

[症 例]

本邦で初めて分離された *Paracoccus yeei* の 1 例田澤庸子¹⁾・佐々木裕美¹⁾・古畑由紀江¹⁾・菊地勇治¹⁾・堀内 啓¹⁾・大楠清文²⁾¹⁾ NTT 東日本関東病院臨床検査部²⁾ 岐阜大学大学院医学系研究科病原体制御学分野

(平成 22 年 4 月 9 日受付, 平成 22 年 8 月 30 日受理)

2003 年に新種として登録された *Paracoccus yeei* を分離した症例を経験した。患者は、74 歳男性で、2008 年 2 月に入院後腭頭部癌と診断され、腭頭十二指腸切除術を予定していた。術前は胆道感染症を示唆する所見は認められず、スクリーニング目的の胆汁が検査室に提出された。塗抹検査ではグラム陽性球菌と *Moraxella catarrharis* 様のグラム陰性双球菌が認められ、分離培養では MSSA のほかに、ムコイド状のコロニーが遅れて発育してきた。このコロニーは、グラム陰性球菌、カタラーゼとオキシダーゼ陽性で、自動同定感受性測定機器による同定では *Moraxella* sp. となったがコロニーの形態が一致せず、簡易キットでは判定不能であった。そのため遺伝子学的検査を実施し、16S rDNA 塩基配列の相同性 (99.8%) の結果から本邦で初めての分離報告となる *P. yeei* が同定された。同定機器やキットのデータベースにない菌種を分離した際には、早期に臨床側と患者や分離菌に関する情報を共有し、遺伝子学的同定法などの手法を選択することが重要と思われた。

Key words: *Paracoccus yeei*, 16S rRNA, *Moraxella catarrharis*

序 文

Paracoccus 属は非常に短い桿菌様の形態で単体、二連または集塊で存在し、グラム陰性菌で莢膜と芽胞はなく、非運動性、カタラーゼとオキシダーゼ陽性で硝酸塩を還元する好気性菌である¹⁾。現在 27 菌種が登録されており、そのうちの *Paracoccus yeei* は、かつて CDC (Centers for Disease Control and Prevention) eugonic oxidizer group 2 (Group EO-2) に分類されていたグラム陰性の球菌ないし球桿菌で、2003 年に Daneshvar らの論文²⁾ によって新種として登録された菌種である。

今回筆者らは、腭頭部癌患者の胆汁より *Paracoccus yeei* の分離・同定を経験した。分離菌は既存の同定機器および簡易同定キットにはデータベースにない菌種であったため、同定に難渋した。最終的

に遺伝子解析によって *P. yeei* と同定することができたが、本邦では初めてとなる本菌の分離・同定を経験した症例であったため報告する。

I. 症 例

患 者: 74 歳, 男性

既往歴: 完全房室ブロックのためペースメーカー挿入 (71 歳)

現病歴: 2007 年秋に急性腭炎で近医に入院し、その後の検査で腭頭部多房性腫瘤が認められた。本人の希望により 2008 年 2 月初旬精査加療目的で当院に入院し、腭管内乳頭粘液性腺癌が疑われたため、2 月 21 日に腭頭十二指腸切除術を予定していた。2 月 7 日に経鼻胆管ドレナージを挿入していたが、術前までは発熱や胆道感染症を示唆する所見は認められなかった。2 月 14 日に術前のスクリーニング目的の胆汁が検査室に提出され、methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) とムコイド状のコロニー (のちに *Paracoccus yeei* と同定) が分離された。18 日に提出された胆汁からも同様な菌が検出された。手術は予定どおり実施され、分離菌の薬剤感受性結果から術後感染予防のために flomoxef (FMOX) を 4 日間投与され

著者連絡先: (〒141-8625) 東京都品川区東五反田5-9-22

NTT東日本関東病院臨床検査部

田澤庸子

TEL: 03-3448-6412

FAX: 03-3448-6413

E-mail: ytazawa@east.ntt.co.jp

た。術後の経過は良好で3月末に退院した。

II. 細菌学的検査

1) 塗抹検査

2月14日に提出された胆汁のグラム染色所見は、グラム陽性球菌と *Moraxella catarrharis* 様のグラム陰性双球菌が認められた(図1)。このグラム陰性双球菌は菌体内に空胞が存在するように染まっていた。18日に提出された胆汁からも同様な形態を示すグラム陰性双球菌が認められた。

