

[症例報告]

血液培養ボトル液を検査材料とした直接的 16S rDNA 塩基配列決定で
Helicobacter fennelliae が検出された腎移植後敗血症の 1 症例

前原千佳子¹⁾・吉澤定子²⁾・福井悠人²⁾・青木弘太郎³⁾
吉住あゆみ³⁾・村上日奈子¹⁾・安井久美子¹⁾・福澤 滋¹⁾
榎園恭子¹⁾・今井和花¹⁾・佐々木雅一¹⁾・石井良和³⁾
館田一博¹⁾³⁾・柳澤健人⁴⁾・酒井 謙⁴⁾・相川 厚⁴⁾
¹⁾ 東邦大学医療センター大森病院臨床検査部
²⁾ 東邦大学医療センター大森病院総合診療急病センター感染症科
³⁾ 東邦大学医学部微生物・感染症学講座
⁴⁾ 東邦大学医療センター大森病院腎センター

(平成 27 年 5 月 21 日受付, 平成 27 年 8 月 19 日受理)

50 歳男性。多発性嚢胞腎で生体腎移植後、免疫抑制剤を内服している患者である。発熱・悪寒・上部腹痛があり当院入院となった。入院時に実施した血液培養でグラム陰性らせん状桿菌が検出され、生化学的同定検査で *Helicobacter fennelliae* と同定された。そこで、迅速同定の可能性について検討することを目的として、遺伝子学的同定検査を試みた。遺伝子学的同定検査では、血液培養ボトルの培養液を用いた 16SrDNA 塩基配列の決定から、*H. fennelliae* と 99.87% (EzTaxon) の相同性を示したので、*H. fennelliae* と同定された。今回、我々の検討では、血液培養でグラム陰性らせん状桿菌が判明した時点で、陽性となった血液培養ボトルの培養液から 16SrDNA 塩基配列解析を実施することで、より早期に菌種が判明し、適切な加療に貢献する可能性が示唆された。

Key words: *Helicobacter fennelliae*, 敗血症, 遺伝子同定, 16S rDNA

序 文

Helicobacter 属菌による敗血症は *Helicobacter cinaedi* が起因菌であることが最も多く、しばしば免疫不全宿主において発症する。*H. cinaedi* 以外に血液から分離されるらせん菌として *Helicobacter fennelliae* があり、本菌は寒天培地上では明瞭なコロニーを形成せずフィルム状に生育するため、その発育を確認しにくい問題がある。近年、16S rDNA 塩基配列などを対象とした遺伝子学的な同定法により、迅速な菌種同定が可能となった。今回我々は、迅速同定が可能で

あるかどうか検討することを目的として、生化学的同定検査後の血液培養陽性ボトル培養液の残余検体を用いて遺伝子学的同定検査を施行し、両者の同定結果を比較した。そこで *H. fennelliae* と同定された敗血症症例を経験したので報告する。

症 例

患者：50 歳男性。
主訴：発熱、悪寒、上腹部痛。
既往歴：多発性嚢胞腎。
家族歴：特記事項なし。

現病歴：常染色体優勢多発性嚢胞腎で 5 年前に生体腎移植が施行され、免疫抑制剤を内服中の患者である。1 月 4 日から発熱、悪寒、上腹部痛を認め、症状改善が認められないため、1 月 6 日に当院を受診したところ、WBC15500/μL、CRP11.1 mg/dL とともに高値であったため、精査加療目的で同日入院となっ

著者連絡先：(〒143-8541) 東京都大田区大森西 6-11-1
東邦大学医療センター大森病院臨床検査部
前原千佳子
TEL: 03-3762-4151 (内線 3442)
FAX: 03-5763-6569
E-mail: momon@med.toho-u.ac.jp

