

[総 説]

延長培養の有用性
—過去 11 年間の培養結果を振り返って—

高木妙子・大柳忠智・積田奈津希
聖マリアンナ医科大学病院臨床検査部/感染制御部

(平成 28 年 10 月 29 日受付)

過去 11 年間の延長培養後に発育した分離菌が、感染症の起炎菌であるかどうかを検討するために、診療録より後ろ向き調査を行なった。抽出条件は、抗酸菌依頼のあったもの、目的菌が真菌・*Nocardia* 属などはじめから長期培養となる場合、常在細菌叢を形成している材料などは集計から除外した。その結果、46 症例 47 株が該当した。分離菌の内訳は、*Mycobacterium* 属が 20 株と最も多く、次いで *Nocardia* 属 8 株、グラム陽性桿菌 (*Corynebacterium kropenstedtii*) 7 株、*Mycoplasma* 属 (*Mycoplasma hominis*) 5 株、真菌 4 株、その他 2 株であった。診療科別では整形外科 11 株、皮膚科 9 株、乳腺内分泌外科 7 株、呼吸器内科 5 株、次いで消化器一般外科、腎臓高血圧内科、産婦人科がそれぞれ 3 株、リウマチ膠原病内科で 2 株分離された。遅発育菌による感染症は、発症から有効な抗菌薬投与に至るまで日数を要するため、経過が長く難治になりやすい。そのため、延長培養を行うことは、早期に適切な治療を受けるために有用性の高い検査と考える。

Key words: 遅発育菌, 延長培養, compromised host

はじめに

高齢者、基礎疾患に癌や糖尿病などを有する患者、膠原病・臓器移植に使用する免疫抑制剤により免疫機能の低下した患者を含め compromised host に発症する日和見感染症が最近増加傾向にある。微生物検査で原因微生物の菌種同定を行なうことは診断、治療において臨床上重要である。従って、臨床側からの患者情報や目的菌の提供は原因微生物の検出に大きく影響する。特に発育に時間を要する真菌や *Nocardia* 属、グラム染色不染・難染色性の抗酸菌や *Mycoplasma* 属などが重要である。菌名同定は従来の生化学的性状による自動同定機器が主流であるが、近年、短時間で同定可能な質量分析装置、あるいは 16S rRNA を用いた遺伝子学的同定法が用いられている。一方、臨床材料の分離培養は検査目的に応じて使用培地や培養期間がマニュアル化され一律の検査となっている。つま

り、時にこれらの方法で起炎菌を検出できない場合があり、遅発育菌の延長培養についてはブラックボックスになっている。今回、過去 11 年間の延長培養後に発育がみられた分離菌に対して、感染症の起炎菌であるかどうかを、診療録より後ろ向きに調査を行なった。

1. 対象検体の抽出条件

- ①抗酸菌の検査依頼がない。
- ②目的菌に真菌・ノカルジアの依頼がない。
- ③グラム染色で真菌・ノカルジア様の所見が確認された症例を省く。
- ④皮膚科領域で真菌が分離された症例を省く。
- ⑤常在細菌叢の発育がみられた材料を省く。

上記の条件により、培養 3 日目以降に発育がみられた分離菌に対し、さらに診療録による後ろ向き調査で治療群のみを対象とし検討を行なった。対象期間は 2005 年 7 月から 2016 年 7 月までの約 11 年間に当院細菌検査室で分離した症例の中で、上記抽出条件を満たしたのは 46 症例 47 株であった。

著者連絡先：(〒216-8511) 神奈川県川崎市宮前区菅生 2-16-1
聖マリアンナ医科大学病院
高木妙子

2. 延長培養の運用

使用培地は5%羊血液寒天培地（日本BD）、チョコレート寒天培地（日水製薬）を用い培養1日目、2日目に発育状況の観察を行なう。次に、培養陰性およびグラム所見と培養成績が不一致となった培地を35℃、5%CO₂フラン器で1週間延長培養を行なう（図1）。さらに、グラム染色陰性で好中球のみ観察される場合や無菌材料は最長1ヶ月まで延長する。上記培養にて発育したコロニーのグラム染色所見が、「グラム