2) 培養検査

分離培養はヒツジ血液寒天培地(T)(ヒツジ血寒, 日本BD), BTB乳糖加寒天培地(BTB, 日本BD), チョコレート寒天培地(チョコレート寒天, 極東製薬), ABHK寒天培地(ABHK, 日水製薬)を使用し, ヒツジ血寒とBTBは35°C好気条件下, チョコレート寒天は35°C 10%CO₂条件下でそれぞれ一夜培養し, ABHKは35°C嫌気チャンバーにて2日間培養した。

2月14日, 18日の胆汁から分離された菌を表1に示す。14日に提出された胆汁からは, 翌日ヒツジ血

寒, BTBおよびチョコレート寒天上にMSSAの発育が認められたのみであったが, それらの分離培地を室温に置いて3日目(週末を挟む)にヒツジ血寒とBTBにムコイド状のコロニーの発育が認められた(図2)。しかし, チョコレート寒天と2日間嫌気培養後のABHKにはムコイド状のコロニーの発育は認められなかった。18日の検体からもヒツジ血寒とBTBに同様なムコイド状のコロニーが一夜培養後から認められた。14日および18日の検体から分離したムコイド状のコロニーは, 培養当初はムコイド型緑膿菌のように無色透明で点状に発育し, 日数が経過するにつれて大きくなり黄色味を帯びてきた(図3)。

表1. 培養検査結果

採取日	検体	検出菌	菌量
2月14日	胆汁	<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)	2+
		<i>Paracoccus yeei</i>	1+
2月18日	胆汁	<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)	1+
		<i>Paracoccus yeei</i>	1+
		α -Streptococci	1+
		γ -Streptococci	1+