表1. 入院時検査所見

【生化学】		【血算】		【尿一般定性】		【微生物検査】
CRP	11.1 mg/dL	WBC	15.5×10 ³ /μL	pH	6.0	尿・喀痰・便・腹水：培養陰性*
Na	131 mM	RBC	4.91×10 ⁶ /μL	糖	(-)	血液：培養陽性
K	4.1 mM	Hb	14.5 g/dL	蛋白	(+)	(グラム陰性らせん状桿菌)
Cl	101 mM	PLT	220×10 ³ /μL	潜血	(-)	
Ca	9.5 mg/dL			アセトン	(-)	
IP	2.2 mg/dL			ビリルビン	(-)	
T-P	7.7 g/dL			ウロビリノゲン	(±)	
ALB	3.7 g/dL			比重	1.030	
UN	14 mg/dL			白血球	(-)	
Cr	1.13 mg/dL			亜硝酸塩	(-)	
eGFR	55.2 mL/min/1.73 m ²					
AST	46 IU/L			【尿沈渣】		
ALT	33 IU/L			赤血球	陰性	
LD	318 IU/L			白血球	陰性	
T-BIL	2.2 mg/dL					
ALP	728 IU/L					
γ-GT	369 IU/L					
ChE	223 IU/L					
AMY	50 IU/L					
CK	32 IU/L					
PCT	2.66 ng/mL					
HbA1c	5.2 %					

*便と腹水の培養陰性とは、*H. fennelliae* の検出には適さない通常の培養方法において陰性ということである

た。

常用薬：タクロリムス 1 mg/分1, ミコフェノール酸モフェチル 1000 mg/分1, アスピリン 100 mg/分1, ラフチジン 2 T/分2

動物接触および飼育歴：なし

入院時身体所見：体温 37.8℃, 血圧 134/84 mmHg, 心拍数 120 回/分整, 意識清明。腹部は軟で腸蠕動音は正常であったが腹部膨満認め, 右上腹部圧痛を認めた。その他に特記すべき所見なし。

入院時検査所見：表1および図1に示した。

臨床経過：腹部CT所見では、肝嚢胞のdensityの濃淡を認め、また、腹水貯留がみられた(図1)。多発性嚢胞腎に見られやすい肝嚢胞における感染や腹膜炎などが発熱の原因である可能性を考え、血液培養採取後、1月6日より cefepime (CFPM) 2 g/分2 を投与開始した(図2)。組織移行性を考慮して1月8日より、ciprofloxacin (CPFX) 600 mg/分2 に変更した後、一度解熱したが、1月16日に再び発熱した。1月12日に、1月6日に採取した血液培養が陽性となり、鏡検によりグラム陰性らせん状桿菌が観察され

た。基礎疾患や血液塗抹染色所見から *Helicobacter* 属菌による敗血症が疑われた(図3)。炎症反応は高値が持続したため、1月16日より meropenem (MEPM) 3 g/分3 を追加投与した。その後解熱し、炎症反応も改善傾向となり、経静脈的抗菌薬投与期間が24日間と3週間以上経過したため、1月29日には amoxicillin (AMPC) 1500 mg/分3 の経口投与に変更し、治療は2月17日に終了した。

その後2月1日に退院するまで再発はみられなかった。1月12日に陽性となった血液培養ボトルより分離培養を行い、1月18日に分離培地に発育してきた菌株は、1月30日に生化学的同定検査により、菌名が *H. fennelliae* と同定され、薬剤感受性検査結果は2月26日に判明した(表2)。

細菌学的検査

血液培養検査は、入院時に92F好気用レズンボトル(日本BD)、93F嫌気用レズンボトル(日本BD)を1セットとし、自動血液培養装置 BACTEC9240(日本BD)で2セット実施した。血液培養開始6日目に

