

[原 著]

ヒトから分離される *Brachyspira* 属菌の同定と微生物学的特徴

田中洋輔<sup>1)</sup>・松本裕子<sup>2)</sup>・島田直樹<sup>3)</sup>・安西桃子<sup>1)</sup>

大野達也<sup>1)</sup>・小松奈央<sup>1)</sup>・遠藤昌江<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院臨床検査部

<sup>2)</sup> 横浜市衛生研究所微生物検査研究課

<sup>3)</sup> 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院病理診断科

(平成 27 年 6 月 22 日受付, 平成 27 年 9 月 20 日受理)

微生物検査目的に提出された腸管洗浄液 526 検体の直接塗抹グラム染色を実施し, *Brachyspira* 属菌の検出をおこなった。腸管スピロヘータ症と判定した 19 例 (3.6%) をヒツジ血液寒天培地にて嫌気培養をおこなったが, 検出できたのは 9 例で *B. pilosicoli* 5 例, *B. aalborgi* 4 例が 16S rRNA 遺伝子解析により同定された。*Brachyspira* 属菌の分離と生検組織における偽刷子縁が確認された例では *B. pilosicoli* の偽刷子縁は 7 μm 程と長く, *B. aalborgi* の偽刷子縁は 4 μm 程で短く観察された。分離培養不能であった症例の多くは偽刷子縁の長さは短く観察され, 培養困難な *B. aalborgi* であった可能性が示唆された。分離された *B. pilosicoli*, *B. aalborgi* は α-glucosidase, α-galactosidase の性状の違いにより *B. pilosicoli* は 3 タイプに分かれ, *B. aalborgi* とは異なった。*B. pilosicoli* 4 株についておこなった薬剤感受性試験ではペニシリン系薬に高い MIC を示し, β-ラクタマーゼ試験陽性であった。解析が可能であった 3 株で *bla*<sub>OXA-136</sub> の保有が確認されたため, OXA-63 バリエントの OXA-136 産生株であると考えられた。当院の腸管スピロヘータ症は赤痢アメーバなどの原虫感染症や潰瘍性大腸炎などの併存疾患を有する男性に多くみられた。下部消化管内視鏡検査の際に腸管洗浄液を採取し *Brachyspira* 属菌をグラム染色にて検出することにより迅速かつ検出頻度の上昇に繋がるものと考えられた。

**Key words:** *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira aalborgi*, Intestinal spirochetosis, OXA-136, クラス Dβ-ラクタマーゼ

序 文

ヒトの腸管スピロヘータ症は *Brachyspira* 属菌によって引き起こされ<sup>1)</sup>, 組織学的に大腸粘膜上皮に菌体の一端を付着させた多数のスピロヘータが層をなして存在することを特徴とする<sup>2)</sup>。*Brachyspira* の属名の “Brachy” とは “短い” を意味し, ゆるやかで粗大ならせん状構造を示すスピロヘータで 0.2~0.4 μm

×2~10 μm 程の偏性嫌気性のグラム陰性菌である。ヒトに感染する *Brachyspira* 属菌は *Brachyspira aalborgi* と *Brachyspira pilosicoli* が知られており, *B. aalborgi* はヒトと霊長類のみ, *B. pilosicoli* はヒト, ブタ, トリ, イヌ, ネズミなどさまざまな動物に関連する<sup>3)</sup>。ヒト腸管スピロヘータ症における臨床症状は下痢, 腹痛, 腸管出血などといわれているが, *Brachyspira* 属菌の単独の臨床症状として関連しているかは不明である<sup>2)</sup>。*B. pilosicoli* は下痢との関連を示唆する報告<sup>4)~6)</sup>があり, 近年, 血液培養からの分離例も散見され<sup>7,8)</sup>, 病原性や臨床的意義にも注目される。腸管スピロヘータ症における *Brachyspira* 属菌の分離は腸管洗浄液を嫌気培養することで検出可能となるが<sup>9)</sup>, その遅発育性と他の腸管内常在細菌の存在により培養困難となることが多く, さらに, 同定においても難発

著者連絡先: (〒241-0811) 神奈川県横浜市旭区矢指町 1197-1  
聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院臨床検査部  
田中洋輔  
TEL: 045-366-1111 (内 4119)  
FAX: 045-366-1157

し遺伝子配列解析により同定されてきた。病理組織学的には Hematoxylin and Eosin (HE) 染色で大腸粘膜上皮に好塩基性の毛羽立ち(偽刷子縁: false brush border)としてスピロヘータの層がみられ診断の決め手となるが、微生物学的検査からの報告は少ない<sup>8)9)</sup>。

筆者らは当院の腸管スピロヘータ症から分離した *B. aalborgi* と *B. pilosicoli* について若干の臨床微生物学的知見を得たことに加え、*B. pilosicoli* から *bla*<sub>OXA-136</sub> を本邦で初めて検出し、クラス Dβ-ラクタマーゼの産生が考えられたため報告する。

## 対象および方法

### 1. 対象材料および微生物検査

2005年1月から2015年2月までの間、当院にて下部消化管内視鏡検査を実施した際に微生物検査目的に提出された腸管洗浄液を対象とした。腸管洗浄液の直接塗抹グラム染色で多数のスピロヘータを認めた場合に嫌気培養を追加した。グラム染色は Bartholomew & Mittwer 法(和光純薬)にておこない、スピロヘータの染色性を強めるため後染色はパイフェル液にて2~3分長めに染色して観察した。また、分離培養による腸管病原性細菌の検索には DHL 寒天培地(日水製薬)、SS 寒天培地(栄研化学)、クロモアガー STEC 寒天培地(関東化学)、TCBS 寒天培地(栄研化学)を35℃、好気条件にて24時間、CCDA 寒天培地(栄研化学)を42℃、微好気条件にて72時間まで培養をおこなった。腸管寄生原虫の検索には直接生鮮塗抹にて実施し必要に応じてコーン染色(武藤化学)を実施した。また、菌分離後の微生物学的特徴の検討は *B. pilosicoli* 5株、*B. aalborgi* 4株を対象とした。

