

[症 例]

パラフィン包埋試料からの遺伝子 *invA* の証明が診断に有効であった
nontyphoid *Salmonella* による感染性腹部大動脈瘤の 1 剖検例井上由香・伊藤 誠・奥川 勝・蔵前 仁
松井奈津子・井沢義雄・酒井昭嘉
刈谷豊田総合病院臨床検査科

(平成 19 年 5 月 2 日受付, 平成 20 年 2 月 21 日受理)

糖尿病患者に発症した非チフス性サルモネラによる感染性腹部大動脈瘤の 1 例を経験した。患者は 62 歳, 男性で, 38°C 台の発熱, 腰痛を主訴に入院した。高血糖状態の補正を行うと同時に, 血液培養を施行した。感染源究明のため CT 検査を施行したところ, 腹部大動脈下端に切迫破裂の腹部大動脈瘤が発見された。抗菌薬の経験的投与を行ったが, 第 3 病日からタール便が出現しショック状態となり死亡した。剖検で腹部大動脈壁の粥状硬化部の破綻と後腹膜脂肪組織の急性化膿性蜂窩織炎が認められた。直接死因は胃潰瘍からの消化管出血であった。血液培養から *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis が検出されたが, 動脈瘤破綻部位の病理組織標本では菌体の証明が困難であったため, ホルマリン固定パラフィン切片から PCR によるサルモネラ属に特異的な病原遺伝子 *invA* の増幅を試みた。その結果, 100 bp 前後の短い DNA 断片については増幅が可能であり, 起炎菌の同定の一助として有効な手段であった。

Key words: nontyphoid *Salmonella*, 感染性大動脈瘤, 病原遺伝子, PCR, 病理解剖

序 文

非チフス性サルモネラ (*nontyphoid Salmonella* spp.) は細菌性胃腸炎の原因菌として高頻度に分離される菌であるが, 単に食中毒の原因としてのみでなく人獣共通感染症としても注目され, 近年では耐性菌の増加も懸念されている^{1)~4)}。また, 本菌は高齢者や免疫不全患者に重篤で致死率の高い腸管外感染を惹起することでも知られており⁵⁾, 代表的な病態として, 敗血症, 感染性大動脈瘤, 感染性心内膜炎が挙げられる。これら深部臓器の侵襲性サルモネラ感染は, 菌血症をきっかけに診断が確定されることがほとんどであり, 早期に血液培養を実施すること, 検査結果を迅速に臨床に伝達することが重要である。

今回, 我々は致死的経過をたどった非チフス性サルモネラによる感染性腹部大動脈瘤の 1 例を経験した。

入院時の血液培養から *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis が検出されたが, 病理組織標本からの起炎菌の証明が困難であったため, PCR を用いてホルマリン固定されたパラフィン切片からサルモネラ属に特異的な病原遺伝子の証明を試みたことが, 起炎菌の確定に有用であったので報告する。

I. 症 例

患 者: 62 歳, 男性。

主 訴: 発熱, 腰痛, 吃逆。

既往歴: 発症 1 年前に糖尿病を指摘されたが放置していた。

現病歴: 2003 年 11 月 14 日から全身倦怠, 胃部不快感を自覚し, 近医を受診した。咽頭発赤, 37.9°C の発熱があったため風邪薬を処方され, いったんは症状が改善した。しかし, 21 日から腰痛と 38.9°C の発熱が出現し, 血液検査で血糖値の上昇, 末梢白血球増多, 血沈亢進 (61 mm/h) が認められた。入院前日より吃逆が断続的に出現するようになり, 11 月 28 日, 午前 0 時 5 分に当院救急外来を受診した。感染に伴う糖尿病の増悪が疑われたため内科一般病棟に入院した。

入院時現症: 血圧 143/90 mmHg, 脈拍 84/min,

著者連絡先: (〒448-8505) 刈谷市住吉町 5-15
医療法人豊田会刈谷豊田総合病院臨床検査科
井上由香
TEL: 0566-25-8005
FAX: 0566-25-8216

体温 37.8°C。吃逆があり、腰部の鈍痛を強く訴えた。身体的所見として咽頭の軽度発赤がみられた。心音・呼吸音には異常はなかった。腹部の圧痛はなかったが、右背部に叩打痛があった。リンパ節の腫大はなく、神経学的にも異常は認められなかった。

