

[症例報告]

血液培養より *Leptotrichia trevisanii* が検出された一症例

川島千亜紀¹⁾・澤村治樹¹⁾・横山明孝¹⁾・川上 徹²⁾・林 将大³⁾・田中香お里³⁾

¹⁾ 一宮西病院検査科細菌検査室

²⁾ 一宮西病院臨床検査科

³⁾ 岐阜大学生命科学総合研究支援センター嫌気性菌研究分野

(平成 27 年 9 月 10 日受付, 平成 27 年 11 月 20 日受理)

Leptotrichia trevisanii は日和見感染の原因菌であるが, 検査室において同定するのは非常に困難な菌種で, 16S rRNA 塩基配列解析による同定が必要とされてきた。著者らは *L. trevisanii* による菌血症の診断に matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) が有用であった症例について報告する。患者は食道癌にて化学療法通院中に誤嚥性肺炎のため当院に救急搬送された。入院時に採取された血液培養(培養4日目)より両端の尖った細長いグラム陰性桿菌が検出され, 羊血液寒天培地に発育した集落を MALDI-TOF MS で分析したところ, *L. trevisanii* と迅速に同定することができた。後日 16S rRNA 塩基配列解析によっても *L. trevisanii* であることが確認された。MALDI-TOF MS は従来の同定キットでは同定困難である本菌種の迅速同定に有用であることが示唆された。

Key words: *Leptotrichia trevisanii*, 嫌気性グラム陰性桿菌, MALDI-TOF MS

序 文

Leptotrichia 属は口腔内に常在し, 時に腸管や膈からも検出される偏性嫌気性グラム陰性桿菌である。非病原性とされていたが, 近年では免疫抑制状態にある患者において, 口腔内感染症や心内膜炎, 更には菌血症を起こすという報告もある^{1)~10)}。*Leptotrichia trevisanii* は, グラム染色では特徴的な形態を示すものの, 生化学的性状を利用した同定キットのみでは同定が困難であり, 最終的な菌名の確定には遺伝子解析が必要とされていた。このため臨床側への菌名の報告が遅れ, 治療に影響を与えたとする報告も見受けられた。

今回我々は, 食道癌にて化学療法中の患者から分離した *L. trevisanii* について MALDI-TOF MS を使用し, 従来法よりも迅速に菌種を同定することができたので報告する。

症 例

患者: 78 歳 男性

主訴: 食欲不振, 体動困難

既往歴: 深部静脈血栓症

高血圧

緑内障

慢性腎臓病

現病歴: 2014 年 7 月頃より食事及び水分摂取困難になり, CT にて食道癌, 噴門部リンパ節転移, 肺両側多発転移, 肝両葉の多発転移を指摘され, 入院加療となる。内視鏡による精密検査で食道癌 [Mt. 3 型.Por Squ. T2. N2. M1 (肺・肝) (cStageIVb)] と診断され, 食道ステント留置後に退院となり, 通院による化学療法が実施された。2014 年 12 月下旬, 退院後も継続していた食欲不振や体動困難等の症状に悪化が認められ, また, 通院先で誤嚥性肺炎と判断されたため, 当院救急搬送となる。身体所見としては意識清明, 体温 37.1°C, 血圧 117/92 mmHg, 脈拍 64/分, 不整なし, 黄疸や浮腫はないが貧血が認められた。さらに口腔内の衛生状態は極めて不良で乾燥しており, 出血も認められた。血液検査では, 白血球数 1600/μl, 血小板数 $3.6 \times 10^4/\mu\text{l}$ と化学療法による骨髄抑制が認められ

著者連絡先: (〒494-0001) 愛知県一宮市開明字平 1 番地
一宮西病院検査科細菌検査室
川島千亜紀
TEL: 0586-48-0077
FAX: 0586-48-0058

表1. 入院時血液生化学検査所見

AST	5 IU/ml
ALT	11 IU/ml
LDH	270 IU/ml
ALP	294 IU/ml
γ-GTP	73 IU/ml
TP	6.6 g/dl
ALB	2.6 g/dl
BUN	84.1 mg/dl
CRE	3.38 mg/dl
Na	142 mEq/dl
K	4.1 mEq/dl
Cl	110 mEq/dl
CRP	28.9 mg/dl
WBC	1600 /μl
RBC	235 × 10 ⁴ /μl
Hb	8.4 g/dl
Hct	24.2 %
Plt	3.6 × 10 ⁴ /μl