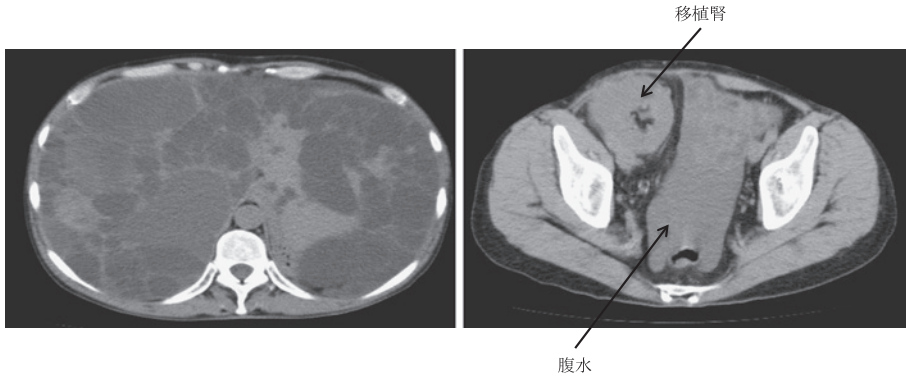


図1. 腹部単純 CT 画像および所見

所見：肝内には嚢胞が多発。両腎は摘出後。
 一部の嚢胞内の濃度が高く、嚢胞内感染や出血性嚢胞の可能性あり。
 肝周囲・骨盤内に腹水あり。
 右腸骨窩に移植腎あり。

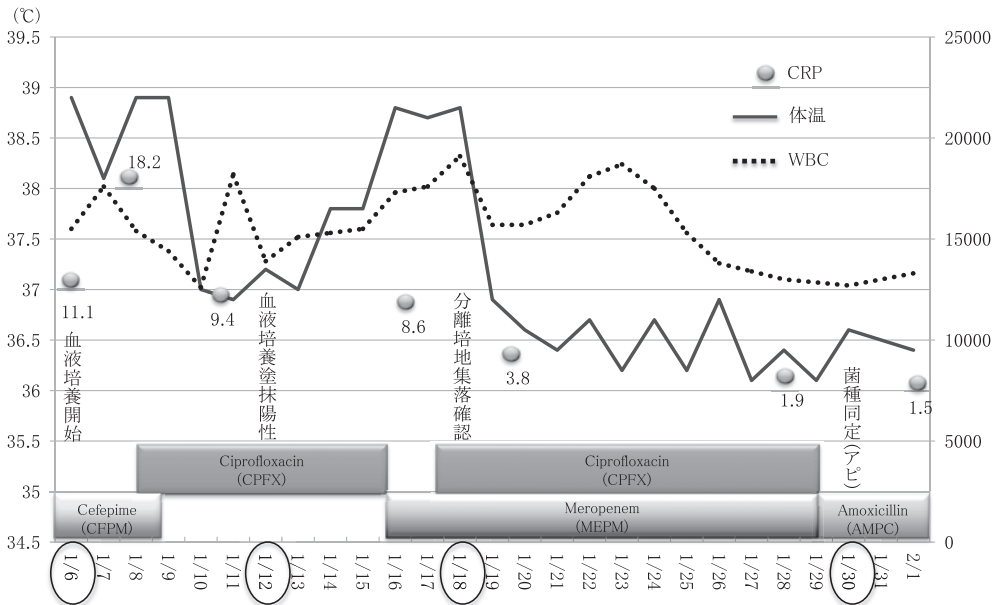


図2. 臨床および検査経過

- 1/06 血液培養開始
- 1/12 血液培養ボトル陽性報告（グラム陰性らせん状桿菌）
- 1/18 分離培地にフィルム状の遊走性集落確認
- 1/30 生化学的同定検査にて *H. fennelliae* と同定
- 1/31 16SrDNA 塩基配列解析にて *H. fennelliae* と同定
- 2/26 薬剤感受性試験結果が判明

