

[症 例]

嫌気性スピロヘータ *Brachyspira pilosicoli* による菌血症の 1 例

千田澄江¹⁾・明壁 均¹⁾・大楠清文²⁾・江崎孝行²⁾

¹⁾ 常滑市民病院 臨床検査センター

²⁾ 岐阜大学大学院医学系研究科病原体制御学分野

(平成 21 年 6 月 29 日受付, 平成 21 年 12 月 4 日受理)

Brachyspira pilosicoli はヒトや動物の腸管スピロヘータ症の原因菌である。本菌の血液からの分離例は本邦ではまだ報告がない。我々は血液培養より *B. pilosicoli* を分離できた症例を経験したので報告する。患者は東南アジアに渡航歴のある 56 歳男性。心肺停止状態にて救急搬送され、当院にて蘇生された。血液培養は 10 日目に陽性シグナルを示した。サブカルチャーは嫌気環境下で 4 日間行い、血液寒天培地に特徴的な弱い β 溶血を示すフィルム状コロニーが発育した。16S rRNA 遺伝子の塩基配列相同性によって *B. pilosicoli* と同定された。当院では以前 *Helicobacter cinaedi* 敗血症を経験したことから、血液培養期間を 7 日から 10 日間に変更した。よって、この培養時間の延長がなければ見逃されていた症例である。

Key words: *Brachyspira pilosicoli*, bacteremia, intestinal spirochaetosis, blood culture, 16S rRNA gene

Brachyspira pilosicoli は嫌気性スピロヘータで豚の結腸炎や慢性下痢症の原因菌として知られている。本菌は広い宿主域を有することからヒトや多くの動物の腸管から分離され、人畜共通感染症の病原体としてもその重要性が認識されるようになってきている^{1,2)}。

Brachyspira 属には現在、*B. pilosicoli* 以外に *B. aalborgi*, *B. hyodysenteriae*, *B. innocens*, *B. intermedia*, *B. murdochii*, *B. alvinipulli* の 7 菌種が記載されている。このうち、ヒトへの感染が報告されているのは *B. pilosicoli* と *B. aalborgi* の 2 菌種である。両菌種ともに腸管スピロヘータ症を起こすが、その頻度は *B. pilosicoli* よりもむしろ *B. aalborgi* のほうが高いとされている^{3~8)}。しかしながら、近年、欧米では *B. pilosicoli* による敗血症例が報告されたことから本菌の病原性が注目されてきた^{9,10)}。翻って、本邦においてはアメーバ性大腸炎を合併した腸管スピロヘータ症での分離報告例¹¹⁾はあるが、血液からの検出は報告がない。今回我々は、血液培養より *B. pilosicoli* を分離できた症例を経験したのでここに提示する。

I. 症例

患者: 56 歳, 男性

主訴: 心肺停止状態蘇生後

職業: 航空機整備士

既往歴: 高血圧

入院時現症: 体温 35.3°C 血圧 149/93 脈拍 88 (不整)

渡航歴: 東南アジアに頻回の渡航歴あり

動物との接触歴: 不明

現病歴: 平成 20 年 7 月 28 日朝、自宅にて気分不快・めまいあり、自ら救急要請。救急隊到着時、意識清明。徒歩にて救急車に乗車するも四肢冷感強度で血圧測定できず。搬送中意識レベル低下、病院到着時心肺停止状態、当院救急室にて蘇生。頭部 CT 上、出血・占拠性病変なく、急性冠症候群にて入院となる。

臨床経過: 入院時および入院同日の検査所見を表 1、臨床経過を図 1 に示す。来院時 (8:29) 心電図所見では ST 上昇は認められなかったが、入院後 (11:10) モニターにて ST 上昇、心電図にて心室細動が認められた。30 分後 (11:40) 心停止状態となり、除細動 (DC ショック 360J×3) を実施し、心拍再開する。同日 (16:17) 白血球数 21,500/ μ l, 体温 37.9°C。肺に間質影が認められたが薬剤の影響と考えられた。循環不全は感染、アレルギー等の関与の可能性を考え cefazolin (CEZ) 1 g/日投与。翌 7 月 29 日 38.6°C の発熱