### 2. *Brachyspira* 分離培養方法

*Brachyspira* 属菌の培養はヒツジ血液寒天培地(日水製薬)をもちいて、3,000 rpm、15分遠心処理した腸管洗浄液を接種、画線し湿潤環境で嫌気ジャーをもちいた嫌気パック法(ダイア嫌気パック: LSI メディエンス)にて37℃、4日~3週間嫌気培養をおこなった。ヒツジ血液寒天培地による *Brachyspira* 属菌の分離は他の腸管内常在細菌の発育によりしばしば検出困難となるため、腸管内常在細菌を捕らえ、スピロヘータのみを通過させる目的で2014年からはメンブレンフィルター法を併用した。孔径0.45 μmのメンブレンフィルター(ADVANTEC)をヒツジ血液寒天培地上に置き、メンブレンフィルターの上から塗抹陽性の腸管洗浄液を接種し、30分静置後、メンブレンフィルターを取り除いて同様の条件にて培養した。培養

後、フィルム様コロニーをグラム染色にて形態を確認し、釣菌した。

### 3. 同定および生化学的性状、病理組織標本における偽刷子縁の検討

分離されたスピロヘータは血液寒天培地より得られたコロニーよりDNA抽出をおこない、16S rRNA 遺伝子の上流約500 bpの遺伝子について塩基配列を決定した。DDBJのBLASTにて相同性検索をおこない、99%以上の相同性において菌種を同定した。同定された *Brachyspira* 属菌は血液寒天培地において湿潤環境で37℃、嫌気培養にて純培養し十分な菌量が得られるまで培養した。Rap ID ANAII(アムコ)に添付文書のとおり接種し、好気条件37℃、4時間培養し、一次判定をおこなった。試薬添加後の二次判定は明瞭な反応がみられなかったため、今回検討から除外した。また、下部消化管内視鏡施行時に組織診目的でおこなわれた大腸生検はHE染色とWarthin-starry染色を施し、偽刷子縁の有無と偽刷子縁の長さを検討した。偽刷子縁の長さはHE染色の大腸粘膜上皮の管腔面から好塩基性部分の長さを50カ所測定し、平均を求めた。測定機器はAxio Cam ERc5s(ZEISS)およびアプリケーションソフトAxio vision(ZEISS)をもちいた。

### 4. 薬剤感受性検査

分離し得た *B. pilosicoli* は同条件で実施できなかった Isolate 1を除いた4株についてドライプレート(栄研化学)およびオプトパネル(極東製薬)をもちいて微量液体希釈法によりMICを測定した。ABCMプロスでMcFaland No. 2相当濃度になるように調整した菌液25 μLを、感受性プルセラプロス(栄研化学)へ接種し、ドライプレート、オプトパネル各ウェルに100 μLずつ分注した。試験抗菌薬はpenicillin(PCG)、ampicillin(ABPC)、ampicillin/sulbactam(A/S)、piperacillin/tazobactam(P/T)、cefoperazone/sulbactam(C/S)、amoxicillin/clavulanic acid(A/C)、ceftizoxime(CZX)、ceftazidime(CAZ)、cefepime(CFPM)、cefmetazole(CMZ)、flomoxef(FMOX)、imipenem(IPM)、meropenem(MEPM)、minocyclin(MINO)、clindamycin(CLDM)、chloramphenicol(CP)をドライプレートにて、cefotaxime(CTX)、ceftriaxone(CTRX)、fosfomicin(FOM)、erythromycin(EM)、clarithromycin(CAM)、levofloxacin(LVFX)、ciprofloxacin(CPFX)、sulfamethoxazole-trimethoprim(ST)をオプトパネルにて測定した。metronidazole(MNZ)はE test(Sysmex-bioMérieux)を使用し、ミューラーヒントン5%羊血液寒天培地(BD)をも

ちいて MIC を測定した。両法ともに嫌気培養 37°C, 4 日目に判定した。*B. aalborgi* 4 株においても同様の方法により感受性検査を試みたが 2 週間後も発育はみとめられず, 判定不能であった。

### 5. *bla*<sub>OXA-63</sub> の検出

菌株が保存され解析が可能であった *B. pilosicoli* 3 菌株について寒天培地上の菌株からアルカリ熱抽出法で DNA を抽出し, Meziane-Cherif らの報告<sup>20)</sup>を元にプライマー *oxaF* (5'-GGT GGT CTC CCA TGT CTA AAA AAA ATT TTA-3') と *oxaR* (5'-CTC CTC GAG TTT TAA TAA ATT TAA TGC TTT-3') を作成し, PCR をおこなった。PCR の結果, 3 菌株とも約 800 bp の増幅産物が得られた。この PCR 産物について, 3500 Genetic Analyzer (Life technologies) をもちいて塩基配列を決定した。得られた配列は DDBJ の BLAST で解析した。

## 結 果

### 1. 患者属性および塗抹所見

対象期間に微生物検査目的に提出された腸管洗浄液 526 検体のうち, 直接塗抹グラム染色で多数のスピロヘータを認めた 19 例 (3.6%) を腸管スピロヘータ症として嫌気培養をおこなった。腸管スピロヘータ症患者 19 例の年齢は 27~79 (平均 46.9) 歳で男性 17 人, 女性 2 人で男性に多く認めた。腸管スピロヘータ症 19 例のうち 9 例で *Brachyspira* 属菌が分離同定され, 内訳は *B. pilosicoli* 5 例, *B. aalborgi* 4 例であった。それぞれの菌種における直接塗抹グラム染色所見では *B. pilosicoli* は菌体長の長いらせん状菌, *B. aalborgi* は菌体長の短いらせん状菌として認められた (Fig. 1)。また, 腸管洗浄液の直接生鮮塗抹では両菌種ともにスピロヘータの活発な運動性が認められた。当院の直接塗抹で判定した腸管スピロヘータ症の一覧を示した (Table 1)。