入院時検査成績：血液検査の結果は、赤血球数 $436 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、ヘモグロビン 12.1 g/dl、ヘマトクリット 36.6%、血小板数 $46.3 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、白血球数 $14.7 \times 10^3/\mu\text{l}$ (分画比：骨髄球, 1%; 桿状核球, 1%; 分葉核球, 79%; リンパ球, 13%) であった。主要な生化学検査値は、BUN 12.7 mg/dl, クレアチニン 0.5 mg/dl, 総タンパク質 7.2 g/dl, アルブミン 3.1 g/dl, ALT 53 U/L, AST 28 U/L, LDH 474 U/L, CRP 6.6 mg/dl, 血糖 303 mg/dl, HbA1c 11.7% であった。

入院後経過：11月28日(第1病日)、高血糖のため速効型遺伝子組換え型ヒトインスリン製剤を投与して血糖管理を行った。腹部症状は明らかでなかったが、腹部CT検査を施行したところ、腹部大動脈の総腸骨動脈分岐部直上に瘤形成があり、造影剤の漏出が後腹膜に限局性に生じ、かつ周辺に浸潤性の halo が確認できた (Fig. 1)。循環器外科との協議で感染性腹部大動脈瘤の可能性が示唆されたが、抗菌薬による感染症治療を優先させた後に外科的対処を行う方針がとられた。血圧のコントロールのため塩酸ニカルジピンの投与を行い、抗菌薬としてピペラシリン (PIPC) 4 g/day (分2) の静注を行った。

第2病日(土曜日)、血圧、脈拍は安定していたが、体温が 38.9°C に上昇した。同日、夕方からタール便が出現した。背部痛を訴えたが、腹部に圧痛はなかった。



Fig. 1. Abdominal CT image following infusion of contrast medium
L, left; R, right.

第3病日(日曜日)、保存的に経過観察していたが、夜間になって血圧の下降や急激なヘモグロビン値の減少 (7.8 g/dl) を生じた。午後8時30分頃、胸部不快感を訴え、突然心肺停止となった。蘇生を試みたが午後9時20分に死亡確認された。死後2時間を経て病理解剖を行った。血液培養の結果が判明したのは、剖検終了後であった。

II. 細菌学的検査

入院時に、血液培養を1回行った。静脈血を好気ボトル (96F レズンボトル, 日本ベクトン・ディッキンソン) の1本に採取し、BACTEC9120 (日本ベクトン・ディッキンソン) で培養を行い、13時間後に陽性信号を得たボトル菌液のグラム染色で、グラム陰性桿菌であることが確認された。分離培養された菌の同定検査と薬剤感受性検査は MicroScan WalkAway-96 Neg-Combo5J (DADE BEHRING) を用いて行い、*Salmonella* sp. (プロファイルコード, 53125044; 確率 99.5%) と同定された。薬剤感受性試験の結果を Table 1 に示した。血清型別試験はサルモネラ免疫血清「生研」(デンカ生研) を用いて行い、菌体抗原: O9 群, 鞭毛抗原: g, m 型と判定され、*Salmonella enterica* serovar. Enteritidis に決定した。なお剖検時にも上大静脈より血液を採取し、同様に血液培養を行ったが菌は検出されなかった。また剖検時には細菌検査

Table 1. Antimicrobial susceptibility of the isolated *Salmonella* sp.

Antibiotics tested	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
Ampicillin	≤ 4
Piperacillin	≤ 8
Amoxicillin-clavulanic acid	≤ 8
Cefazolin	≤ 4
Cefmetazole	≤ 4
Cefotaxime	≤ 8
Ceftazidime	≤ 1
Cefpirome	≤ 8
Cefoperazone-sulbactam	≤ 16
Cefaclor	≤ 8
Cefcapene	1
Cefpodoxime	≤ 4
Flomoxef	≤ 8
Aztreonam	≤ 8
Imipenem	≤ 1
Levofloxacin	≤ 1
Minocycline	2
Fosfomycin	≤ 4
Sulfamethoxazole-trimethoprim	≤ 2

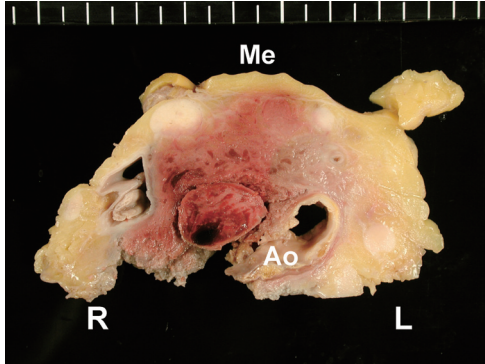


Fig. 2. Gross finding of ruptured infrarenal aortic aneurysm
Ao, aortic wall; Me, mesenteric fat tissue.