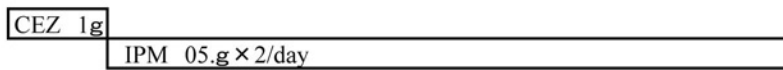
著者連絡先: (〒479-8510) 愛知県常滑市鯉江本町 4-5
常滑市民病院 臨床検査センター
千田 澄江
TEL: 0569-35-3170
FAX: 0569-34-8526

表 1. 入院日検査所見 (2009.7.28)

| 血液検査 | WBC ($\times 10^2/\mu\text{l}$) | Seg (%) | Lym (%) | Mono (%) | Eosino (%) | Baso (%) | RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$) | Hb (g/dl) | Ht (%) | Plt ($\times 10^4/\mu\text{l}$) |
|------------------|--------------------------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|--------------------------------------|--------------|---------------|--------------------------------------|
| ER 到着時 (8:19) | 101 | 29.0 | 60.1 | 4.6 | 2.3 | 0.3 | 424 | 13.8 | 42.5 | 20.2 |
| 入院後 (16:17) | 215 | 90.9 | 2.6 | 5.3 | 0.3 | 0.2 | 436 | 14.3 | 42.0 | 22.9 |
| 生化学検査 | AST (IU/L) | ALT (IU/L) | LDH (IU/L) | CPK (IU/L) | BUN (mg/dl) | Cre (mg/dl) | Na (mEq/L) | K (mEq/L) | Cl (mEq/L) | CRP (mg/dl) |
| ER 到着時 (8:19) | 46 | 35 | 201 | 132 | 12.4 | 0.8 | 150 | 4.5 | 109 | 0.0 |
| 入院後 (16:17) | 2148 | 570 | 2753 | 16133 | 23.9 | 1.7 | 148 | 4.3 | 101 | (8/1) 19.5 |
| 感染症検査 | HBs Ag | HBs Ab | HIV Ab | HCV Ab | TP Ab | | | | | |
| | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | | | | | |

心肺停止 ↓↓

抗菌薬



血液培養

(+) (-) (-)