### 2. *Brachyspira* 属菌の培養所見

初代培養では *B. pilosicoli* は嫌気培養 4~7 日目に弱い β 溶血を示すフィルム様コロニーを形成し, *B. aalborgi* は嫌気培養 10~14 日目以降にフィルム様コロニーの形成を確認することができたが, *B. aalborgi* は *B. pilosicoli* に比べ発育が悪く, β 溶血も認めないか非常に弱いため, 分離には難渋した。継代培養では *B. pilosicoli* は培養 4 日目からフィルム様のコロニーを形成し, *B. aalborgi* は培養 10 日目からフィルム様のコロニーを形成した (Fig. 2)。発育速度の違いはあるものの, 両菌種のコロニーはほぼ同様であった。メンブレンフィルターをもちいた培養は 2 例でおこな

い, *B. aalborgi* を 2 例ともに分離することができた。

### 3. 生化学的性状

Rap ID ANAII の一次判定をもちいた性状のパターンでは *B. pilosicoli* は 3 タイプに分かれた。すなわち, α-glucosidase (α-GLU) 陽性, α-galactosidase (α-GAL) 陰性となる株, α-GLU 陰性, α-GAL 陽性となる株, α-GLU, α-GAL ともに陽性となる株を認めた。*B. aalborgi* は α-GLU, α-GAL ともに陰性となり *B. pilosicoli* とは異なるパターンを示した (Fig. 3)。

また, α-arabinosidase (α-ARA), β-galactosidase (β-GAL) は *B. pilosicoli*, *B. aalborgi* すべての株で陽性を示し, urease (URE), β-disaccharidase (BLTS), β-glucosidase (β-GLU), α-fucosidase (α-FUC), N-acetyl-β-glucosaminidase (β-NAG), phosphatase (PO4) は, *B. pilosicoli*, *B. aalborgi* すべての株で陰性を示した (Table 2)。Rap ID ANAII の一次判定をもちいた性状の確認は 3 回実施し, 同様の再現性が得られた。試薬添加後の二次判定はすべての菌株でグリシン (GLY), アルギニン (ARG), セリン (SER) のウェルでわずかな色調の変化を認めたが明瞭ではなく, 判定者によっては陰性となるため, 二次判定は検討から除外し, 同定コードは参考値とした。

### 4. 病理組織標本における偽刷子縁の検討

微生物検査目的に提出された腸管洗浄液の直接塗抹グラム染色で多数のスピロヘータを認めた 19 例中, 組織診目的に大腸の生検をおこなっていたのは 17 例で, そのうち病理組織で偽刷子縁が確認されたのは 13 例 (76.5%) であった。偽刷子縁の長さは 7 μm 前後のロングタイプと 3~4 μm のショートタイプに分けることができた (Fig. 4)。*Brachyspira* 属菌の分離同定と生検組織における偽刷子縁の両者が確認された例では, *B. pilosicoli* を分離した 3 例はロングタイプの偽刷子縁, *B. aalborgi* を分離した 2 例はショートタイプの偽刷子縁を認め, 菌種特異的であった。

### 5. 薬剤感受性

*B. pilosicoli* 4 株における薬剤感受性試験の結果は (Table 3) に示した。PCG, ABPC の MIC はいずれも >1 μg/mL を示したが, CTX, CTRX, MEPM, MINO, MNZ に低い MIC を示した。カルバペネム系薬は MEPM ≤0.25 μg/mL に比較し IPM は 1~2 μg/mL とやや高値を示した。ニトロセフィン法による β-ラクタマーゼ試験は陽性であった。

### 6. *bla*<sub>OXA-63</sub> の検出

解析した 3 菌株ともに約 800 bp の増幅産物が得られ, OXA-63 バリエーションの EU086833.1 *B. pilosicoli* OXA-136 gene と 99% 一致した。Isolate 2 は未解析で

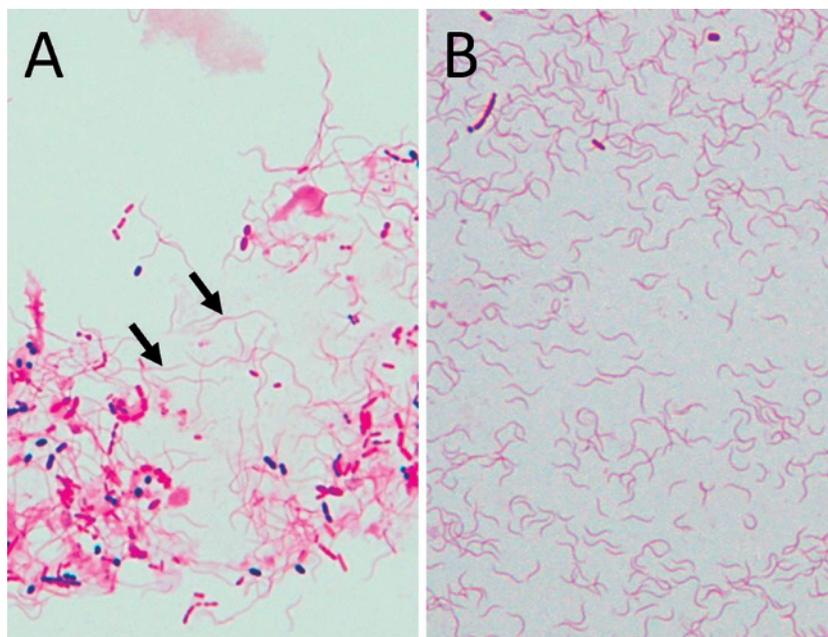


Fig. 1. Gram stain of *Brachyspira* spp. from colonic lavage fluid ( $\times 1000$ ).  
(A): *B. pilosicoli* (case 4), (B): *B. aalborgi* (case18).

