

敗血症の起因菌として分離された *Campylobacter* 様細菌を菌種同定した2事例

依田 清江

Two cases of identification of *Campylobacter*-like bacteria isolated from human sepsis blood.

Kiyoe YODA

要 旨

敗血症患者の血液から分離された *Campylobacter* 様細菌を同定したところ *Arcobacter butzleri* であった。本菌のヒトからの検出例は稀で、本邦では1例目であった。

また、蜂窩織炎を伴う敗血症患者の血液から、形状は *Campylobacter* 様であるが培養条件が厳しい細菌が分離され、細菌学および分子生物学的解析から *Helicobacter cinaedi* と同定した。本菌は分離・同定が困難であり、検出例は稀である。本菌の培養法および同定法に若干の知見が得られたので報告する。

キーワード：敗血症、蜂窩織炎、*Campylobacter* 様細菌、*Arcobacter butzleri*、*Helicobacter cinaedi*。

Key Word : sepsis, cellulitis, *Campylobacter*-like bacteria, *Arcobacter butzleri*, *Helicobacter cinaedi*。

はじめに

敗血症の起因菌として分離頻度が高いのは *E. coli*, *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* 等であり *Campylobacter* による敗血症は稀である。当研究室では平成17年から平成18年の約1年間に、敗血症の起因菌として分離された *Campylobacter* 様細菌を解析した3事例において、それぞれ *Arcobacter butzleri*、*C. jejuni* および *Helicobacter cinaedi* を同定した。これらのうち *A. butzleri* および *H. cinaedi* は分離や同定が困難で、ヒトからの検出例は非常に稀な菌種である。2事例の概要および菌の分離・同定法を報告する。

事例Ⅰ

患者は約1年前に拡大肝右葉切除・胆管切除および胆管空腸吻合術を受けた61才の女性。平成17年10月初旬、38℃の発熱があり、抗菌薬セフォペラゾン/スルバクタム投与で一旦解熱したが再発熱した。そこで、イミペネム投与、続いてパズフロキサシン投与に変更したが、約2週間に渡り胆管炎によると思われる36～39℃台の発熱を間歇的に繰り返した。発熱2日目に血液培養を行ったところ、グラム陰性の螺旋菌が認められたため、*Campylobacter* を疑って CCDA 培地で微好気培養をした。分離菌の薬剤感受性テストの結果から、ミノサイクリン処方に変更し患者は解熱した。一方、この菌は同定キット ApiCampy で *C. coli* となったが、好気培養でも増殖するため当室に搬入し、精査した。

事例Ⅱ

患者は58歳男性。慢性糸球体腎炎による腎不全のため週3回外来透析を施行中。平成18年8月25日、右下肢下腿に発赤腫脹。26日、39℃発熱。28日、蜂窩織炎・敗血症疑いで入院。全自動血液培養装置にて血液培養開始。

セフォチアム投与開始。31日、解熱せず左下腿にも蜂窩織炎出現。9月1日、血液培養陽性となり、鏡検でグラム陰性螺旋状菌が観察された。メロペネムに変更したところ、3日には36.6℃まで解熱。7日下肢の痛みが消失し、11日発赤が消失した。しかし、12日は37.8℃、16日は38.3℃の発熱があり、シプロフロキサシンとメシル酸パズフロキサシン併用に変更した。19日、36.1℃まで解熱し、28日に退院した。分離菌種が不明のため当室に同定依頼があった。

方法

事例Ⅰの分離菌は純培養後、形状、培養条件の要求性、生化学性状およびPCR法によって菌種を同定した。PCRはFeraらの方法（プライマー：ArcBUTZ Top ; 5'-CCTGGACTTGACATAGTAAGAATGA-3', Bot 16S-rDNA; 5'-CGTATTCCACCGTAGCATAGC-3'）¹⁾に従った。

事例Ⅱの分離菌は6種類の市販生培地1. ヒツジ血液寒天培地(K)(BBL)、2. BYチョコレート寒天培地(BBL)、3. CDC嫌気性菌用ヒツジ血液寒天培地(BBL)、4. TS5%ヒツジ血液寒天培地(BBL)、5. アネロコロンビアウサギ血液寒天培地(BBL)、6. mCCDA培地(Oxoid)と2種類の微好気条件1. ガスパックプラス嫌気(BBL)(カタリストは除去)、2. アネロパック微好気(三菱ガス化学)を組み合わせて、最適発育条件を検討した。菌種の同定は生化学性状およびPCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 解析によって行った。PCRのプライマーCAH 16S 1a (5'-AATACATGCAAGTCGAACGA-3')とCAH 16S 1b (5'-TTAACC-CAACATCTCACGAC-3')は *Campylobacter*, *Arcobacter* および *Helicobacter* 属に共通の16S rRNA 遺伝子の一部を対象にしており、1004bpの産物を制限酵素Dde Iあるいは