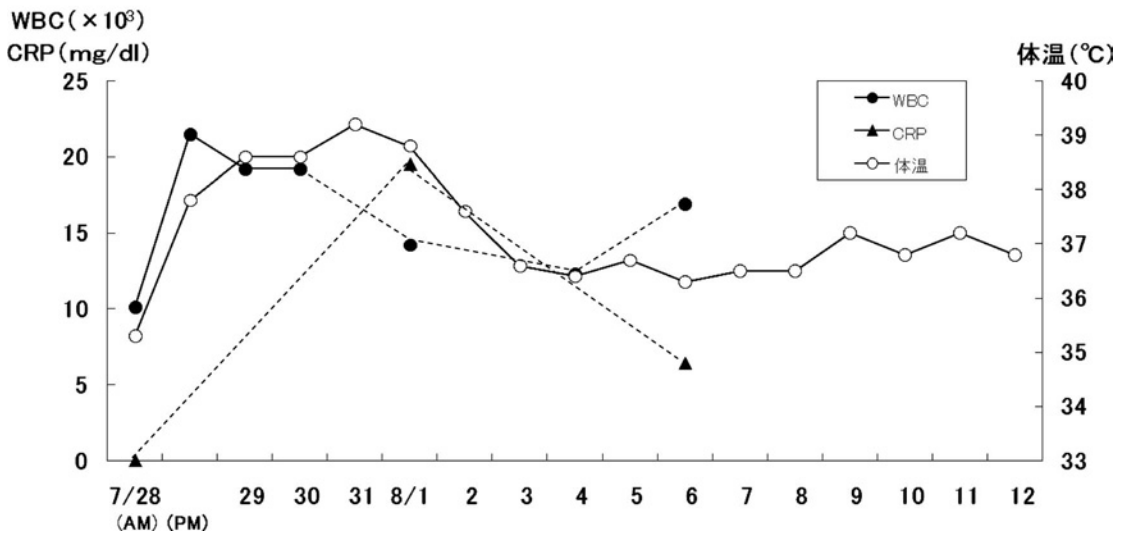


図 1. 臨床経過

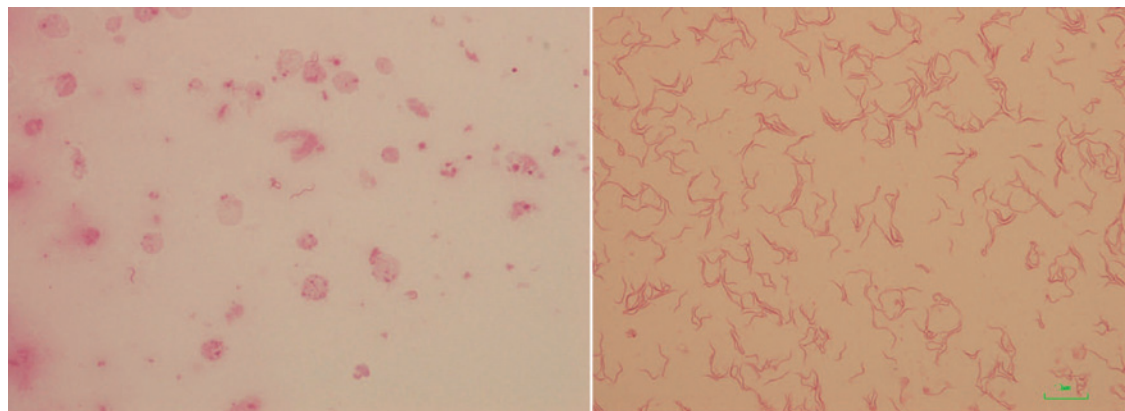
を認め、血液培養施行し、imipenem / cilastatin (IPM/CS) 0.5 g x 2/ 日を 8 月 11 日まで投与した。嘔吐・下痢・下血症状は認められなかった。8 月 3 日に解熱。呼吸・循環動態は維持できるようになったが、2 度の心肺停止による低酸素脳症にて意識回復は認め

られない状態で同年 10 月に転院となった。

II. 微生物学的検査

1. 血液培養

血液培養は、レズン入り好気ボトル BACTEC



a) 血液培養液塗抹所見

b) 培地上コロニー塗抹所見

図2. グラム染色(×1,000) グラム陰性らせん状菌

PLUS Aerobic/F と嫌気ボトル BACTEC PLUS Anaerobic/F の2本をセットとして使用し、全自動血液培養装置 BACTEC9120 (日本ベクトン・ディッキンソン: BD) にて実施した。培養10日目に嫌気用ボトルが陽転。血液培養ボトルからの生標本で細長いらせん菌が糸ミズ様に泳いでいるのが観察された。血液培養液の直接塗抹標本のグラム染色ではバックグラウンドが汚く菌が確認できなかった。そこで、血液培養ボトル内の培養液を分離剤入り採血管にて血球成分と遠心分離した後、沈渣をフェイバーG 後染色・フクシン(日水製薬)にてグラム染色を行い、グラム陰性の長いらせん状菌を観察した(図2a, b)。

サブカルチャーは *Campylobacter* や *Helicobacter* 属の菌種を考慮し、チョコレート/5%羊血液寒天分画培地(BD)、自家製 Skirrow 培地を使用し35°C嫌気培養、35°Cおよび40°C微好気培養、35°C炭酸ガス培養を実施した。4日間培養後、嫌気培養にて弱いβ溶血を示すフィルム状コロニーが観察された。

2. 同定検査

本菌株はカタラーゼ試験陽性、嫌気条件でのみ発育し、弱いβ溶血を示した。らせん状の菌であったことから、簡易同定キット API Campy (シスメックス・ピオメリュー)を用いて同定を試みた。プロファイル No. 4500004 で *Campylobacter jejuni doylei* (%id=95.4% T=0.69) との結果を得たが、微好気培養で発育せず、嫌気培養でのみ発育することから *Campylobacter* や *Helicobacter* とは異なると考えた。次に、嫌気用同定キットを用いて同定を試みた。ラピッド ID 32A アピ(シスメックス・ピオメリュー)ではプロファイル No. 0706400000, *Clostridium acetobutyli-*

表2. 薬剤感受性成績

| 抗菌薬名 | MIC (μg/ml) |
|----------------------------------|-------------|
| Penicillin (PCG) | >4 |
| Ampicillin (ABPC) | >8 |
| Piperacillin (PIPC) | >64 |
| Ampicillin/sulbactam (ABPC/SBT) | >8/4 |
| Cefotiam (CTM) | 2 |
| Caftazidime (CAZ) | 16 |
| Cefotaxime (CTX) | ≤0.5 |
| Cefditoren pivoxil (CDTR-PI) | 0.25 |
| Cefoperazone/sulbactam (CPZ/SBT) | 4/2 |
| Imipenem/cilastatin (IPM/CS) | 0.5 |
| Meropenem (MEPM) | ≤0.12 |
| Gentamicin (GM) | 8 |
| Minocycline (MINO) | ≤0.25 |
| Erythromycin (EM) | >2 |
| Levofloxacin (LVFX) | 4 |
| Clindamycin (CLDM) | 2 |