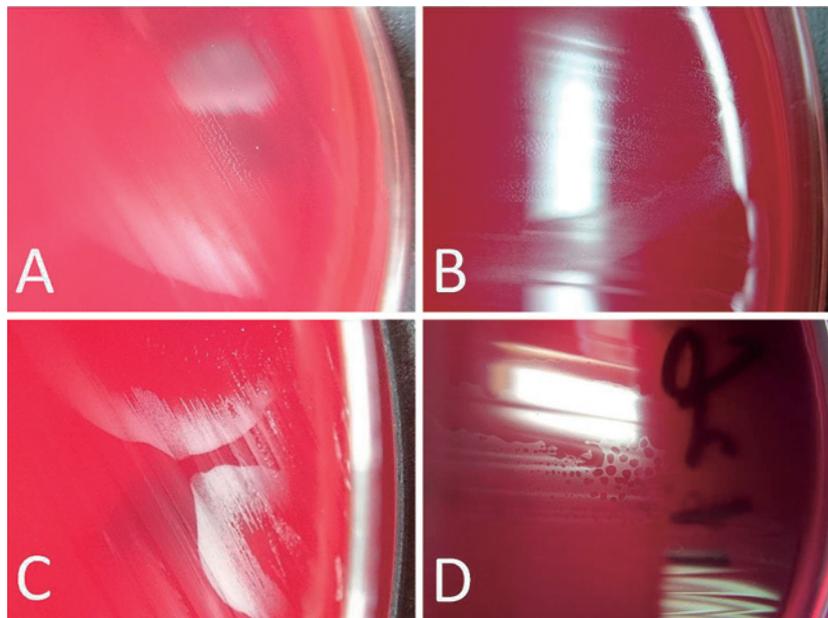


Fig. 2. Film-like colonies of *Brachyspira* spp. grown on sheep blood agar. *B. pilosicoli*: 4 days (A), 6 days (B), *B. aalborgi*: 10 days (C), 3 weeks (D), 37°C, anaerobic condition.

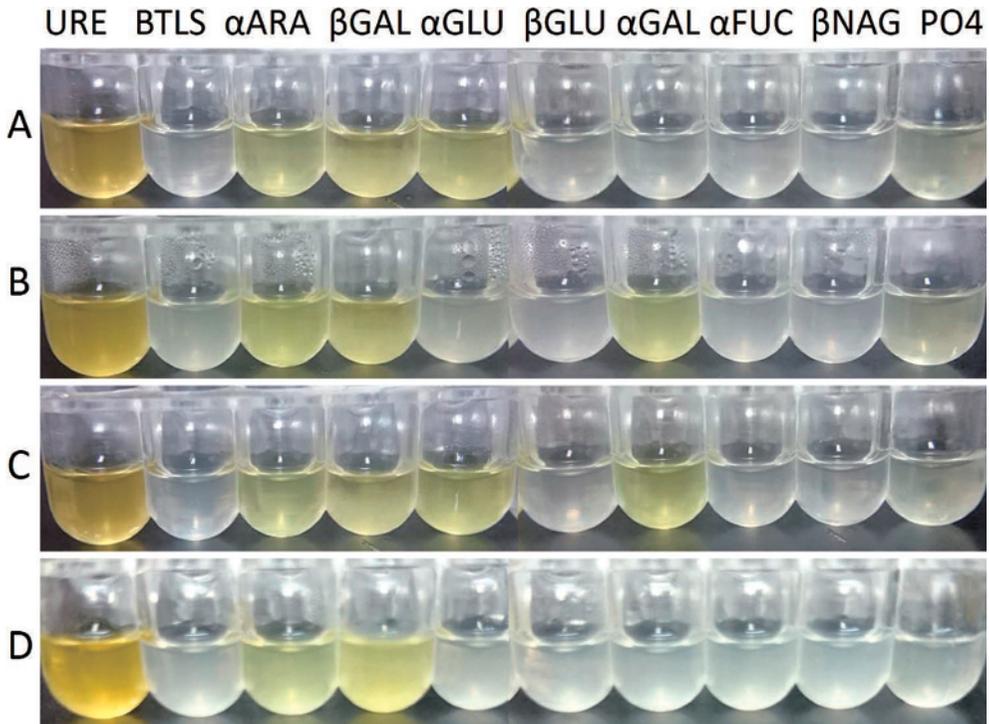


Fig. 3. (A): *B. pilosicoli* (Isolate 1, 5), (B): *B. pilosicoli* (Isolate 2, 4), (C): *B. pilosicoli* (Isolate 6), (D): *B. aalborgi* (Isolate 7, 17, 18, 19).

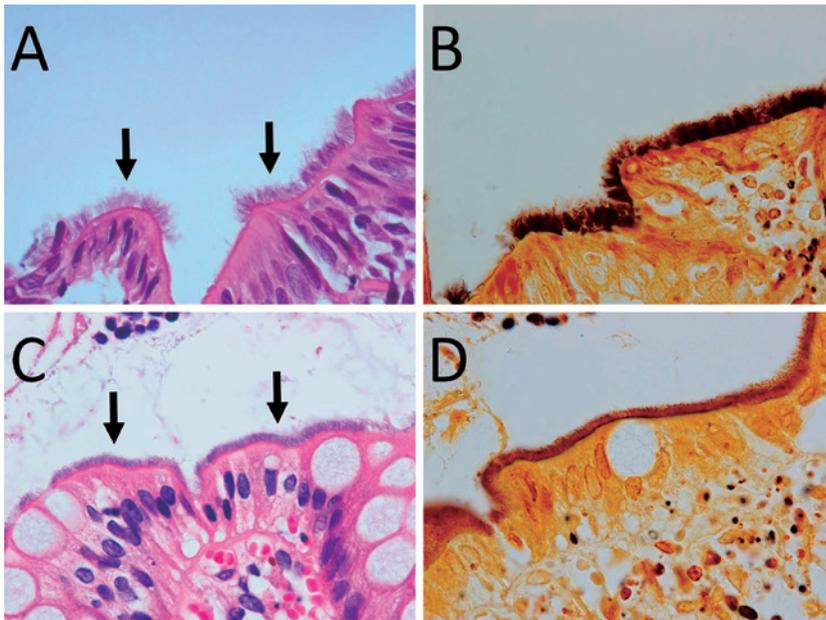


Fig. 4. (A, B): Long type false brush border of *B. pilosicoli* (case 5). (C, D): Short type false brush border of *B. aalborgi* (case 7). (A, C): Hematoxylin and Eosin stain ( $\times 1000$ ). (B, D): Warthin-starry stain ( $\times 1000$ ).