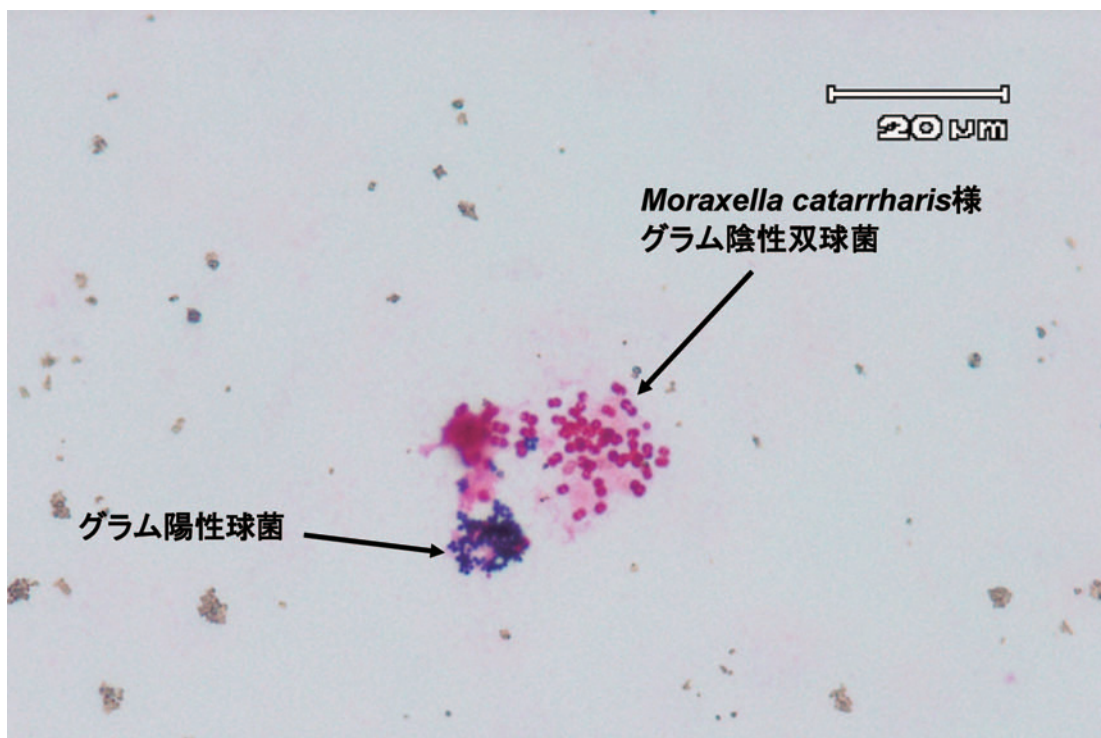


図1. 塗抹検査所見(グラム染色, ×1,000)
2月14日採取の胆汁

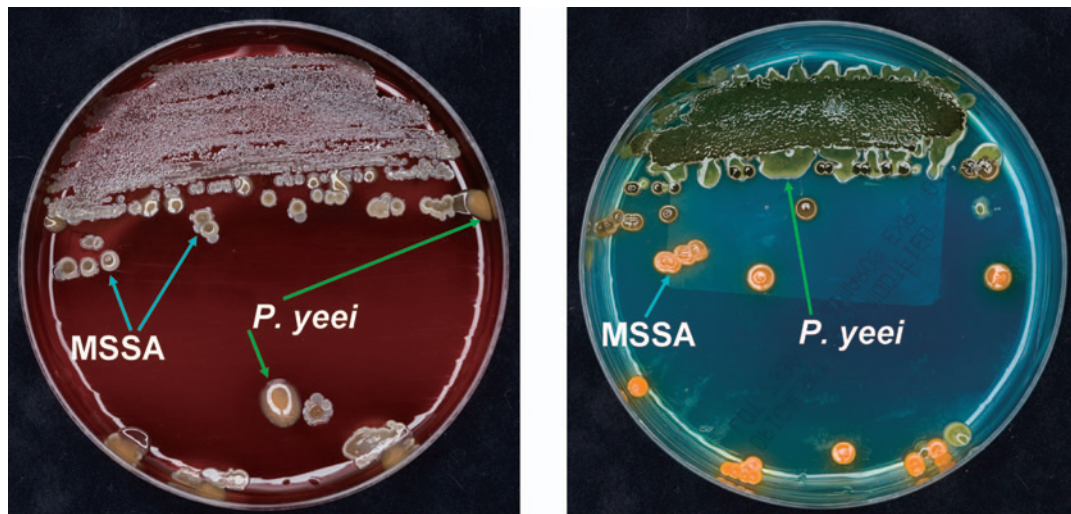
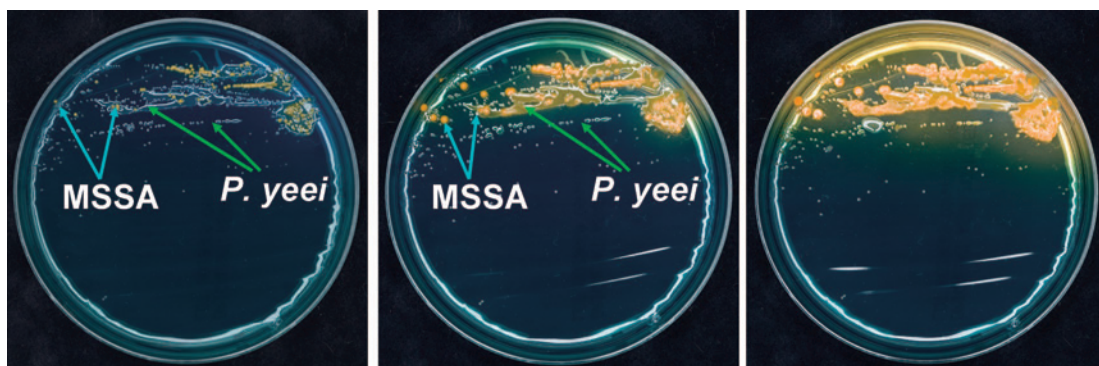