のための組織の採取は実施されなかった。

III. 病理解剖学的検査

剖検により腹部大動脈下端から左総骨動脈分岐にかけて3×4.5 cm 大の腹部大動脈瘤があり、石灰化を伴う粥状硬化と壁の一部の破綻が認められた。破綻部から腸間膜根部と後腹膜脂肪織にかけて血液の漏出が見られたが、腹腔内への出血や腸管内への穿破には至っていなかった (Fig. 2)。直接死因は、胃体部前・後壁に急性出血性潰瘍があることから出血性ショックと考えられた。2型糖尿病による冠動脈や腎動脈の動脈硬化性変化は軽微であった。

組織学的には、大動脈壁は融解壊死し、後腹膜から腸間膜脂肪織には急性蜂窩織炎が広がり、限局的な出血を生じていた。心内膜、弁膜、肺、消化管粘膜などには感染源となる炎症巣は見いだせなかった。動脈瘤周囲の炎症巣の組織切片のグラム染色を試みたが、菌体の確認はできなかった。

IV. パラフィンプロックからのサルモネラ病原遺伝子の同定

組織切片標本での起炎菌の証明ができなかった

め、ホルマリン固定されたパラフィン包埋試料を用い、サルモネラ属に特異的な遺伝子の同定を試みた。検出のターゲットにしたのは、ほぼすべての血清型の *Salmonella* spp. のゲノムに共有され、宿主細胞への侵襲性に関連した *inv-spa* 遺伝子群である^{6),7)}。その中で DNA 多型の乏しい *invA* 遺伝子 (GeneBank accession no. U43273) を選択した。

方法は動脈瘤破綻部のホルマリン固定パラフィン包埋材料から10 μm 前後の薄切片をマイクロチューブに回収し、TaKaRa DEXPAT (Takara Biomedicals) で DNA を抽出し、PCR のテンプレート DNA を調整した。PCR 増幅のためのプライマーは Table 2 に示した。PCR は GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) を用いて行い、PCR 試薬は Expand Long DNA polymerase mix (Boehringer Mannheim) を使用した。PCR のプロトコールは 94°C, 5 分の初期熱変性の後、35 サイクルの増幅反応 (95°C, 1 分間の変性; 60°C, 1 分 30 秒間のアニーリング; 68°C, 2 分間の DNA 伸長), 72°C, 10 分間の最終伸長反応を行った。常法に従い PCR 産物は、3% アガロース電気泳動の後、エチジウム・プロマイド染色を行った。陽性対照として *S. enterica* serovar. Typhimurium 保存株由来のゲノム DNA を用いた。

PCR の結果、プライマーペア INV-AF1/AR1 を用いた系では、血液培養分離株で 248 bp に相当する部位に陽性バンドが確認できたが、パラフィン切片由来の試料は陰性であった (Fig. 3A)。改めてプライマーペア INV-AF2/AR1 を用いたところ、パラフィン切片由来の試料からも 107 bp の位置に陽性バンドを検出できた (Fig. 3B)。

V. 考 察

非チフス性サルモネラによる腸管外サルモネラ感染症は多様な病態を惹起する。敗血症、感染性心内膜炎、感染性大動脈瘤、尿路感染症、関節炎など重篤な感染症が含まれる^{2),5)}。臨床的に明らかな急性胃腸炎が先行することはまれである。

非チフス性サルモネラ感染症の疫学について、デン

Table 2. Oligonucleotide primers for *Salmonella* genus-specific *invA* amplification

Primers	Synthesized oligonucleotide sequence	Positions flanking the <i>invA</i> gene ^{a)}
INV-AF1	5'-GTG CCG GTT TTA TCG TGA CT-3'	734→753
INV-AF2	5'-CGC TGC CGG TAT TTG TTA TT-3'	875→894
INV-AR1	5'-CTC GCC TTT GCT GGT TTT AG-3'	962←981

^{a)} GenBank accession number, U43273 (see ref. 7).