Table 1. 19 cases intestinal spirochetosis

Case	Age	Sex	Basal disease	Symptom	Identification of 16S rDNA	False brush border	Average and Standard deviation of length ( $\mu\text{m}$ )	Macroscopic finding	Pathological Microscopic finding	Remarks
1	38	M	Amebic colitis	Mucous and bloody stool	<i>B. pilosicoli</i> (Isolate 1)	Long	6.79 $\pm$ 0.89	Erosion Ulcer	Regenerative mucosa Lymphoid follicle	pet; miniature swine travel; southeast Asia
2	61	M	Amebic colitis Giardiasis	Melena	<i>B. pilosicoli</i> (Isolate 2)	Not found	—	Ulcer	—	pet; cat
3	69	F	Ulcerative colitis	Melena	Not isolated	Short	3.59 $\pm$ 1.12	Redness	Regenerative mucosa	—
4	55	M	Diabetes mellitus Diverticular disease	Melena	<i>B. pilosicoli</i> (Isolate 4)	Not found	—	Ulcer Redness	—	pet; dog
5	32	M	None	Diarrhea Melena Abdominal pain	<i>B. pilosicoli</i> (Isolate 5)	Long	7.52 $\pm$ 1.17	Redness Apthae like	Erosion Regenerative mucosa Lymphoid follicle	travel; Hawaii
6	45	M	Amebic colitis Giardiasis	Diarrhea	<i>B. pilosicoli</i> (Isolate 6)	Long	7.12 $\pm$ 0.67	Ulcer	Hyperplastic polyp	Sexual activity; commercial sex shop pet; dog
7	75	M	Diverticular disease	Melena	<i>B. aalborgi</i> (Isolate 7)	Short	4.12 $\pm$ 0.46	Redness Ulcer	Lymphoid follicle Regenerative mucosa	—
8	61	M	Chronic hepatitis C Colon polyp	None	Not isolated	Short	4.13 $\pm$ 0.70	Ulcer Polyp	Regenerative mucosa	—
9	44	M	Amebic colitis	Melena	Not isolated	Positive (type unknown)	ND	Redness	Lymphoid follicle	Sexual activity; commercial sex shop
10	41	M	Ulcerative colitis	Melena	Not isolated	Short	3.15 $\pm$ 0.60	Lymphoid follicle Redness	Chronic inflammation Lymphoid follicle	—
11	37	M	Ulcerative colitis	Melena	Not isolated	Not found	—	Apthae like Redness	—	—
12	50	F	Chronic colitis	None	Not isolated	Short	4.18 $\pm$ 0.86	Apthae like Lymphoid follicle	Regenerative mucosa Lymphoid follicle	<i>A. hydrophila</i> culture positive
13	31	M	Ulcerative colitis	Mucous and bloody stool	Not isolated	Short	3.84 $\pm$ 0.61	Redness	Inflammation Regenerative mucosa Erosion	—
14	31	M	None	Melena	Not isolated	Short	2.95 $\pm$ 0.73	Interrupted (poor study)	Chronic inflammation	—
15	79	M	Amebic colitis Diverticular disease	Bloody stool	Not isolated	No biopsy	—	Erosion Diverticula	—	—
16	27	M	Ulcerative colitis	Bloody stool Abdominal pain	Not isolated	Positive (type unknown)	ND	Redness Erosion	Regenerative mucosa Erosion	—
17	45	M	Ileocecal inflammation	Fecal occult blood	<i>B. aalborgi</i> (Isolate 17)	Not found	—	Normal	—	—
18	47	M	Ulcerative colitis	None	<i>B. aalborgi</i> (Isolate 18)	No biopsy	—	Normal	—	—
19	75	M	Diabetes mellitus Chronic hepatitis C	None	<i>B. aalborgi</i> (Isolate 19)	Short	4.49 $\pm$ 0.49	Raised lesion	Inflammatoly cell infiltration	—

M; male, F; female, ND; not determined

あるが同様の感受性パターンであり, *bla*<sub>OXA-136</sub> の保有が疑われた。

## 考 察

腸管スピロヘータ症は *Brachyspira* 属菌を起因菌とする人獣共通感染症であり, 大腸粘膜上皮に菌体の

Table 2. Biochemical characteristics of *B. pilosicoli* and *B. aalborgi*

	<i>B. pilosicoli</i> Isolate 1, 5	<i>B. pilosicoli</i> Isolate 2, 4	<i>B. pilosicoli</i> Isolate 6	<i>B. pilosicoli</i> <sup>23)</sup> ATCC 51139 P43 <sup>T</sup> Swine	<i>B. aalborgi</i> Isolate 7, 17, 18, 19	<i>B. aalborgi</i> <sup>23)</sup> ATCC 43994 513A <sup>T</sup> Human
Growth rate	Rapid	Rapid	Rapid		Slow	
Colony morphology	Film-like	Film-like	Film-like		Film-like	
HIP	+	+	+	+	Weak	Weak
URE	-	-	-		-	
BLTS	-	-	-		-	
α-ARA	+	+	+		+	
β-GAL	+	+	+	+	+	+
α-GLU	+	-	+	-	-	-
β-GLU	-	-	-	-	-	-
α-GAL	-	+	+	+	-	-
α-FUC	-	-	-	-	-	-
β-NAG	-	-	-	-	-	-
PO4	-	-	-		-	
Rap ID ANA II code*	430441	411441	431441		410441	

HIP; Hippurate hydrolysis, URE; urease, BLTS; β-disaccharidase, α-ARA; α-arabinosidase, β-GAL; β-galactosidase, α-GLU; α-glucosidase, β-GLU; β-glucosidase, α-GAL; α-galactosidase, α-FUC; α-fucosidase, β-NAG; N-acetyl-β-glucosaminidase, PO4; phosphatase, Rapid; >4days ( ≤1 week ), Slow; >10days ( ≤2 ~ 3 weeks )