cum (%ID=47.3 T値=0.59) *Fusobacterium mortiferum* (%ID=27.3 T値=0.41) *Leptotrichia buccalis* (%ID=24.6 T値=0.51) となったが、これらの菌種とはグラム染色形態が合わなかった。BBL CRYSTAL ANR (BD) を用いた同定結果はプロファイル No. 2333472040, RapIDANII (アムコ) ではプロファイル No. 430441 と双方ともに判定不能であった。そこで、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析した結果、*Brachyspira pilosicoli* の基準株と99.9%の一致率であったことから本菌種と同定された。

3. 薬剤感受性試験

βラクタマーゼ産生試験はセフィナーゼ(BD)を使用して実施した結果、陽性であった。薬剤感受性試験

は、極東オプトパネル MP を用いて添付文書に従って菌液調整を行い、極東ウマ溶血加ブルセラブロスを使用して 35°C 4 日間嫌気培養した後、15 薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。結果を表 2 に示す。

III. 考察

血液から *B. pilosicoli* が分離・同定されるケースはまれである。すなわち、文献的に検索し得た限りでは、フランス、アメリカ、ギリシャから合計 9 例が報告⁹⁾されているのみである。これら 9 症例の患者基礎疾患は、脳卒中、アルコール中毒、急性腹症、重度の動脈疾患、骨髄腫、AIDS、非ホジキン病、心原性ショックと多彩である⁹⁾。本症例は、急性冠症候群と考えられ、心筋炎の可能性もあるが精査できなかった症例であった。本人との意思疎通が困難かつ独居であったため患者背景を明確にはできなかったが、免疫不全や同性愛者を思わせる検査所見は見られなかった。*B. pilosicoli* は豚、鶏、イヌ、馬の腸管に寄生しており、インドネシア、バリ島、パプアニューギニアなどの農村地区に住む人は 10~50% の頻度で腸管に保菌していることが報告⁹⁾されている。したがって、感染源としては動物との接触やこれらの国での居住が考えられたが、東南アジアへの頻回の渡航歴があったものの、動物との接触歴は不明であった。*B. pilosicoli* の進入門戸としては、腸管粘膜が考えられている^{9,10)}が、本症例においては、嘔吐・下痢・下血症状は認められず精査はされなかった。

B. pilosicoli が血液より分離・同定されることが少ない要因として、培養期間と培養ボトルの種類が挙げられる。血液培養は 5 日もしくは 7 日間で最終判定するのが一般的である。Brooke らの検討¹²⁾によれば、血液培養から *B. pilosicoli* を検出するには自動機器で 5.6 日から 14.9 日を要したことが示されている。すなわち、一般的な培養日数では、大半の症例で *B. pilosicoli* が発育する前に培養を終えてしまっていることになる。現在、血液培養自動システムは Bact/Alert と BACTEC が主流である。*B. pilosicoli* は Bact/Alert よりも BACTEC の培養ボトルのほうが発育良好であることが報告¹²⁾されている。したがって、Bact/Alert システムを使用している場合には陽性シグナルを示さないことがあるため、サブカルチャーを行うべきであるとしている。当院では BACTEC システムを使用しており、さらに過去に *Helicobacter cinaedi* の分離経験があり、そのときの教訓から血液の培養期間を 10 日まで延長していることが奏功した。我々の病院では血液培養の依頼が少なく、現況では培養期間を延長し

ても自動機器の処理能力に影響を与えることはない。分離頻度が低い *H. cinaedi* や本菌種が分離される可能性を考慮して、すべての血液培養期間を 10 日間まで延長することは費用対効果の面からも推奨できないことは周知の事実である。しかしながら、培養に長い時間を要する感染症例も散見されることから、臨床背景に応じて血液培養時間の延長を考慮することも大切である。