図 2. 分離培地の発育
 ①ヒツジ血液寒天培地, ②BTB 乳糖加寒天培地 (一夜培養後, 室温で 3 日目)



一夜培養後

室温 1 日目

室温 2 日目

図 3. BTB 乳糖加寒天培地上のコロニーの変化
 (2 月 18 日採取の胆汁)

3) 同定検査

ムコイド状のコロニーのグラム染色所見はグラム陰性球菌～短桿菌様で二連形成も認められた。カタラーゼテスト (自家製) およびオキシダーゼテスト (ポアメディア オキシダーゼテスト, 栄研化学) は陽性であった。また, ムコイド型緑膿菌の可能性も疑い 42°C の発育性とアシルアミダーゼテスト (ポアメディア アセトアミド培地, 栄研化学) を実施したが, いずれも陰性だった。以上の結果から, MicroScan Neg Combo 6.11J パネル (シーメンスヘルスケア・ダイア

グノスティックス) を用いて MicroScan WalkAway 96SI (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティックス) による同定感受性検査を実施するとともに, ID テスト・HN-20 ラピッド (日水製薬), ID テスト・NF-18 (日水製薬), BD BBLCRYSTAL E/NF (日本 BD) も使用した。MicroScan では, *Moraxella* sp. (バイオタイプ 40000402) に同定された。ID テスト・HN-20 ラピッド (プロファイル番号: 7151141) および ID テスト・NF-18 (プロファイル番号: 373102) は, 該当する菌コードがなかったため同定不能と判定された。

表 2. 薬剤感受性検査結果

	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
Ampicillin	≤ 4
Amoxicillin/Clavulanic acid	≤ 8
Piperacillin	16
Cefaclor	≤ 8
Cefazolin	≤ 4
Cefmetazole	≤ 4
Cefotiam	≤ 8
Ceftazidime	8
Cefotaxime	≤ 8
Cefpirome	≤ 8
Cefcapene	≤ 0.25
Cefpodoxime	≤ 4
Sulbactam/Cefoperazone	≤ 16
Flomoxef	≤ 8
Aztreonam	16
Imipenem	≤ 1
Gentamicin	≤ 1
Amikacin	≤ 4
Minocycline	≤ 1
Levofloxacin	≤ 1
Fosfomycin	> 16
Sulfamethoxazole/Trimethoprim	> 2

BD BBLCRYSTAL E/NF は *Empedobacter brevis*, *Bergeyella zoohelcom*, Misc. Gram Negative Bacilli (バイオタイプ 2201000000, Confidence value: 各々 0.51963, 0.34455, 0.05404) といずれも同定確率の低い菌種が挙げられた。いずれの同定結果も本菌のコロニー形態やグラム染色結果からすると乖離していたため、遺伝子検査による菌種の同定を選択した。16S rRNA 遺伝子のほぼ全長をブロード・レンジ PCR 法で増幅した後、産物を精製後、シーケンス解析して塩基配列を決定した³⁾。その結果、本菌株の 16S rDNA 塩基配列は、*P. yeei* の基準株と 99.8% の相同性を示したため、*P. yeei* と同定された。

4) 薬剤感受性試験

MicroScan Neg Combo 6.11J パネルを使用し、MicroScan WalkAway96SI にて最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。結果を表 2 に示す。aztreonam, fosfomycin, sulfamethoxazole/trimethoprim 以外の薬剤は良好な感受性を示した。

III. 考 察

今回筆者らは、分離培地にムコイド状コロニーが点状に発育してきた時点で、オキシダーゼ試験陽性であったため、当初ムコイド型緑膿菌を想定した。しかし検体の塗抹標本でグラム陰性の双球菌が認められた