\*Reference value

一端を付着させた *Brachyspira* 属菌が林立して層をなしている状態といえる。これは病理組織の HE 染色で好塩基性の毛羽立ちとして観察されるが、通常の病理組織診断では注意深い観察が必要で見逃されやすい。本邦では 1998 年に Nakamura ら<sup>10)</sup>が最初の報告をして以来まれな疾患とされてきたが、近年生検組織標本からの症例の蓄積が著しい<sup>11)12)</sup>。腸管スピロヘータ症の頻度は発展途上国で 11.4~64.3%、北米や西欧では 1.1~5% とされているが<sup>13)</sup>、イタリアでは 12.1% という比較的高い頻度で報告されている<sup>14)</sup>。また、男性同性愛者では高率 (20.6~62.5%) であるとされており<sup>15)</sup>、腸管スピロヘータ症であることをきっかけとして Human Immunodeficiency Virus (HIV) 感染を疑い検出した症例報告もある<sup>15)</sup>。日本の 4,254 人の患者における 5,265 の生検材料からの後ろ向き研究では腸管スピロヘータ症の発生頻度は欧米諸国と同様に 1.7% であったが、HIV 陽性者では 5.5% であった<sup>16)</sup>。北日本における病理組織標本に基づく 114 例の腸管スピロヘータ症の検討では男女比が 13.3 : 1 で男性に多く、腹痛や下痢、血便、便秘などの排便異常を訴えていたのは 28.7% でほとんどの患者は症状を示さず、健康診断で検出された便潜血が下部消化管内視鏡検査実施の主な理由だったとしている<sup>11)</sup>。当院の直接塗抹から腸管スピロヘータ症と判定した例は下部消化管内視

鏡の際に提出された培養検体の 3.6% (19 例) に認め、そのうち 17 例が男性であり、アメーバ性大腸炎や潰瘍性大腸炎を併存疾患とする患者に多く認められた。特にアメーバ性大腸炎の合併が 5 例、さらに 2 例はランブル鞭毛虫症も併発であったことは微生物検査を進める上で重要であり、腸管洗浄液からスピロヘータを検出した場合には原虫感染症も念頭に置く必要があると考える。一般的に腸管スピロヘータ症における炎症は弱いとされ、腸管にびらんや潰瘍形成などの変化が認められればアメーバ性大腸炎など別の併存疾患を考えなければならない。

腸管洗浄液からの *Brachyspira* 属菌の分離はその発育の遅さと他の腸管内常在細菌の存在により選択分離培地等を用意できない一般の検査室では困難になる場合が多い。当院においては塗抹で多数のスピロヘータを認めた 19 例のうち、培養で検出できたのは 9 例に過ぎない。Ogata ら<sup>17)</sup>は spectinomycin を 400 μg/mL 加えた trypticase soy 5% ヒツジ血液寒天培地を使用し、生検組織材料を培養することで細胞診と組織診でスピロヘータを認めた全ての症例で培養に成功したとしている。検討数は少ないもののメンブレンフィルターをもちいた培養法は簡便であり、実施した 2 例ともに *B. aalborgi* をそれぞれ検出できたため分離法として期待されるが、一部の *Helicobacter* spp. や *Cam-*

Table 3. Antimicrobial susceptibility results of *B. pilosicoli*

Class D $\beta$ -lactamase gene	Isolate 2	Isolate 4	Isolate 5	Isolate 6
	Unanalyzed	<i>bla</i> OXA-136	<i>bla</i> OXA-136	<i>bla</i> OXA-136
Antimicrobial agent				
PCG	>1	>1	>1	>1
ABPC	>1	>1	>1	>1
ABPC/SBT	16/8	16/8	8/4	16/8
PIPC/TAZ	$\leq 16/4$	$\leq 16/4$	$\leq 16/4$	$\leq 16/4$
AMPC/CVA	4/2	$\leq 2/1$	$\leq 2/1$	4/2
CZX	$\leq 2$	$\leq 2$	$\leq 2$	$\leq 2$
CAZ	8	8	$\leq 1$	8
CTX	0.25	0.25	0.25	0.5
CTRX	0.25	0.25	0.25	0.25
CFPM	4	4	8	4
C/S	$\leq 8/8$	$\leq 8/8$	$\leq 8/8$	$\leq 8/8$
CMZ	8	16	4	8
FMOX	4	4	2	4
IPM	2	2	1	2
MEPM	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$
EM	2	2	4	>32
CAM	2	2	1	>32
CLDM	2	>4	0.5	4
MINO	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	0.5
FOM	32	32	16	16
LVFX	4	4	2	4
CPFX	4	4	2	4
ST	$\leq 2$	$\leq 2$	$\leq 2$	$\leq 2$
CP	2	1	$\leq 0.5$	1
MNZ	0.094	0.032	$\leq 0.016$	$\leq 0.016$

MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )

*pylobacter* spp.なども同様にメンブレンフィルターを通過すると考えられるため、必ずフィルム様コロニーをグラム染色で菌の形態を確認する必要があると考える。

Rap ID ANAII の一次判定をもちいた性状のパターンでは  $\alpha$ -ARA,  $\beta$ -GAL は *B. pilosicoli*, *B. aalborgi* すべての株で陽性を示し, URE, BLTS,  $\beta$ -GLU,  $\alpha$ -FUC,  $\beta$ -NAG, PO4 は, *B. pilosicoli*, *B. aalborgi* すべての株で陰性を示した。両者の鑑別点は検討菌株数が少ないものの, *B. pilosicoli* は  $\alpha$ -GAL,  $\alpha$ -GLU の一方, あるいは両方が陽性を示し,  $\alpha$ -GAL,  $\alpha$ -GLU の両方が陰性を呈するものは *B. aalborgi* であると思われた。動物由来 *Brachyspira* spp. と *B. pilosicoli* の鑑別には  $\beta$ -GLU 陰性と HIP 陽性が必須<sup>18)</sup>としているが, *B. aalborgi* も  $\beta$ -GLU 陰性, HIP 陽性であるため, ヒト由来 *Brachyspira* 属菌の *B. aalborgi* と *B. pilosicoli* は