図1. 35℃、5%CO₂フラン器での延長培養

陽性桿菌、染色性が不均一および不染」の場合、抗酸菌染色とKinyoun染色を行なう（図2）。

3. 後ろ向き調査の結果

上記条件により検出された分離菌47株の内訳は、*Mycobacterium* 属が20株と最も多く、次いで *Nocardia* 属8株、グラム陽性桿菌 (*Corynebacterium kropstenstedtii*) 7株、*Mycoplasma* 属 (*Mycoplasma hominis*) 5株、真菌4株、その他2株であった。

診療科別では整形外科11株、皮膚科9株、乳腺内分泌外科7株、呼吸器内科5株、次いで消化器一般外科、腎臓高血圧内科、産婦人科がそれぞれ3株、リウマチ膠原病内科で2株分離された（表1）。

46症例の患者背景は、年齢が20歳から82歳で中央値は56.5歳、性別は男性17人、女性30人であった。入外別では外来22人、入院24人で約半数ずつであった。基礎疾患として糖尿病、慢性腎不全、関節リウマチ、固形悪性腫瘍などステロイドや免疫抑制剤を使用している症例を多く認めた。

1) グラム不染・難染色性、延長培養陽性菌（表2） *Mycobacterium* 属

今回の検討で、グラム難染色性の *Mycobacterium* 属20株が分離された。一般的にはグラム陽性菌として分類されているが、難染色の理由として *Mycobacterium* 属は細胞壁にミコール酸と呼ばれる脂質を多量

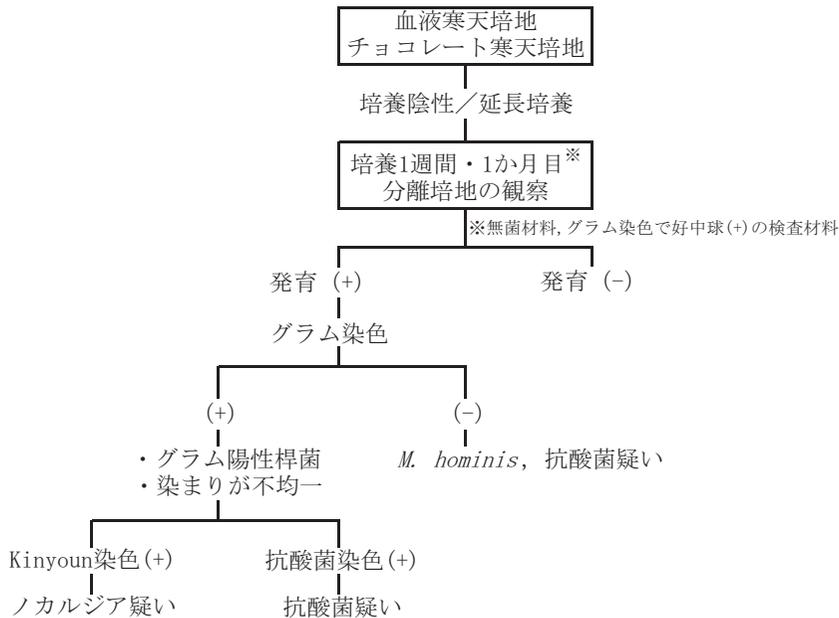


図2. 延長培養のフローチャート

表 1. 延長培養による検出菌の診療科別分離状況 (株数)

診療科	<i>Mycobacterium</i> 属	<i>Nocardia</i> 属	グラム陽性桿菌 (<i>C. kroppenstedtii</i>)	<i>Mycoplasma</i> 属 (<i>M. hominis</i>)	真菌	その他	合計
整形外科	3	4		1	1	2	11
皮膚科	7	2					9
乳腺内分泌外科			7				7
呼吸器内科	2	1			1	1	5
消化器一般外科	3						3
腎臓高血圧内科	2					1	3
産婦人科				3			3
リウマチ膠原病内科	2						2
心臓血管外科				1			1
消化器肝臓内科	1						1
総合診療内科					1		1
救命救急センター					1		1
合計	20	7	7	5	4	4	47