さらに、*B. pilosicoli* の検出が困難な理由として、仮に血液培養ボトルが陽性シグナルを呈してもグラム染色にて本菌体を認識し難いこと、サブカルチャーにて嫌気条件下で 4 日以上培養しなければいけないこと、そして発育した集落がフィルム状であることが今回の経験から明らかになった。本菌は細い糸状のらせん菌であるため、血液培養ボトルからの直接標本によるグラム染色ではバックグラウンドとのコントラストがなく識別し難い。改善策として、血液培養ボトル内の培養液を分離剤入り採血管にて血球成分と遠心分離し、沈渣を染色することにより観察を容易にする方法がある。それでも菌体を認識するには注意深い観察が必要であるが、今回、我々が実施したように、生標本での観察のほうが特有な運動性を確認でき簡便で効果的であった。サブカルチャーに関しては、チョコレート寒天培地 (BD)、5% ヒツジ血液寒天培地 (BD)、ブルセラ HK 寒天培地 (極東)、自家製 Skirrow 培地いずれにも嫌気培養にて発育したが、チョコレート寒天培地での発育が最も良好であった。非常に薄くフィルム状に拡散して発育するため集落かどうか認識し難いが、 β 溶血の存在が発育確認の助けとなった。

近年、血液からの分離報告¹⁴⁾が多くなってきている *H. cinaedi* も遅発育性でフィルム状のコロニー形成をするらせん菌であるため本菌との鑑別が重要である。Darren らはヒトの血液由来 *B. pilosicoli* 7 株について生化学性状を精査して、すべての株が嫌氣的発育、弱い β 溶血、馬尿酸加水分解陽性、 β グルコシダーゼ陰性、インドール産生は 3 株が陽性であったと報告¹⁰⁾している。なお、豚由来の *Brachyspira* 属の同定については大宅らが簡易迅速同定法¹⁴⁾を示しているが、ヒト由来株とは性状が異なる場合があるので注意が必要である。嫌気性のグラム陰性らせん状菌でフィルム状コロニーを呈し、血液寒天培地での弱い β 溶血と馬尿酸加水分解試験陽性の場合には本菌を考慮することが重要である。最終的な同定には 16S rRNA 遺伝子の配列解析に頼ることが多い^{9,15)}。

病理組織学的検査において、ヒトへの感染頻度は *B. pilosicoli* よりもむしろ *B. aalborgi* のほうが高いとき

れているが、*B. aalborgi* の分離報告例は *B. pilosicoli* よりさらにまれである。これは *B. aalborgi* の発育に要する培養時間が *B. pilosicoli* よりもさらに長く (1~2 週間)、ピンポイント状に発育するため観察に苦慮することが要因の一つと考えられる。分離報告例¹⁶⁾は、大腸粘膜生検材料からのもので、血液からのものはないことから *B. aalborgi* よりも *B. pilosicoli* のほうが bacterial translocation が生じやすいのではないかと推測される。

Brooke らは 139 株の *B. pilosicoli* の薬剤感受性成績について、パプアニューギニア村民 ($n=29$)、オーストラリア原住民 ($n=32$)、西オーストラリア移民族 ($n=24$)、同性愛者 ($n=14$)、オマーン人 ($n=10$)、イタリア患者 ($n=7$)、ヒト血液由来 ($n=7$)、豚由来 ($n=16$) の各グループにおいて検討している¹⁷⁾。 β ラクターマーゼ陽性率は 0~93.8% と検出集団によりさまざまで、他の薬剤感受性成績についても同様に検出集団により違いを認めたと、ceftriaxone (CTRX), chloramphenicol (CP), meropenem (MEPM), metronidazole (MTZ), tetracycline (TC) には感受性を示したと報告¹⁷⁾している。本症例で分離された菌株は β ラクターマーゼ陽性であり、ペニシリン系薬に耐性を示したが、cefotaxime (CTX), cefditoren (CDTR), IPM/CS, MEPM, minocycline (MINO) には良好な感受性を示した。

以上、嫌気性スピロヘータである *B. pilosicoli* はその特性から現況の検査体制では見逃されている可能性があることを指摘した。本菌による菌血症は本邦で初めての貴重な症例であったため、報告した。