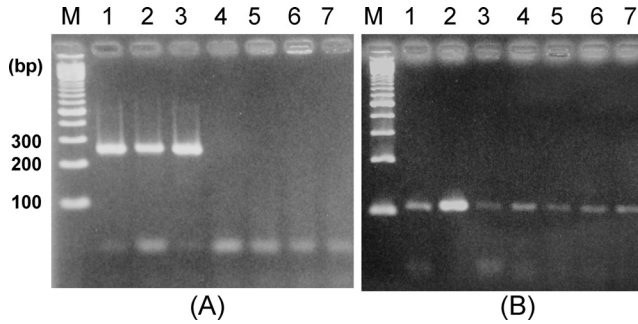


Fig. 3. Results of PCR-based amplification of *Salmonella* genus-specific *invA* gene

(A) A 248-bp amplicon for the primers INV-AF1 and INV-AR1 can be detected in lanes 1 to 3. Lane 1 (*S. enterica* Typhimurium strain), lanes 2 & 3 (*Salmonella* sp. isolated from the patient's blood), and lanes 4-7 (DNA extracted from paraffin section).

(B) An 107-bp amplicon for the primers INV-AF2 and INV-AR1 can be detected in all of lane 1 (*S. enterica* Typhimurium strain), lane 2 (*Salmonella* sp. isolated from the patient's blood), and lanes 3 to 7 (DNA extracted from paraffin section). M, molecular weight marker (100-bp ladder).

マークの Staten Serum Institute により 1991 年から 1999 年までの期間に約 50 万人の人口を占める地域の病院を対象とした分離菌の調査が行われた⁸⁾。その結果登録された患者 3,328 例のうち 4.06% (135 例) が腸管外感染であり、そのうち 111 例に菌血症が認められた。腸管外感染のうち、心臓・大血管感染は 9 例のみであった。また台湾での調査では、301 例の非チフス性サルモネラ感染入院患者の 40.20% (121 例) に菌血症が認められ、心臓・大血管感染としては感染性心内膜炎 2 例、感染性大動脈瘤 25 例、動静脈グラフト感染 1 例であった⁹⁾。

非チフス性サルモネラによる感染性大動脈瘤に限った統計では、Cohen らが 1987 年までの文献を渉猟して 41 例の臨床の特徴を報告している⁹⁾。それによれば、患者の平均年齢は 62 歳、男女比は 36:5 であった。病変発生部位は 28 例が腹部大動脈の腎動脈分岐部下であり、基礎疾患として 12 例に糖尿病、5 例に肝硬変が認められた。死亡率は 56% で、手術の対象にならなかった例では 100% と報告されている。Cohen らの報告から 20 年を経て、死亡率は 20% 以下まで改善したと報告されている⁹⁾。画像診断法の進歩や外科療法の成績の向上とともに、血液培養検査の感度や迅速化も予後の改善の一要因であろう。本例は患者背景、基礎疾患、動脈瘤発生部位に関して、Cohen らの報告の特徴をよく反映していた。糖尿病の管理の不良に加え、症状の初発から当院受診までに 15 日間を要し感染症は重篤化していた。入院直後に感染性腹部大動脈瘤の疑いと早期に診断が下されたが、糖尿病の増悪と発熱のため手術を選択することができなかった。

本例の管理上の問題点として、経験的に選択された PIPC の投与量が十分ではなかった点と、血液培養の中間報告 (ボトル菌液のグラム染色の結果の報告) から最終的な同定検査結果の報告までの間に休日を挟んだことで時間を要した点が挙げられる。筆者らの施設では、電子カルテ化と院内 web system の整備などで検査と臨床との意思疎通は改善されたが、専任の微生物検査技師が常に休日対応できるまでには至っていない。今後は重症感染症が想定される場合は、緊急時での対応が可能な微生物検査の態勢を整えると同時に、臨床との情報連携が重要であると考えられる。