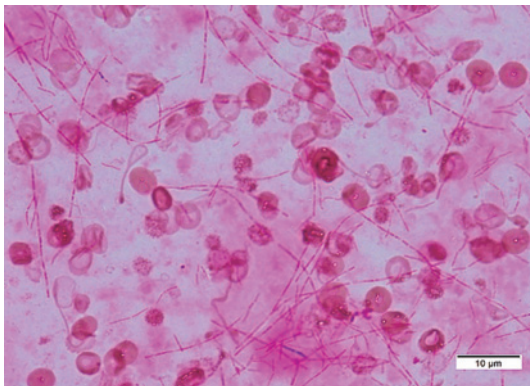


図1. 好気ボトルの培養液沈渣のグラム染色像
BACTEC-FXにて発育が認められた好気ボトルの培養液を3,000回転10分間遠心し沈渣へグラム染色した。

た。また、CRP 28.98 mg/dlと著明な上昇を認め、CTにて右肺野に浸潤影も認められたため、肺炎が疑われ入院となった。(表1)。患者の基礎疾患も考慮し発熱の原因検索のために同日血液培養を採取した後、誤嚥性肺炎治療目的のため sulbactam/ampicillin (SBT/ABPC) が投与された。第6病日には、解熱し、炎症反応は改善傾向にあり、第20病日には肺野浸潤影にも改善が認められたため抗菌薬投与を終了し、1月下旬転院となった。

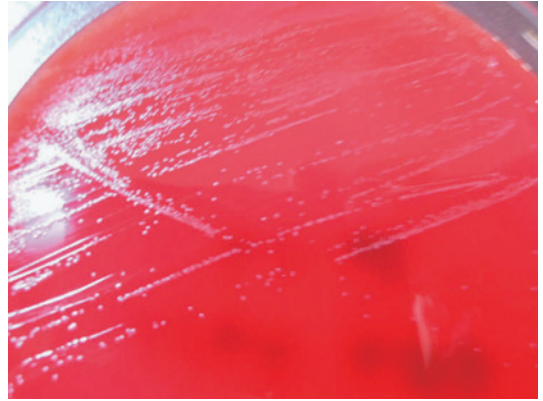


図2. 羊血液寒天培地に発育したコロニー
血液培養の沈渣へ羊血液寒天培地に接種し、35℃、5%炭酸ガス環境下、培養1日目の微小な集落。嫌気ボトル、好気ボトルとも同様な微小集落。

微生物学的検査

入院時に血液培養を2セット(23F好気用レズンボトル、92F嫌気用レズンボトル)採取し、BDバクテックFX(日本ベクトン・ディッキンソン)にて血液培養を開始した。培養開始後94時間の時点で好気ボトルが陽性となり、続いて98時間の時点で嫌気ボトルも陽性となった。また、培養液を遠心分離し沈渣をグラム染色した結果、紡錘状のグラム陰性の桿菌を認めた(図1)。嫌気ボトルおよび好気ボトルの培養液沈渣を羊血液寒天培地(日水製薬)、チョコレート寒天培地II(栄研化学)を用いて炭酸ガス培養、ABHK寒天培地(日水製薬)を用いて嫌気培養を行った結果、全ての培地において培養1日目で純培養状に灰色の微小な集落を認めた(図2)。これらの集落をグラム染色したところ、全て培養液沈渣の染色でも観察された両端の尖った細長い陰性桿菌であった(図3)。

培養1日目の羊血液寒天培地に発育した集落をMALDI-TOF MS(MALDI Biotyper ver. 3.1;ブルカー・ダルトニクス)にて測定した。集落をプレートに均一に塗布し、マトリックス溶液を添加し、乾燥させたあとに解析(セルスマ法)した結果、*L. trevisanii*と菌種レベルまで同定された。Score Valueは好気ボトル由来株が2.355、嫌気ボトル由来株が2.304であった。また、どちらの分析結果においても、他の候補菌種は提示されなかった。精査目的で分離株の16S rRNA塩基配列解析を実施した結果、*L. trevisanii*の16S rRNA塩基配列(A Y029805.1)と99.8%一致した。また、分離菌について馬溶血血液添加ブルセラブrossを測定培地としてドライプレート栄研DP33(栄

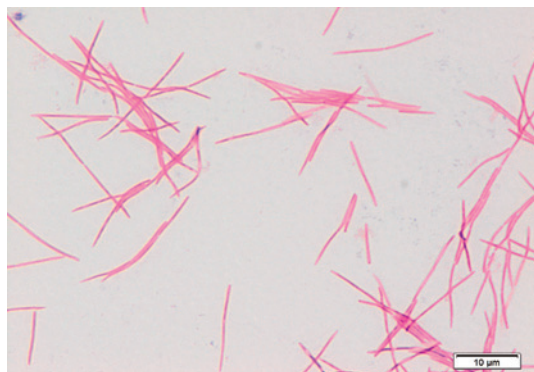


図3. 分離菌のグラム染色像

羊血液寒天培地に発育したコロニー（培養1日目）のグラム染色像。

研化学)を使用し、メーカーの使用説明書に従って感受性検査を実施した。その結果、levofloxacin (LVFX)以外の被検薬剤全般に低いMIC値を示した (Table 2)。