は Bsr I で切断したパターンから、各菌種を同定することが出来る²⁾。

事例Ⅰの結果

分離菌はグラム陰性、螺旋状桿菌で、生菌の鏡頭像は活発なコルクスクリュウ運動がみられ *Campylobacter* 様であった。しかし *Campylobacter* に凝集するラテックス反応は陰性、CCDA 培地に37℃では微好気および好気培養で増殖するが、42℃ではいずれの条件でも増殖しなかった。*Arcobacter* 培地に15～37℃まで、好気、微好気および嫌気培養で良く増殖するが42℃では発育せず、馬尿酸塩加水分解陰性、酢酸インドキシル加水分解陽性、オキシダーゼ陽性であることから *A. butzleri* または *A. cryaerophilus* と考えられた。ナリジク酸およびセファロシンに耐性であったが、PCR 法で *A. butzleri* に特異的な401bp のバンドがみられること (図1)、微弱なカタラーゼ反応を示すことから *A. butzleri* と同定した。

事例Ⅱの結果

分離菌は形状や運動性は *Campylobacter* 様であったが、培養条件が厳しく、増殖速度が非常に遅かった。37℃、4日培養で培地1.には透明な膜が一面に広がった状態に発育が見られた。培地2.と3.では菌の接種部近傍にのみ発育が見られた。培地4.、5.および6.には発育しなかった。微好気条件はガスパックプラス嫌気をカタリスト無しで使用し、発生した水素ガス存在下で培養した方が良く増殖した (表1)。このような培養条件の要求は菌の継代初期に顕著であったが、数代継代以後は培地4.でアネロパック微好気使用でも増殖するようになった。好気および嫌気条件や25℃および43℃では何れの培地にも発育しなかった。

生化学性状はオキシダーゼ陽性、カタラーゼ陽性、硝

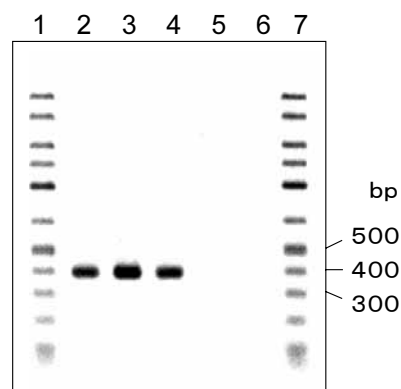


図1 PCR 産物

Lane 1 & 7: 50-2500bp DNA Markers、lane 2: *A. butzleri* 標準株 (ATCC49616)、lane 3: *A. butzleri* 鶏肉由来株、lane 4: 患者由来株、lane 5: *C. coli*、lane 6: *C. jejuni*。

酸塩還元陽性、馬尿酸塩加水分解陰性、酢酸インドキシル加水分解陰性であった。形状はグラム陰性の湾曲した桿菌で、生菌の鏡頭像は活発なコルクスクリュウ運動と、空気に暴露後の速やかな球状化が特徴的であった。以上の性状から *H. cinaedi* が推定された。同定キット Api Campy (Bio Merieux) では *H. cinaedi* / *C. lari* となった。

図2にPCR-RFLP解析結果を示した。PCR 産物(A)のDde I切断パターン(B)およびBsr I切断パターン(C)は、対照として用いた *C. jejuni* および *C. lari* のそれぞれに特徴的なパターンであった。一方、患者由来株は *H. cinaedi* に特異的なパターンであり、上記性状と併せて *H. cinaedi* と同定した。

表1. 培地による発育の比較

No.	培地	微好気条件	
		ガスパックプラス嫌気 ^{a)}	アネロパック微好気
1.	ヒツジ血液寒天 (K)	+++	++
2.	BY チョコレート寒天	++	+
3.	CDC 嫌気性菌様用ヒツジ血液寒天	++	+
4.	TS5%ヒツジ血液寒天	—	—
5.	アネロコロンビアウサギ血液寒天	—	—
6.	mCCDA	—	—

^{a)} カタリスト無し. +++: 培地全面に遊走して増殖, ++: 菌の接種部近傍に増殖,

+: 菌の接種部のみに増殖, —: 増殖無し。

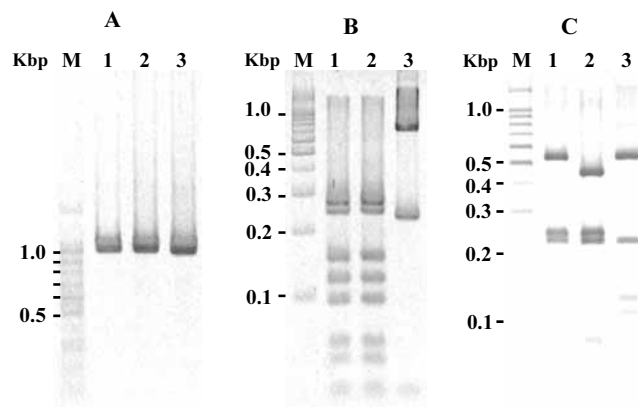


図2. PCR産物とPCR-RFLP解析

A: PCR産物 (1%アガロースゲル電気泳動), B: Dde I 切断パターン (4%アガロースゲル電気泳動), C: Bsr I 切断パターン (4%アガロースゲル電気泳動). Lane 1: *C. jejuni*, lane 2: *C. lari*, lane 3: 患者由来株. Lane M: 分子量マーカー