92F 好気用レズンボトル 2 本が培養陽性となり、グラム染色（フェイバー G 「ニッスイ」 後染色液：フクシン・日水製薬）で、グラム陰性らせん状桿菌が観察さ

れた（図 3）。陽性となった血液培養ボトルから注射シリンジを用いて培養液を抜き取り、その 1 滴をニッスイプレート羊血液寒天培地（日水製薬）上に白金耳

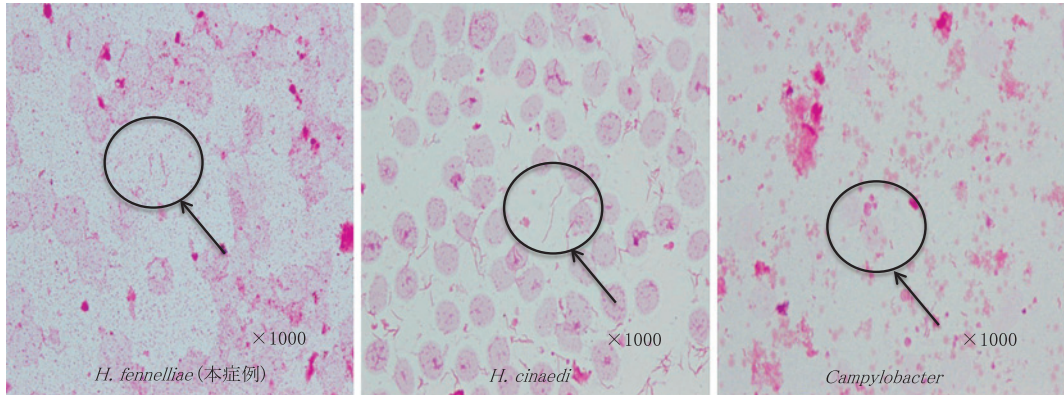


図3. 血液培養ボトルからのグラム染色像

染色液：フェイバーG「ニッスイ」®（日水製薬）、後染色液：フクシン
グラム陰性らせん状桿菌

H. fennelliae, *H. cinaedi* は長いらせん状であり，形態から2菌種を鑑別することは困難である
Campylobacter 属菌は短いらせんを示す



図4. 血液寒天培地上での集落写真

ニッスイプレート羊血液寒天培地（日水製薬）
35℃，微好気培養にて5日間培養
フィルム状の遊走性集落
(*H. cinaedi* と鑑別することは困難)

を用いて塗抹した。培地は微好気培養システムであるアネロパック®微好気（三菱ガス化学）を使用し，水素添加なしで35℃の湿潤環境下にて培養を行ったところ，培養開始から5日目に培地表面にフィルム状の遊走性集落を確認した（図4）。

分離培養した菌の生化学的性状はカタラーゼテストに陽性，ウレアーゼテストに陰性を示した（表3）。これらの検査成績から *H. cinaedi* を疑い，アピヘリコ（シスメックス・ピオメリユ）による生化学的同定検査を実施した。羊血液寒天培地で48時間から72時

間湿潤状態で微好気培養を行った培養菌を検査に用いた。その結果，99%の確率で *H. fennelliae* と同定された。

遺伝子学的検査では，血液培養で陽性となった好気用レズンボトルの培養液1 mLを採取し，遠心分離（13000 g，1分）後，その沈さに滅菌超純水を1 mL添加して3回洗浄して溶血させた。QIAamp DNA mini Kit (QIAGEN)を用いて，溶血サンプルからDNAを抽出し，これをDNAテンプレートとした。PCRは，27fおよび1525rのプライマーペア（表4），TaKaRa Ex Taq（タカラバイオ），dNTP混合液，およびDNAテンプレート5 μlを添加し，総液量20 μlとした。PCRは，サーマルサイクラーはGeneAmp PCR System 9700（Life technologies）を用いて94℃5分，[94℃30秒，50℃30秒，72℃1分]を30サイクル，72℃7分の条件でおこなった。得られたPCR産物は，27f，519r，530fおよび926fのプライマー（表4）を用いて，DNA塩基配列決定はFASMACバイオ研究支援事業部に委託した。得られた4本のDNAシークエンスリードは，手で連結し，1,572 bpの16S rDNA塩基配列を得た。国際原核生物分類命名委員会の基準株由来の16S rDNA配列をデータベースとしているEzTaxon¹⁾で相同性を比較した結果，CCUG 18820 (T)株（アクセス番号：M88154）²⁾との相同性が99.87%（1,570/1,572 bp）であった。Tindallらの報告³⁾に基づき，同一菌種であることを示す相同性閾値を97.0%として比較したところ，この値を上回る菌種は *H. fennelliae* のみであった。