考 察

Leptotrichia 属は偏性嫌気性グラム陰性桿菌であるが、5%炭酸ガス培養下でも発育する菌種が存在する³⁾。そのため嫌気ボトルのみでなく好気ボトルからも検出される場合がある。この属は口腔や腸管、女性生殖器などの常在菌として検出され、しばしば口腔などの感染症に関与することが報告されている⁴⁾。口腔などの粘膜に出血や炎症を有し、特に好中球が減少している患者では、菌血症となり、血液培養から検出される症例が稀なケースとして報告されている^{4)~7)}。白血病などの造血器腫瘍患者だけでなく、化学療法による骨髄抑制の状態にある患者では、口腔内の出血は菌血症の危険因子であり、こうした稀な菌種による感染症も念頭に置かなければならない⁸⁾¹⁰⁾¹¹⁾。今回我々が経験した症例も口腔内に炎症や出血があり、さらに化学療法中の骨髄抑制によって白血球減少と血小板減少をきたし出血傾向が高くなったことで菌血症へと至ったと考えられる。

L. trevisanii は諸家の報告では、全般にβラクタム系薬に良好な感受性を示しているが、clindamycin (CLDM) やLVFXには耐性を示す株が報告されている^{2)5)~9)}。今回分離された株においては、ペニシリン系を含むβラクタム系に良好な感受性を示し、CLDMについても感性であったが、LVFXには耐性であった。本症例では肺炎治療として使用されたSBT/

表2. 薬剤感受性試験の結果

抗菌薬名	MIC (μg/ml)
Penicillin	0.03
Ampicillin	0.12
Sulbactam/Ampicillin	≤2/4
Tazobactam/Piperacillin	≤4/16
Clavulanic acid/Amoxicillin	≤1/2
Sulbactam/Cefoperazon	≤8/8
Ceftizoxime	≤2
Ceftazidime	≤2
Cefepime	≤1
Cefmetazole	≤1
Flomoxef	≤1
Imipenem/cilastain	≤0.25
Meropenem	≤0.25
Minocyclin	≤0.25
Clindamycine	≤0.12
Chloramphenicol	4
Levofloxacin	>2

ABPCにも分離菌は感性を示しており、菌血症の治療にも有効であったと考えられた。

L. trevisanii は、従来国内で使用されてきた生化学的手法を用いた同定キットでは対象外菌種であり、形態と性状による菌名の特定は困難であるため、同定には遺伝子解析を用いることが不可欠であった。しかし、本症例ではMALDI-TOF MSを使用することにより、血液培養陽性確認後24時間程度で菌名まで同定することが可能であった。この装置は、菌体由来するタンパク質やペプチドをイオン化したフラグメントとして分離展開し、その構成を質量スペクトルとして検出する。システム内の解析ソフトは、検出された質量スペクトルを自動的にデータベースに照会し、属、菌種に特徴的なピークパターンとのマッチングにより属、菌種を同定する。菌体構成タンパク質を高精度の分解能で展開検出できるMALDI-TOF MSの利用により、多くの菌種で精度の高い同定が可能となっている。少ない菌体量で分析が可能であること、菌体を特別な全処理を施すことなく分析できること、また、数分で質量スペクトルが得られるため、迅速性の点でも極めて優れている。しかしながら、リボゾームタンパク質の差異が乏しい菌種での種レベルの同定やデータベースが十分でない菌種の同定は今後の課題である¹²⁾。*Leptotrichia* 属についても、使用したMALDI Biotyper ver.3.1のデータベースに登録されている菌種は*L. trevisanii* と*Leptotrichia wadei*の2菌種であ

る。従って、本症例で分離された *L. trevisanii* は同定可能であるが、*Leptotrichia buccalis* を含めたその他の *Leptotrichia* 属は *Leptotrichia* sp. としか同定できない点は注意が必要である。

