balancing science and clinical need, *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 1-4
- 8) 宮崎博章: 耐性菌 Up Date—疫学・耐性メカニズムから臨床症例まで 話題の耐性菌 ESBL産生菌, *臨床と微生物* 2013; 40: 213-218
- 9) 荒川宜親: 広域β-ラクタム薬耐性に関するβ-ラクタマーゼの特徴と遺伝的相関, *日本臨床微生物学雑誌* 2003; 13: 150-161
- 10) 土井洋平: 新しい観点からみたβ-ラクタマーゼ—その動向と対策— クラスCβ-ラクタマーゼ, *化学療法*の領域2012; 28: 64-72



# 廣告協贊





# ARCHITECT®

インテグレーション – 先進のハイブリットシステム –

“迅速・簡単・効率 = 生化学検査+免疫検査”

ARCHITECT®  
アナライザー i1000SR  
(生化学測定オプション  
c 4000)

ARCHITECT®  
アナライザー i2000SR  
(生化学測定オプション  
c 8000)

ARCHITECT®  
アナライザー i2000SR  
(生化学測定オプション  
c 16000)



ARCHITECT®アナライザー i1000SR 医療機器製造販売届出番号:12B1X00001000005  
ARCHITECT®アナライザー i2000SR 医療機器製造販売届出番号:12B1X00001000004

アボット ジャパン株式会社  
診断薬・機器事業部  
〒106-8535 東京都港区六本木1-9-9 六本木ファーストビル  
電話 (03) 3589-9441 (大代)  
<http://www.abbott.co.jp>

 **Abbott**  
A Promise for Life

1933年創業以来、医療と共に!



SINCE1933

MEDICALINSTRUMENTS SCIENTIFICINSTRUMENTS



医 療 機 器

病医院諸設備

研 究 機 器

福祉介護機器

## 井上精機株式会社

本 社 〒500-8687 岐阜市玉宮町1-11  
TEL(058)265-4501(代) FAX(058)262-7858  
高山(営) 〒506-0058 高山市山田町290-1  
TEL(0577)32-6277(代) FAX(0577)32-5689  
大垣(営) 〒503-0852 大垣市禾森町4-2019-13  
TEL(0584)82-4384 FAX(0584)82-4386



見つける。見わける。見つづける。



全自動免疫測定装置

# HISCL<sup>®</sup>-2000*i*

医療機器製造販売届出番号:28B2X10007000089



## 迅速測定

液相での初期抗原抗体反応とアビジン-ビオチン反応による磁性粒子への迅速なトラップ反応により、反応時間17分を実現しました。



## コンティニアスアッセイ

試薬交換による測定中断のないコンティニアスローディングシステムを搭載。さらに、各種共通試薬を2個設置可能なリザーブシステムの採用により、連続測定を可能にしました。



## 微量検体

圧力センサによる吸引異常検知などの各種監視機能により、微量でも信頼性の高い検体分注システムの構築に成功しました。(検体量:10~30 $\mu$ L/テスト)



## 高感度

酵素にアルカリホスファターゼ、化学発光基質に強い発光強度を示すCDP-Star<sup>®</sup>を採用。高い感度を有する測定系を実現しました。

●パンフレット、資料は下記にご請求ください。

We Believe the Possibilities.

製造販売元

シスメックス株式会社

本社 神戸市中央区脇浜海岸通1-5-1 〒651-0073

国内事業推進本部 Tel 078-992-6124

支店 仙台 022-722-1710 北関東 048-600-3888 東京 03-5434-8550 名古屋 052-775-8101 大阪 06-6337-8300 広島 082-248-9070 福岡 092-411-4314  
営業所 札幌 011-700-1090 盛岡 019-654-3331 長野 0263-31-8180 新潟 025-243-6266 千葉 043-297-2701 静岡 054-237-4815 金沢 076-221-9363  
京都 075-801-3196 神戸 078-251-5331 高松 087-823-5801 岡山 086-224-2605 鹿児島 099-222-2788

www.sysmex.co.jp



マネジメントシステム認証取得  
Certified Management System  
・ISO 9001, JIS Q 9001  
・ISO 14001, JIS Q 14001  
・ISO 13485

注: 活動及びサイトの運営範囲は規格により異なります。  
詳細は www.tuv.com の ID 0910589004 を参照。  
Note: Scopes of sites and activities vary depending on the standard.  
For details, refer to the ID 0910589004 at www.tuv.com



---

## 平成25年度 岐阜県臨床検査技師会誌

発行者 社団法人 岐阜県臨床検査技師会 代表者 北村 顕

編集 社団法人 岐阜県臨床検査技師会 代表者 石郷 潮美  
近藤 眞一

発行元 社団法人 岐阜県臨床検査技師会  
〒500-8384 岐阜市藪田南3丁目5番地10  
コスタ岐阜県庁前ビル6階603号室  
TEL 058-275-5596 FAX 058-213-0220

印刷 西濃印刷株式会社  
〒500-8074 岐阜市七軒町15番地  
TEL 058-263-4101 FAX 058-263-4104

---