考察

Arcobacter は1977年に初めて牛から分離され、1990年代以後に人からの分離が報告された³⁾、いわゆる新興の病原菌である。当初は *Campylobacter* の1菌種と考えられていたが、現在は6菌種からなる *Arcobacter* 属として分類されている^{4,5)}。最も検出頻度の高い *A. butzleri* は人および動物に病原性を有し、欧米では腸炎や敗血症患者からの分離が報告されている⁶⁾。しかし日本では、動物や環境中からの検出が報告されている⁷⁾ものの、人からの検出は本事例が初めてである。日本で今まで人からの *Arcobacter* 検出例が無かったのは、まだ病原菌として認識されず、適切な分離・同定が行われなかったためと思われる。*Arcobacter* は既存の分離培地や培養条件でも培養できるが、一般に良く知られている病原細菌の判定基準から外れるため、見逃していた可能性が高いと考えられる。たとえば、*Campylobacter* を検査の対象にすると、多くの場合42℃で増菌および分離培養されるが、この温度では *Arcobacter* は増殖せず、37℃で培養したとしても、好気培養できるため *Campylobacter* の判定基準に合致しない。本事例のように、37℃で血液培養した菌が同定キットで *C. coli* と判定されることもある。いずれにしろ、通常の検査では *Arcobacter* の同定に至らないと思われる。

近年、*H. pylori* がヒトの消化性潰瘍の主な原因菌として注目され、細菌学および遺伝子学的研究や病原性の研究が急速に進んだ。その過程で、*H. pylori* 以外にも多くの菌種がヒトや動物から検出され、現在 *Helicobacter* 属には23菌種以上が含まれる。*H. cinaedi* は、1989年に *Helicobacter* 属が新設されるまでは *Campylobacter* 属に分類されており、棲息部位 (主に腸管) や性状は類似点が多い。しかし、*H. cinaedi* は培養条件が厳しくコロニーを形成するのに数日以上が必用である。また、病原菌と

しての認識度も低いことから、通常の検査で分離されるのは非常に稀である。人からの分離例は、欧米において、主に免疫不全患者の症例が報告されている⁸⁾。日本では2003年に初めて、血液培養からの分離例が報告され、以後、菌血症・敗血症患者からの検出例が散見されるようになった。これらの多くは、免疫異常のない整形外科領域の症例で、蜂窩織炎を伴っていた⁹⁾。本症例でも、患者は長期にわたり血液透析を実施しているものの、免疫異常は認められなかった。*H. cinaedi* は菌の検出が困難な故に、その病原性が過小評価されている可能性がある。日和見的な感染症のみならず、健常者における感染症にあっても、本菌の分離・同定を積極的に実施することで、潜在的な患者の存在が明らかとなり、*H. cinaedi* 感染症の疫学・病態の解明に繋がると考えられる。

謝辞

2事例の発症状況等に関する情報をご提供いただいた各医療機関の関係者各位、また *Arcobacter cinaedi* の同定においてご指導賜りました日本大学生物資源科学部壁谷英則先生に深謝いたします。

文献

- 1) Fera MT, Mageri TL, Gugliandolo C, Beninati C, Giannone M, Camere EL. Detection of *Arcobacter* spp. in the coastal environment of the Mediterranean Sea. Appl Environ Micro. 2004; 70:1271-1276.
- 2) Marshall SM, Melito PL, Woodward DL, Johnson WM, Rodgers FG, Mulvey MR. Rapid identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. J Clin Microbiol. 1999; 37:4158-4160.
- 3) Kiehlauch JA, Brenner DJ, Nicholson MA, Baker CN, Patton CM, Steigerwalt AG, et al. *Campylobacter*

- butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness. J Clin Microbiol. 1991; 29: 376-385.
- 4) Vandamme P, Vancanneyt M, Pot B, Mels L, Hoste B, Dewettinck D, et al. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. Int J Syst Bacteriol. 1992; 42:344-356.
- 5) Donachie SP, Bowman JP, On SLW, Alam M. *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*. Int J Syst Evol Microbiol. 2005; 55:1271-1277.
- 6) Vandenberg O, Dediste A, Houf K, Ibekwem S, Souayah H, Cadranel S, et al. *Arcobacter* species in humans. CDC EID, 2004; 10:1863-1867.
- 7) 森田幸雄, 壁谷秀則, 田村幸生, 坂脇廣美, 藤田雅弘, 石岡大成, 他.群馬県の河川水における *Arcobacter* 汚染状況と大腸菌群数との関連性. 日獣会誌. 2005; 58:415-417.
- 8) Kiehlbauch JA, Tauxe RV, Baker CN, Wachsmuth IK. *Helicobacter cinaedi*-associated bacteremia and cellulitis in immunocompromised patients. Ann Intern Med. 1994; 121:90-93.
- 9) Kitamura T, Kamura Y, Ohkusu K, Masaki T, Iwashita H, Sawa T, et al. *Helicobacter cinaedi* cellulitis and bacteremia in immunocompetent hosts after orthopedic surgery. J Clin Microbiol. 2007; 45: 31-38.