に含有するため、通常のグラム染色では染まりにくい。

分離菌内訳は *Mycobacterium tuberculosis* complex が消化器肝臓内科の胸水および整形外科のインプラント入替術中膿瘍からそれぞれ 1 株ずつ分離された。発育に要した日数は 2 週間以上必要であった。非結核性抗酸菌は 18 株分離され、*Mycobacterium chelonae/abscessus* group 8 株、*Mycobacterium fortuitum* group 5 株と迅速発育菌が半数以上を占めていた。その他 *Mycobacterium avium* 2 株、*Mycobacterium intracellulare* 1 株、*Mycobacterium species* 2 株であった。材料別では気管支洗浄液、胸水からそれぞれ 1 株で、それ以外の 16 株はすべて膿・創部からの分離であった。手術部位感染 (Surgical Site Infection: SSI) は整形外科で 2 症例、消化器一般外科で 1 症例認められ、すべて表層切開創であった。

Runyon 分類 IV 群の迅速発育菌が半数以上を占めており、グラム染色で不均一に染まるため他菌と誤りやすい。それ以外にもアルカリに弱い性状¹⁾²⁾があるため、抗酸菌検査の前処理において NaOH の影響を受けやすい。一般細菌の併用を行なわないと見逃している可能性がある。このことは、一般細菌で分離した迅速発育菌は抗酸菌検査で経過観察できないことを意味している。

M. hominis

Mycoplasma 属は真正細菌の一属であるが一般の真正細菌にみられるペプチドグリカン細胞壁を持たないためグラム染色は不染色である。*M. hominis* は *Mycoplasma* 属としては唯一、羊血液寒天培地、チョコ

レート寒天培地、ブルセラ HK 培地に発育可能である。培地の発育状態やグラム染色での不染色より *M. hominis* の可能性が推定できる。本菌は泌尿器生殖器に関連した材料から無症候性の常在菌として分離される。婦人科領域からの分離例が圧倒的に多いが³⁾、臨床的な意義は不明なところが多い⁴⁾。当院では期間中 15 症例から分離されたが、後ろ向き調査により 5 症例 6 株が対象となった。

患者背景は全例が入院患者で女性 4 例、男性 1 例、基礎疾患は固形悪性腫瘍や糖尿病の症例が多かった。科別では産婦人科で SSI 2 例・産褥感染 1 例、心臓外科で SSI 1 例、整形外科で同一患者から骨液包膿瘍と胸水から分離された症例が 1 例であった。

2) グラム染色陰性・延長培養陽性菌 (表 3)

Nocardia 属

Nocardia 属はノカルジア症の原因菌として知られ、糖尿病などの免疫不全宿主の感染症として重要である⁵⁾⁶⁾。通常、喀痰や膿瘍検体のグラム染色で、分岐したフィラメント状のグラム陽性桿菌として観察されるが、感染創の採取部位や菌量に左右される。今回、グラム染色陰性で *Nocardia* 属を分離した 8 症例では、発育コロニー数が 1 コロニーから 1+ と少数であった。分離菌の内訳は、*Nocardia brasiliensis* 4 例、*Nocardia asiatica*、*Nocardia elegans*、*Nocardia beijingensis*、*Nocardia species* がそれぞれ 1 例ずつ分離された。患者背景は年齢 20 歳から 83 歳、中央値 71.5 歳で、整形外科 4 例、皮膚科 2 例、総合診療内科と呼吸器内科から 1 例ずつ分離された。検査材料の 6 例が皮膚、創部、組織からの分離で皮膚ノカルジア症が多