表 2. 薬剤感受性試験結果 (参考値)*

抗菌薬	MIC (µg/mL)	抗菌薬	MIC (µg/mL)
benzylpenicillin	0.5	imipenem	0.25
ampicillin	1	meropenem	0.25
sulbactam/ampicillin	1	clarithromycin	>4
cefotiam	1	minocycline	≤0.25
cefpirome	8	tosufloxacin	1
cefditoren pivoxil	0.5	levofloxacin	8
		clindamycin	2

薬剤感受性試験法：微量液体希釈法

使用プレート：ドライプレート‘栄研’BT34 (栄研化学)

接種用培地：感受性ブルセラブロス‘栄研’ (栄研化学)

微好気培養 8 日目にて判定

*菌接種後 24 時間毎に観察を行い、コントロールウエルに菌の発育が肉眼で十分観察された時点を持って最終判定を行った

表 3. *Helicobacter* 属菌の一般的な生化学的性状

	<i>H. pylori</i>	<i>H. cinaedi</i>	<i>H. fennelliae</i>	(本症例)
ウレアーゼ活性	+	-	-	-
カタラーゼ産生	+	+	+	+
硝酸塩還元	-	+	-	-
アルカリフォスファターゼ加水分解	+	-	+	+
インドキシル酢酸塩加水分解	-	-	+	+
42°Cでの増殖	-	-	-	-
感受性 (30 µg disk)				
nalidixic acid	R	S	S	R
cephalotin	S	I	S	S
鞭毛数	4~8	1~2	2	
鞭毛の鞘	+	+	+	
鞭毛の分布	双極	双極	双極	

表 4. 16S rDNA 塩基配列解析に用いたプライマー

プライマー名	配列 (5'-3')	用途	文献
27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	PCR およびシーケンズ	14)
519r	GWATTACCGCGGCKGCTG	シーケンズ	14)
530f	GTGCCAGCMGCCGCGG	シーケンズ	14)
926f	AAACTYAAAKGAATTGACGG	シーケンズ	15)
1525r	AAGGAGGTGWTCARCC	PCR	14)

Helicobacter 属菌に対する薬剤感受性検査法は、標準化された方法がないので、我々は微量液体希釈法にて MIC を測定した。薬剤感受性試験は、当院検査室用にカスタマイズした、クラス III 細菌検査用シリーズ薬剤感受性 (一般細菌・液体培地希釈法) キットのドライプレート ‘栄研’ (栄研化学) BT34 と、

液体培地として感受性ブルセラブロス ‘栄研’ (栄研化学) を用いて実施した。生化学的同定検査と同様に、分離菌を羊血液寒天培地で 48 時間から 72 時間湿潤状態で微好気培養後、上記の感受性測定用プレートに接種した。接種したプレートは 35°C にて微好気培養を行った。判定は菌接種後 24 時間毎に観察を行い、コ

ントロールウエルに菌の発育が肉眼で十分観察された8日目に最終判定を行った。本症例において血液培養から分離された菌株の cefpirome (CPR), levofloxacin (LVFX), tosufloracin (TFLX) およびカルバペネム系薬 imipenem (IMP), MEPM に対する MIC 値は、それぞれ 8 µg/mL, 8 µg/mL, 1 µg/mL, および 0.25 µg/mL, 0.25 µg/mL であった (表2)。