本例では病理解剖の段階で臨床情報が不足しており動脈瘤破綻部からの細菌検査用検体の採取を行わなかった。また、病理組織学的検査でも起炎菌を証明するに至らず、粥腫性動脈瘤の破綻による炎症か感染性動脈瘤かの鑑別に苦慮した。このためホルマリン固定パラフィン材料を用い、想定された起炎菌であるサルモネラ属に特異的な遺伝子の同定を PCR で試みた。今回、PCR の増幅の対象とした *spv-inv* 遺伝子群は、腸管外侵襲性を示す非チフス性サルモネラに遍く存在する病原関連遺伝子であり^{6), 10)}、上皮細胞への侵襲性や食細胞内寄生性を担っている。この遺伝子群の中の *invA* は全長 1,950 bp で塩基配列の多型性が少ない領域であるため PCR 検査のターゲットとして選択されている⁷⁾。しかし、ホルマリン固定された試料からの PCR は、阻害物質の存在や、DNA の細片化のため偽陰性となることをしばしば経験する。本例でも最初の実験では 200~400 bp の *invA* の増幅は確認できなかったが、短いフラグメント (100 bp 前後) を増幅す

るためのプライマーを用いたことで、検出感度が高くなり *invA* の証明が可能になったと考えられる。

感染性動脈瘤の起炎菌は、非チフス性サルモネラに限らず、グラム陽性球菌を含め多様化している¹¹⁾。したがって想定される起炎菌に応じて、検査室独自の組織内病原菌の検出法の工夫や遺伝子診断の応用を考慮する余地がある。

謝 辞 今回、血清型の判別にご助力賜りました岐阜大学大学院医学研究科病原制御学の大楠清文博士に深謝いたします。

引用文献

- 1) Tauxe, R. V. 1997. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 3: 425-434.
- 2) Hohmann, E. L. 2001. Nontyphoid salmonellosis. *Clin. Infect. Dis.* 32: 263-269.
- 3) Kayaba, H., K. Kodama, K. Shirayama, et al. 2002. Analysis of physical and laboratory findings in nontyphoidal salmonellosis. *J. Infect. Chemother.* 8: 232-236.
- 4) Galanis, E., D. M. Lo Fo Wong, M. E. Patrick, et al. 2006. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 381-388.
- 5) Cohen, J. I., J. A. Bartlett, G. R. Corey. 1987. Extra-intestinal manifestations of *Salmonella* infections. *Medicine (Baltimore)* 66: 349-388.
- 6) Mills, D. M., V. Bajaj, C. A. Lee. 1995. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol. Microbiol.* 15: 749-759.
- 7) Boyd, E. F., J. Li, H. Ochman, R. K. Selander. 1997. Comparative genetics of the *inv-spa* invasion gene complex of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* 179: 1985-1991.
- 8) Fisker, N., K. Vinding, K. Mølbak, M. K. Hornstrup. 2003. Clinical review of nontyphoid *Salmonella* infections from 1991 to 1999 in a Danish county. *Clin. Infect. Dis.* 37: e47-e52.
- 9) Hsu, R. B., Y. G. Tsay, R. J. Chen, S. H. Chu. 2003. Risk factors for primary bacteremia and endovascular infection in patients without acquired immunodeficiency syndrome who have nontyphoid salmonellosis. *Clin. Infect. Dis.* 36: 829-834.
- 10) Fierer, J., D. G. Guiney. 2001. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J. Clin. Invest.* 107: 775-780.
- 11) Lee, C. C., Y. Y. Ng, Y. H. Chou, et al. 2000. Mycotic aneurysm of the abdominal aorta in a patient undergoing hemodialysis: an unusual complication of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 30: 823-824.

An Autopsy Case of Infectious Aortic Aneurysm Caused by Nontyphoid *Salmonella*: PCR-Based Genus-Specific *invA* Gene Detection Aided the Diagnosis

Yuka Inoue, Makoto Ito, Masaru Okugawa, Hitoshi Kuramae,
Natsuko Matsui, Yoshio Izawa, Akiyoshi Sakai
Department of Pathology and Laboratory Medicine, Kariya Toyota
General Hospital

An autopsy case of infectious aortic aneurysm in a 62-year-old diabetic male patient was reported. The causative pathogen isolated from blood culture was identified as *Salmonella enterica* serovar, Enteritidis. To confirm a patho-etiological relationship we attempted a PCR-based detection of nontyphoid *Salmonella* genus-specific *invA* gene from formalin-fixed paraffin sections. By using DNA templates extracted from tissue sections prepared from the aneurysmal site, conventional PCR protocol was able to detect the *Salmonella*-specific *invA* amplicon with the primer set designed to amplify a short flanking region (107-bp) within the open reading frame of *invA*. The detection of pathogen-specific genes from various resources may serve as a diagnostic adjunct for determining the etiology of deep-seated infections, even when there are solely autopsy materials available.