菌体長, 発育速度を加味し,  $\alpha$ -GAL,  $\alpha$ -GLU の性状を見ることで簡易的に鑑別可能と思われる。

スピロヘータ直接塗抹陽性 19 例中, 大腸生検されていたのは 17 例で, そのうち偽刷子縁が認められたのは 13 例 (76.5%) であった。*Brachyspira* 属菌の分離と偽刷子縁の両者が確認された例では *B. pilosicoli* の 3 例は 7  $\mu\text{m}$  程のロングタイプ, *B. aalborgi* の 2 例は 4  $\mu\text{m}$  程のショートタイプの偽刷子縁を認めた。本邦の腸管スピロヘータ症の報告ではパラフィン包埋切片から抽出した DNA からの PCR で *B. aalborgi* が 78~80%, *B. pilosicoli* が 14~19% の割合で検出されており, 3~6% に *B. aalborgi* と *B. pilosicoli* の両者が検出され重複感染が示唆されている<sup>11)16)</sup>。また, 偽刷子縁の長さは *B. aalborgi* が平均 3.8  $\mu\text{m}$ , *B. pilosicoli* が平均 5.5  $\mu\text{m}$  であったとされている<sup>16)</sup>。このことから当院の分離培養不能であった症例の多くはショー

トタイプの偽刷子縁が認められており、培養困難な *B. aalborgi* であった可能性が示唆される。

*B. pilosicoli* 4株についておこなった薬剤感受性試験成績では PCG, ABPC の MIC はいずれも  $>1 \mu\text{g}/\text{mL}$  を示したが、CTX, CTRX, MEPM, MINO, MNZ に低い MIC を示し、ニトロセフィン法による  $\beta$ -ラクタマーゼ試験陽性であった。これはこれまでの報告<sup>8)9)19)</sup>を支持するものであった。ニトロセフィン法による  $\beta$ -ラクタマーゼ試験陽性でペニシリン系薬に耐性を示す *B. pilosicoli* からはこれまでクラス A $\beta$ -ラクタマーゼは見つかっておらず、フランス人由来株から OXA-63 のクラス D $\beta$ -ラクタマーゼが見つかっている<sup>20)</sup>。これは oxacillin, PCG, ABPC などのペニシリン系薬を加水分解するが CTX, CAZ, CFPM, IPM, AZT を加水分解せず、クラブラン酸、タゾバクタム、スルバクタムにより強く阻害されるとしている。また、オーストラリアでは OXA-63 バリエーションの OXA-137 がアボリジニの人々から、OXA-136 が男性同性愛者、アボリジニ、ブタから見つかっている<sup>21)</sup>。当院分離株においても  $\beta$ -ラクタマーゼ試験が陽性を示し、同様の OXA 型  $\beta$ -ラクタマーゼの存在が疑われた。解析が可能であった3菌株において検出をおこなったところ OXA-136 であることが明らかとなり、本邦のペニシリン系薬に耐性を示す *B. pilosicoli* は OXA-136 のクラス D $\beta$ -ラクタマーゼ産生株が拡散している可能性が示唆された。解析ができなかった Isolate 2 においても同様の感受性パターンを示しており、*bla*<sub>OXA-136</sub> を保有していた可能性が高いと考えられた。

*B. pilosicoli* は HIV 感染者などの免疫抑制状態に日和見病原菌として水様性下痢を起こす可能性があるが<sup>16)22)</sup>、*B. aalborgi* は一般的に病原性は無いという認識で一致していると思われる。当院の腸管スピロヘータ症の臨床症状は下血、血便、下痢、腹痛などであったが、そのほとんどは併存疾患から来るものと思われた。しかし、明らかな免疫抑制状態ではなく、併存疾患で説明できない *B. pilosicoli* のみで下痢、下血、腹痛を起こしたと思われた1例 (case 5) も認めている。*Brachyspira* のみで消化器症状の原因と思われる場合には、除菌治療の対象になり得るが、実際に検出されても、経過観察のみで治療されないことも多い。*Brachyspira* 属菌のみで強い炎症が認められる場合には他の併存疾患を考え、再評価することも重要である。また、*B. pilosicoli* と原虫感染症の合併の多さは STD としての側面を認識させるものであり、*B. pilosicoli* の臨床的意義を明らかにするためにも、両菌種の

同定は必要と考える。

*Brachyspira* 属菌の腸粘膜上皮への定着には正常な微絨毛が必要といわれており<sup>22)</sup>、炎症の強い組織では微絨毛構造が変化し感染が成立せず、大腸生検されても偽刷子縁が認められないことが考えられる。また、内視鏡をおこない炎症所見がないか極めて弱い場合には、大腸生検が実施されずに診断の機会を失うことも考えられる。下部消化管内視鏡検査の際に腸管洗浄液を採取して *Brachyspira* 属菌をグラム染色にて検出することにより腸管スピロヘータ症の診断を迅速にし、検出頻度の上昇に繋がるものと考えられる。

本論文の要旨は第26回日本臨床微生物学会総会 (2015年) において発表した。

## 文 献

- 1) Hovind-Hougen, K., A. Birch-Andersen, R. Henrik-Nielsen, et al. 1982. Intestinal spirochetosis: morphological characterization and cultivation of the spirochete *Brachyspira aalborgi* gen. nov., sp. nov. J Clin Microbiol 16: 1127-1136.
- 2) Harand, W.A., F.D. Lee. 1967. Intestinal spirochaetosis. Br Med J 3: 718-719.
- 3) Smith, J.L. 2005. Clonic spirochetosis in animals and humans. J Food Prot 68: 1525-1534.
- 4) Calderaro, A., S. Bommezzadri, C. Gorrini, et al. 2007. Infective colitis associated with human intestinal spirochetosis. J Gastroenterol Hepatol 22: 1772-1779.
- 5) Peghini, P.L., J.G. Guccion, A. Sharma. 2000. Improvement for chronic diarrhea after treatment for intestinal spirochetosis. Dig Dis Sci 45: 1006-1010.
- 6) Gad, A., R. Willen, K. Furugard, et al. 1977. Intestinal spirochaetosis as a cause of longstanding diarrhea. Ups. J Med Sci 82: 49-54.
- 7) 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.
- 8) 千田澄江, 明壁 均, 大楠清文, 他. 2010. 嫌気性スピロヘータ *Brachyspira pilosicoli* による菌血症の1例. 日臨微誌 20: 44-49.
- 9) 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.
- 10) Nakamura, S, T Kuroda, T Sugai, et al. 1998. The first reported case of intestinal spirochaetosis in Japan. Pathol Int 48: 58-62.