考 察

1984年, Fennellら⁴⁾により大腸炎患者の直腸から従来の *Campylobacter* 属菌とは異なり, 発育に時間を要する13株が分離され, *Campylobacter-like organism* (CLO) として報告された。CLOはさらに CLO-1 (10株), CLO-2 (2株), CLO-3 (1株) に分類され, 硝酸塩還元, アルカリフォスファターゼ加水分解, インドキシル酢酸塩加水分解, セファロチンへの感受性などの違いから CLO-1は *Campylobacter cinaedi*, CLO-2は *Campylobacter fennelliae* として菌種名が与えられた⁵⁾(表3)。現在に至るまで CLO-3の菌種名は決まっていないが, 1989年に *C. cinaedi* は *H. cinaedi*, *C. fennelliae* は *H. fennelliae* のように異なる菌属に編入された⁶⁾。

H. cinaedi と *H. fennelliae* はともにウレアーゼは陰性, カタラーゼは陽性であるが, *H. cinaedi* は, *Helicobacter* 属菌の細胞質膜を構成する3種類のコレステロール・グルコシドを含有しないことが知られている⁷⁾。

H. fennelliae は腸管棲息菌であり, *Campylobacter fetus* と同様に腸管を経由して, 免疫不全宿主における血流感染を起こすことが知られている⁸⁾。今回の症例も生体腎移植が施行され, 免疫抑制剤を内服している患者であった。これまでの血流感染報告例は *H. cinaedi* が原因のものが多いが, 近年では *H. fennelliae* による血流感染の報告例も散見される。HIV感染による免疫不全患者の敗血症例⁹⁾や癌化学療法中に菌血症を繰り返した症例¹⁰⁾, 人工股関節置換術後の敗血症例¹¹⁾などが報告されている。

本症例は, 血液培養から *H. fennelliae* が検出され, またそれに沿った治療法によって発熱や上腹部痛などの臨床症状の改善がみられた。これらのことから総合的に判断すると, *H. fennelliae* による敗血症に伴う嚢胞内感染の合併が強く疑われた。なお, 治療期間は, 免疫不全宿主における嚢胞内感染として, 約6週間抗菌薬投与を行った。

血液から分離されるらせん菌のうち, *Helicobacter* 属菌は培養に5~6日を要し, 且つ分離された菌種同

定も容易ではない。田中ら¹²⁾の報告によると, *H. fennelliae* 標準株についての実験では, 生化学同定検査キットのアピヘリコによる同定精度が必ずしも高くは無いことが指摘されている。今回の結果同様, 血液培養ボトル液を用いた遺伝子学的検査法の導入により, 同定された報告もある¹³⁾。今回我々は, 生化学的検査で *H. fennelliae* と同定された後に, 遺伝子学的検査法の一つである16S rDNA塩基配列解析を実施し, 生化学的検査と同様の結果を得た。今後は, 血液培養が陽性となった時点で血液培養ボトル液を検査材料とした16S rDNA塩基配列を解析することにより早期に菌名が判明し, 適切な抗菌薬選択に貢献できる可能性が示唆された。現時点では本菌の薬剤感受性の動向を示す報告はなく, エンピリック・セラピーに関する情報も含め, *Helicobacter* 属菌に関する更なる疫学情報の蓄積が必要と思われた。

文 献

- 1) Chun, J, JH Lee, Y Jung, et al. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2259-2261.
- 2) Tee, W, S Hinds, J Montgomery, et al. 2000. A Probable New *Helicobacter* Species Isolated from a Patient with Bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology* 10: 3846-3848.
- 3) Tindall, BJ, R Rossello-Mora, HJ Busse, et al. 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 249-266.
- 4) Fennel, CL, PA Totten, TC Quinn, et al. 1984. Characterization of *Campylobacter-like* organisms isolated from homosexual men. *J infect Dis* 149: 58-66.
- 5) Totten, PA, CL Fennel, FC Tonver, et al. 1985. *Campylobacter cinaedi* (sp.nov.) and *Campylobacter fennelliae* (sp.nov.): two new *Campylobacter* species associated with enteric disease in homosexual men. *J infect Dis* 151: 131-139.
- 6) Lawson, AJ, et al. 2011. *Helicobacter*. p. 900-915. In: *Manual of clinical microbiology* 10th edition.
- 7) 平井義一, 他. 2005. 腸肝ヘリコバクター感染症と疾患 *H. cinaedi*, *H. fennelliae*, *H. pullorum* の性状と病原性. *臨床と微生物* 32: 175-180.
- 8) Hsueh, PR, LJ Teng, CC Hung, et al. 1999. Septic shock due to *Helicobacter fennelliae* in a non-human immunodeficiency virus-infected heterosexual pa-