ことから、分離培地のコロニーのグラム染色を実施したところグラム陰性球菌～短桿菌様であった。さらに 42°C の発育性とアシルアミダーゼテストは陰性だったため、ムコイド型緑膿菌は否定的となった。また顕微鏡所見から *Acinetobacter* sp. や *Moraxella* sp. が想定されたが、*Acinetobacter* sp. はオキシダーゼ試験陽性で否定された。さらにこれらの菌を含めた菌種を同定できる MicroScan や同定キットを選択したところ、MicroScan では *Moraxella* sp. に同定されたが培地上のコロニー形態で相違しており、BD BBL-CRYSTAL E/NF では同定確率が低く、*Empedobacter brevis* はオキシダーゼ陰性、*Bergeyella zoohelcom* は中程度～長桿菌で否定された。この 2 菌種は ID テスト・NF-18 のデータベースにも載っていたが、結果のプロファイル番号には一致しなかった。Funke らの報告⁴⁾でも、筆者らが経験したように市販の簡易同定キットによる同定に難渋し、遺伝子学的手法によって分離菌の同定がされている。このように分離菌種が同定機器やキットのデータベースにないようであれば、その判定結果を鵜呑みにせず、遺伝子学的同定法などの手法を選択することが必要であると思われる。

Daneshvar らの論文²⁾によれば、*P. yeei* の性状は次のように記載されている。球菌または双球菌～球桿菌で、グラム染色性はグラム陰性（ときどきグラム不定）でしばしば空胞があるように見えたり、菌体周辺のみが染まったりする（“O”形）。無芽胞、非運動性。好気性、35°C で 18～24 時間好気や炭酸ガス培養の環境下の血液寒天培地上で良好な発育を示し、その発育はしばしばムコイド状～極度にムコイド状で分離コロニーは通常点状である。嫌気性環境下では発育しない。35°C 培養で 5% ウサギ血液加ハートインフュージョン寒天培地上において非色素コロニーを形成する。検討した 13 株すべてはオキシダーゼ、ウレアーゼ、クエン酸塩（ときどき 3～7 日遅れる）、キシロースとラクトース（しばしば遅反応）の酸産生、MacConkey 培地上の発育は陽性で、シュクロース (OF 培地ベース) の酸産生、TSI 培地の斜面部および高層部の酸産生と硫化水素産生、インドール、リジン脱炭酸、エスクリン加水分解、ゼラチン液化は陰性を示す。なお、1 株を除いてグルコースからの酸産生、硝酸塩の還元も陽性を示している。グラム染色所見、培地上の発育コロニー、オキシダーゼテストについては筆者らの分離株の所見と一致していた。Daneshvar らが検討した 13 株の上記生化学的性状に対して、筆者らと Funke ら⁴⁾が実施した同定機器やキットの生

表 3. 報告論文と分離菌の生化学的性状の比較

生化学的性状	Funke らの分離株				本分離菌			
	Daneshvar らの検討 (13 株)	API20NE (bioMérieux)	API NH gallery (bioMérieux)	Micro Scan WalkAway 96SI	BBLCRYSTAL E/NF	IDテスト・NF-18	IDテスト・HN-20	追加試験
酸産生 (OF 培地)								
Glucose	*	-	+	+		+	+	+
Xylose	+					+	+	+
Lactose	+					+	-	+
Sucrose	-		-	-	-	+	-	-
ウレアーゼ (Christensen の培地)	+	-	+	+	+	+	+	+
クエン酸塩 (Cit 培地)	+	-		-		-		-
硝酸塩還元	*	+		-	-	+	+	
インドール	-	-	-	-	-	-	-	-
リジン脱炭酸	-			-	-	-	-	-
エスクリン加水分解	-	-		-	-	-	-	-
ゼラチン液化	-	-				-		-
TSI 斜面部の酸産生	-							-
TSI 高層部の酸産生	-							-
硫化水素産生 (TSI)	-							-

*: 検討株中 12 株陽性

化学的性状と筆者らが用手法で Daneshvar らと同様な方法で実施した追加試験の生化学的性状を表 3 に示す。項目別に比較すると、ウレアーゼは Funke の API20NE を除きすべて陽性であった。さらに ID テスト・NF-18 は TSI 培地を除いた上記の性状項目を網羅しており、今回分離した株はシュクロースを除いて性状が一致した。最近 Wallet らが腹膜炎の患者の CAPD 液から本菌を分離し、VITEK 2 GN 同定カード (bioMérieux) で迅速 (7 時間) かつ正確に同定 (excellent identification, probability = 99%) できたことを報告している⁵⁾が、今後他の同定機器やキットのデータベースにも本菌が追加されることを期待したい。