なお、本論文の要旨は第 20 回日本臨床微生物学会総会 (2009 年 2 月) において発表した。

謝辞 稿を終るにあたり、臨床所見についてご教示をいただいた当院循環器内科医長の有田編理先生に深謝いたします。

文 献

- Hampson, D. J., S. L. Oxberry, T. La. 2006. Potential for zoonotic transmission of *Brachyspira pilosicoli*. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 869-870
- 足立吉数. 1999. 腸管スピロヘータ症 人畜共通感染症として. *モダンメディア* 45: 201-206.
- Mikozsa, A. S., D. J. Hampson. 2001. Human intestinal spirochetosis: *Brachyspira aalborgi* and/or *Brachyspira pilosicoli*? *Anim. Health Res. Rev.* 2: 101-110.
- 中村眞一, 佐藤 一, 幅野 渉. 2008. 比較的稀あるいは今後注目すべき炎症性疾患 腸管スピロヘータ症. *病理と臨床* 26: 836-840.
- Smith, J. L. 2005. Colonic spirochetosis in animals and humans. *J. Food Protec.* 68: 1525-1532.
- Hovind-Hougen, K., A. Birch-Andersen, R. Henrik-Nielsen, et al. 1982. Intestinal spirochetosis: Morphological characterization and cultivation of the spirochete *Brachyspira aalborgi* geb. nov., sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* 16: 1127-1136.
- Mikozsa, A. S. J., T. La, C. J. Brooke, et al. 1999. PCR amplification from fixed tissue indicates frequent involvement of *Brachyspira aalborgi* in human intestinal spirochetosis. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2093-2098.
- Tanahasi, J., T. Daa, A. Gamachiet, et al. 2008. Human intestinal spirochetosis in Japan: Its incidence, clinicopathologic features, and genotypic identification. *Mod. Pathol.* 21: 76-84.
- Bait-Merabet, L., T. Arnaud, L. Patrick, et al. 2008. *Brachyspira pilosicoli* bloodstream infections: Case report and review of the literature. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 25: 7-19.
- Trott, D. J., N. S. Jensen, I. S. Girons, et al. 1997. Identification and characterization of *Serpulina pilosicoli* isolates recovered from the blood of critically ill patients. *J. Clin. Microbiol.* 35: 482-485.
- 田中洋輔, 長住瑠美, 青柳恵美子, 他. 2005. アメーバ性大腸炎と *Brachyspira pilosicoli* による腸管スピロヘータ症を合併した 1 例. *日臨微誌* 15: 187-196.
- Brooke, C. J., K. Rini Margawani, A. K. Pearson, et al. 2000. Evaluation of blood culture systems for detection of the intestinal spirochaete *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli* in human blood. *J. Med. Microbiol.* 49: 1031-1036.
- 大楠清文, 江崎孝行. 2007. *Helicobacter cinaedi* 感染症. *感染 炎症 免疫* 37: 336-339
- 大宅辰夫, 吉満理恵, 伊藤博哉. 1997. 豚由来 *Serpulina* 属の簡易迅速同定法. *日本獣医学会 124 回講演要旨集* 124: 230.
- Tasu, C., T. Tanaka, T. Tanaka, et al. 2004. *Brachyspira pilosicoli* isolated from pigs in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 875-877.
- Kraaz, W., B. Pettersson, U. Thunberg, et al. 2000. *Brachyspira aalborgi* infection diagnosed by culture and 16S ribosomal DNA sequencing using human colonic biopsy specimens. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3555-3560.
- Brooke, C. J., D. J. Hampson, T. V. Riley. 2003. In vitro antimicrobial susceptibility of *Brachyspira pilosicoli* isolates from humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 2354-2357.

A Case of Bacteremia Caused by *Brachyspira pilosicoli*

Sumie Chida,¹⁾ Hitoshi Asukabe,¹⁾ Kiyofumi Ohkusu,²⁾ Takayuki Ezaki²⁾

¹⁾ Department of Clinical Laboratory, Tokoname Municipal Hospital

²⁾ Department of Microbiology, Gifu University Graduate School of Medicine

Brachyspira pilosicoli is the etiologic agent of human and animal intestinal spirochetosis and is rarely implicated as a cause of bacteremia. Here, we describe the case of a *B. pilosicoli* spirochetemia in a 56-year-old male patient suffering from cardiogenic shock. Blood cultures were positive after 10 days of incubation. After 4 days, the isolate was subcultured on 5% sheep blood-containing agar plates under anaerobic conditions at 35°C and the growth appeared as a thin film with weak β -hemolysis. Furthermore, the isolate was identified as *B. pilosicoli* by means of nucleotide sequencing analysis of bacterial 16S rRNA gene. This case would be difficult to be observed unless the extension of incubation time for blood culture.