現状では多くの施設が生化学的手法を利用しており、同定困難な場合は分子生物学的手法で菌種を確定している。しかし、この方法では同定までに長時間を要し、その間に重症化することも考えられる。本症例では、入院時に誤嚥性肺炎疑いで早期に投与されていた SBT/ABPC が効果を示し、軽快したと推察されるが、症状の出現から投薬までの時間が予後に大きく影響したと考えられる。MALDI-TOF MS は、検査開始から同定まで大幅な時間短縮が可能である。分離菌の感受性測定が実施されない、或いは出来ない場合も多い嫌気性菌感染症では、一般好気性菌よりも経験的治療への依存度が高く、迅速に精度の高い同定結果を得られる意義は大きい。また、嫌気性菌の確定同定には、時間・労力・費用が高むことが多い。本症例でも示されたように、MALDI-TOF MS はこれらの課題をまとめて解消できる可能性をもつ。今後このような装置が普及し、より多くのデータベースが構築されることにより同定可能な菌種が増加していけば、感染症の予後の更なる改善が期待できると考えられる。

利益相反： 申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) 渡辺邦友. 2006. いわゆる嫌気性菌が関与する感染症に関する最近の話題. 感染症学雑誌 80: 76-83.
- 2) 米玉利準, 大瀧博文, 中山麻美, 他. 2014. 血液培養好気ボトルより *Leptotrichia trvisanii* を分離した多発性骨髄腫患者における菌血症の 1 例. 日臨微誌 24: 201-206.
- 3) Eribe, E.R., I. Olsen. 2008. *Leptotrichia* species in hu-

man infections. Anaerobe 14: 131-137.

- 4) Eribe, E.R., B.J. Paster, D.A. Caugant, et al. 2004. Genetic diversity of *Leptotrichia* and description of *Leptotrichia goodfellowii* sp. nov., *Leptotrichia hofstadii* sp. nov., *Leptotrichia shahii* sp. nov., and *Leptotrichia wadei* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 583-592.
- 5) Tee, W., P. Midolo, P. Janssen, et al. 2001. Bacteremia due to *Leptotrichia trevisanii* sp. nov. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20: 765-679.
- 6) Cooreman, S., C. Schuermans, J. Van Schaeren, et al. 2011. Bacteremia caused by *Leptotrichia trevisanii* in a neutropenic patient. Anaerobe 17: 1-3.
- 7) Higurashi, Y., K. Tatsuno, F. Fujimoto, et al. 2013. Two cases of bacteremia caused by *Leptotrichia trevisanii* in patients with febrile neutropenia. J. Infect. Chemother 19: 1181-1184.
- 8) Couturier, M.R., E.S. Slechta, C. Goulston, et al. 2012. *Leptotrichia* bacteremia in patients receiving high-dose chemotherapy. J. Clin. Microbiol. 50: 1228-1232.
- 9) Schrimsher, J.M., J.P. McGuirk, D.R. Hinthorn. 2013. *Leptotrichia trevisanii* sepsis after bone marrow transplantation. Emerg. Infect. Dis. 19: 1690-1691.
- 10) Lark, R.L., S.A. McNeil, K. VanderHyde, et al. 2001. Risk factors for anaerobic bloodstream infections in bone marrow transplant recipients. Clin. Infect. Dis. 33: 338-343.
- 11) Terhes, G., K. Piukovics, E. Urban, et al. 2001. Four cases of bacteraemia caused by *Fusobacterium nucleatum* in febrile, neutropenic patients. J. Med. Microbiol. 60: 1046-1049.
- 12) De Carolis, E., A. Vella, L. Vaccaro, et al. 2014. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. J. Infect. Dev. Ctries. 8: 1081-1088.

A case of bacteremia caused by *Leptotrichia trevisanii*

Chiaki Kawashima¹⁾, Haruki Sawamura¹⁾, Akitaka Yokoyama¹⁾, Toru Kawakami²⁾,
Masahiro Hayashi³⁾, Kaori Tanaka³⁾

¹⁾Medical Microbiology Laboratory, Ichinomiyanishi Hospital

²⁾Department of Clinical Laboratory, Ichinomiyanishi Hospital

³⁾Division of Anaerobe Research, Life Science Research Center, Gifu University

Leptotrichia trevisanii is an opportunistic pathogen, which is difficult to be identified by routine laboratory test, and 16SrRNA sequencing is necessary for the species identification. We report a case of bacteremia caused by *L. trevisanii*. The patient was transferred to our hospital because he presented symptoms of aspiration pneumonia during the course of outpatient chemotherapy for esophageal cancer. Bacterial growth was observed in 2 sets of blood cultures after 4 days incubation. Isolated strains from those blood cultures were all identified as *L. trevisanii* by MALDI-TOFMS (Bruker MALDI Biotyper). Later, the result was confirmed by 16SrRNA sequencing. MALDI-TOFMS is suggested to be a quick and useful identification tool for this species.