P. yeei による感染症の報告例は世界的に極めて少ない。過去に報告されている分離材料は、耳、足首創部、血液、髄液、目、首の切開排膿、胆汁、腹腔透析液、足の病巣、つま先、皮膚、足の水疱である^{2), 4), 5)}。感染源はいずれも不明であるが、外傷は感染しやすい条件であることが示唆されている²⁾。今回の症例は、感染症の兆候が認められない術前のスクリーニング検体からの分離であり、術後の経過も良好なため菌と考えられた。またカルテ上では外傷や皮膚病変は認められず、侵入門戸は不明であった。

今回はコロニーの性状、検体とコロニーのグラム染色所見、オキシダーゼ陽性、42℃ の発育性とアシルア

ミダーゼテストが陰性と判定された時点で、菌種の推定が困難で過去に分離経験のない菌であることが示唆され、同定に時間がかかることが予想されたため、主治医に連絡を取り検査状況を説明した。その際、主治医から術前に本菌の薬剤感受性だけでも早く知りたいと要望があったので、菌種が確定する前に薬剤感受性検査の MIC 値を報告し、予防投与薬を決める際に活用してもらった。今回の症例のように情報の少ないまれな菌種を分離した際には、早期に臨床側と患者や分離菌に関する情報を共有することが効果的な治療を進めるうえで重要であると再認識した。

文 献

- 1) Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol. 2, The Proteobacteria (Part C), p. 197-204, 2005.
- 2) Daneshvar, M. I., D. G. Hollis, R. S. Weyant, et al. 2003. *Paracoccus yeeii* sp. nov. (formerly CDC group EO-2), a novel bacterial species associated with human infection. J. Clin. Microbiol. 41: 1289-1294.
- 3) 大楠清文, 江崎孝行. 2008. 感染症診断における遺伝子解析技術の適応, 日本臨床微生物学雑誌 18: 1-13.
- 4) Funke, G., R. Frodl, H. Sommer. 2004. First comprehensively documented case of *Paracoccus yeei* infection in a human. J. Clin.

- Microbiol. 42: 3366–3368.
- 5) Wallet, F., N. Blondiaux, C. L. S. Foy, et al. 2009. *Paracoccus yeei*: A new unusual opportunistic bacterium in ambulatory peritoneal dialysis. Int. J. Infect. Dis., in press, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2009.03.030>

First Clinical Isolate of *Paracoccus yeei* in Japan

Yoko Tazawa¹⁾, Hiromi Sasaki¹⁾, Yukie Furuhata¹⁾, Yuji Kikuchi¹⁾,
Hajime Horiuchi¹⁾, Kiyofumi Ohkusu²⁾

¹⁾ Clinical Laboratory, NTT Medical Center Tokyo

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

Paracoccus yeei was registered as a new species in 2003, and the first Japanese patient with *P. yeei* is presented herein. The patient was a 74-year-old man admitted in February 2008, diagnosed with pancreatic head cancer, and scheduled to undergo pancreatoduodenectomy. Findings indicating biliary tract infection were absent preoperatively, and the patient's bile sample was sent to the laboratory for screening purposes. A smear test showed Gram-positive cocci and *Moraxella catarrharis*-like Gram-negative diplococci, while isolation culture identified not only MSSA, but also mucoid colonies. These colonies were catalase-positive, oxidase-positive, Gram-negative cocci; automatic identification and sensitivity analysis indicated *Moraxella* sp., but colony morphologies did not match. The colonies could not be identified using a simple kit. Subsequently, a genetic test was conducted, and based on 99.8% homology of the base sequence of 16S rDNA, it was concluded that *P. yeei* had been isolated for the first time in Japan. When strains that cannot be identified by identification equipment or kits are detected, it is important to promptly share information about isolated bacteria with patients and healthcare professionals and employ such techniques as genetic identification.