- 11) Sato, H, S Nakamura, W Habano, et al. 2010. Human intestinal spirochaetosis in northern Japan. *J Med Microbiol* 59: 791-796.
- 12) 田邊 寛, 岩下明德, 原岡誠司, 他. 腸管スピロヘータ症. *胃と腸* 43: 1670-1679.
- 13) Koerner, M, JO Gebbers. 2003. Clinical significance of human intestinal spirochetosis- a morphologic approach. *Infection* 31: 341-349.
- 14) Peruzzi, S, C Gorrini, G Piccolo, et al. 2007. Human intestinal spirochetosis in Parma: a focus on a selected population during 2002-2005. *Acta Biomed* 78: 128-132.
- 15) Higashiyama, M, S Ogata, Y Adachi, et al. 2009. Human intestinal spirochetosis accompanied by human immunodeficiency virus infection: a case report. *Acta Med Okayama* 63: 217-221.
- 16) Tateishi, Y, M Takahashi, S Horiguchi, et al. 2015. Clinicopathologic study of intestinal spirochetosis in Japan with special reference to human immunodeficiency virus infection status and species types: analysis of 5265 consecutive colorectal biopsies. *BMC Infectious Disease* 15: 13. 1-5.
- 17) Ogata, S, M Higashiyama, Y Adachi, et al. 2010. Imprint cytology detects floating *Brachyspira* in human intestinal spirochetosis. *Human Pathology* 41: 249-254.
- 18) De Smet, K.A., D.E. Worth, S.P. Barrett. 1998. Variation amongst human isolates of *Brachyspira* (*Serpulina*) *pilosicoli* based on biochemical characterization and 16S rRNA gene sequencing. *Int J Sys Bacteriol* 48: 1257-1263.
- 19) 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.
- 20) Meziane-Cherif, D., T. Lambert, M. Dupechez, et al. 2008. Genetic and biochemical characterization of OXA-63, a new class D  $\beta$ -lactamase from *Brachyspira pilosicoli* BM4442. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1264-1268.
- 21) Mortimer-Jones, S.M., N.D. Phillips, T. La, et al. 2008. Pnicillin resistance in the intestinal spirochaete *Brachyspira pilosicoli* associated with OXA-136 and OXA-137, two new variants of the class D  $\beta$ -lactamase OXA-63. *J Med Microbiol* 57: 1122-1128.
- 22) Tanahashi, J, T Daa, A Gamachi, et al. 2008. Human intestinal spirochetosis in Japan; its incidence, clinicopathologic features, and genotypic identification. *Modern Pathology* 21: 76-84.
- 23) Kraaz, D, 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.

## Identification and characterization of *Brachyspira aalborgi* and *Brachyspira pilosicoli* isolated from humans

Yosuke Tanaka<sup>1)</sup>, Yuko Matsumoto<sup>2)</sup>, Naoki Shimada<sup>3)</sup>, Momoko Anzai<sup>1)</sup>,  
Tatsuya Ohno<sup>1)</sup>, Nao Komatsu<sup>1)</sup>, Masae Endo<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Clinical Laboratory, St. Marianna University School of Medicine, Yokohama City Seibu Hospital

<sup>2)</sup>Yokohama City Institute of Public Health

<sup>3)</sup>Department of Diagnostic Pathology, St. Marianna University School of Medicine, Yokohama City Seibu Hospital

Human intestinal spirochetosis (HIS) is a disease caused by the gram-negative bacteria *Brachyspira aalborgi* and *Brachyspira pilosicoli*. *B. aalborgi* causes spirochetosis in only humans and other primates and is considered to be a harmless commensal. *B. pilosicoli*, on the other hand, is recognized as a pathogen in various animals, including pigs, dogs, and chickens; its clinical significance in HIS is controversial. Typically, HIS is diagnosed by the presence of a false brush border on colonic biopsy. *B. pilosicoli* is observed to be longer than *B. aalborgi*. The aim of this study was to improve the speed and frequency of detection of the *Brachyspira* species (spp.). We performed direct-smear Gram staining on colonic lavage fluid from 526 colonoscopy samples. Nineteen samples tested positive for *Brachyspira*. For the samples that tested positive, the age of patients ranged from 27 to 79 y (mean, 46.9 y), and they were predominantly male (17 of 19 patients). Following anaerobic culture on sheep blood agar, *B. pilosicoli* was isolated from five samples and *B. aalborgi* was isolated from four samples. The isolated bacteria were identified by 16S-rDNA sequencing. Most of the cases of HIS were associated with ulcerative colitis and diverticular disease. *B. pilosicoli* was associated with amebic colitis at a high frequency of 3 out of 5 cases. The *Brachyspira* spp. could not be isolated in approximately half of the patients (10 of 19); however, they all had a short false brush border on biopsy. Therefore, it was speculated that the isolation of *B. aalborgi* would be difficult. Of the direct-smear Gram staining positive patients, 17 underwent biopsy, and a false brush border was observed in 13 of the samples. We assumed that in order to increase the detection speed and frequency of *Brachyspira* spp. through direct-smear Gram staining, positive patients should be re-evaluated for other complications. Antimicrobial susceptibility testing and nitrocefin disk analysis revealed that *B. pilosicoli* strains were resistant to penicillin and possessed  $\beta$ -lactamase activity. The *B. pilosicoli* strains were found to possess OXA-136, a variant of the class D  $\beta$ -lactamase OXA-63. This finding was consistent with penicillin resistance in *B. pilosicoli* strains being attributed to class D  $\beta$ -lactamase OXA-136.