- tient. J Clin Microbiol 37: 2084-2086.
- 9) Ng, VL, WK Hadley, CL Fennell, et al. 1987. Successive bacteremias with “*Campylobacter cinaedi*” and “*Campylobacter fennelliae*” in a bisexual male. J Clin Microbiol 25: 2008-2009.
- 10) 永松麻希, 他. 2013. 化学療法中に繰り返し発症した *Helicobacter fennelliae* による菌血症の 1 例. 日本臨床微生物学雑誌 23: 254-254.
- 11) 小俣美香子, 他. 2011. 人工股関節置換術後に *Helicobacter fennelliae* 敗血症をきたした全身性エリテマトーデスの一例. 関東リウマチ 44: 152-157.
- 12) 田中孝志, 他. 2007. 血液培養からの *Helicobacter cinaedi* 及びその類縁菌の分離培養と簡便同定法に関する検討. 感染症学雑誌 81: 700-706.
- 13) 森口美琴, 他. 2010. 健康成人に発症した *Helicobacter cinaedi* 菌血症の 1 例. 医学検査 59: 1046-1049.
- 14) http://openwetware.org/wiki/Bacterial_species_identification 2015 年 7 月 8 日現在
- 15) <http://www.coloss.org/beebook/I/gut-symbionts/2/1/2> 2015 年 7 月 8 日現在

A case of *Helicobacter fennelliae* bacteremia diagnosed by 16S rDNA using directly-obtained positive blood culture suspension

Chikako Maehara¹⁾, Sadako Yoshizawa²⁾, Yuto Fukui²⁾, Kotaro Aoki³⁾, Ayumi Yoshizumi³⁾,
Hinako Murakami¹⁾, Kumiko Yasui¹⁾, Shigeru Fukuzawa¹⁾, Kyoko Enokizono¹⁾,
Waka Imai¹⁾, Masakazu Sasaki¹⁾, Yoshikazu Ishii³⁾, Kazuhiro Tateda^{1) 3)},
Kento Yanagisawa⁴⁾, Ken Sakai⁴⁾, Atsushi Aikawa⁴⁾

¹⁾Department of Laboratory Medicine, Toho University Omori Medical Center

²⁾Department of Infectious Diseases, Toho University Omori Medical Center

³⁾Department of Microbiology and Infectious Diseases, Toho University School of Medicine

⁴⁾Department of Nephrology, Toho University Omori Medical Center

A 50-years-old man receiving a living-donor kidney transplantation due to polycystic kidney was admitted to the hospital due to fever, chilling, and upper abdominal pain. Two sets of blood cultures obtained on admission revealed spiral-shaped gram negative rods on hospital day number six. Film-like colony was observed on hospital day number eleven and biochemical characteristics showed possible *Helicobacter* species, which was identified as *H. fennelliae* by using api-Helico[®]. To identify the bacteria earlier, 16S rDNA analysis was performed by using positive blood culture suspension directly. The results revealed 99.87% homology with *H. fennelliae*, which was compatible to the biochemical results. MIC values of isolated bacteria were 8 µg/mL for cefpirome, 8 µg/mL for levofloxacin, and 0.25 µg/mL for meropenem, respectively. Our results indicated possible beneficial role of 16S rDNA analysis using positive blood culture suspension directly. It may enable to identify bacteria such as *Helicobacter* species, much earlier than biochemical results.