表2. グラム不染色および難染色・延長培養陽性菌の一覧

菌名	症例	分離日	年齢	入内	性別	依頼科	検査材料	菌量	グラム染色 (好中球)	臨床症状・病名	基礎疾患
Mycobacterium 属											
<i>Mycobacterium chelonae/abscessus</i> group	1	2005/9/5	59歳	入院	女性	リウマチ 膠原病内科	創部分泌物	10コロニー	少数	左下腿膿瘍	多発性筋炎, 糖尿病
	2	2006/12/9	38歳	外来	男性	腎臓高血圧内科	膿 (PD出口部)	1+	少数	PD 関連腹膜炎	慢性腎不全
	3	2009/4/20	47歳	外来	女性	整形外科	膿 (開放)	1+	陰性	SSI (縫合不全)	
	4	2009/10/28	56歳	入院	女性	皮膚科	創部分泌物	3+	少数	壊疽性膿皮症	関節リウマチ
	5	2010/4/30	86歳	外来	男性	皮膚科	膿 (開放)	50コロニー	陰性	皮膚潰瘍	慢性腎不全
	6	2011/2/16	24歳	入院	男性	皮膚科	創部分泌物	20コロニー	陰性	下腿潰瘍	結節性多発性 動脈周囲炎
<i>Mycobacterium fortuitum</i> group	7	2013/5/20	44歳	外来	男性	皮膚科	膿 (穿刺膿汁)	10コロニー	少数	左拇指硬結	
	8	2015/12/21	67歳	外来	女性	呼吸器内科	気管支洗浄液	1+	多数	好酸球性胃腸炎	
	1	2008/4/3	31歳	外来	女性	皮膚科	皮下穿刺液	20コロニー	やや多数	右下腿・臀部結節	乳癌
	2	2009/5/15	41歳	外来	女性	皮膚科	膿 (非開放)	50コロニー	陰性	皮膚潰瘍	
	3	2009/6/29	60歳	入院	男性	整形外科	膿 (開放)	20コロニー	やや多数	SSI	
	4	2012/4/3	76歳	入院	女性	消化器一般外科	創部分泌物	2コロニー	少数	鼠径部リンパ節感染	バセドウ病
	5	2014/3/3	50歳	入院	男性	腎臓高血圧内科	創部分泌物	2+	多数	PD 出口部感染	骨盤部悪性腫瘍
	2	2015/5/1	64歳	入院	女性	整形外科	膿 (開放)	20コロニー	陰性	胸膜炎 脊椎インプラント入替 (術中膿瘍)	潰瘍性大腸炎 皮膚筋炎
<i>Mycobacterium avium</i>	1	2010/1/20	47歳	入院	女性	リウマチ 膠原病内科	胸水	2+	多数	難治性気胸	関節リウマチ, 全身性強皮症
	2	2016/3/24	55歳	外来	女性	皮膚科	膿 (開放)	2+	陰性	右下腿潰瘍	SLE
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1	2014/7/22	82歳	入院	女性	呼吸器内科	膿 (開放)	1+	ごく少数	ドレーン刺入部感染	
	2	2006/7/14	57歳	外来	女性	消化器一般外科	膿 (非開放)	20コロニー	少数	ポータサイト感染	
<i>Mycoplasma 属</i>	1	2010/2/15	62歳	入院	女性	整形外科	膿 (非開放)	1+	多数	肘関節外皮下	糖尿病
	2	2013/7/1	50歳	入院	女性	呼吸器内科	胸水	30コロニー	陰性	骨液包膿瘍	
	3	2014/11/29	39歳	入院	女性	産婦人科	膿 (尿管周囲)	1+	多数	SSI (骨盤内腹膜炎)	卵巣癌
	4	2016/4/13	64歳	入院	男性	心臓血管外科	ドレーン排液	2+	多数	SSI (腹腔内膿瘍)	子宮頸癌
	5	2016/5/19	36歳	入院	女性	産婦人科	膿 (開放)	2+	陰性	SSI (正中創縦隔洞炎)	糖尿病
						膿 (分泌)	2+	多数	産褥感染 (帝王切開後)		

2005/7/1 ~ 2016/7/31

表3. グラム染色陰性・延長培養陽性菌の一覧

菌名	症例 No.	分離日	年齢	入外	性別	依頼科	検査材料	菌量	グラム染色 (好中球)	臨床症状・病名	基礎疾患
Nocardia 属											
<i>Nocardia beijingensis</i>	1	2006/5/25	73歳	入院	男性	総合診療内科	気管支洗浄液	20コロニー	やや多数	肺炎	肝癌, 糖尿病
<i>Nocardia asiatica</i>	2	2008/12/2	76歳	入院	男性	整形外科	膿 (椎間板)	3コロニー	陰性	化膿性脊椎炎	糖尿病
<i>Nocardia brasiliensis</i>	3	2009/9/4	83歳	入院	男性	整形外科	創部分泌物	30コロニー	やや多数	左肘潰瘍	肝癌, 糖尿病
<i>Nocardia brasiliensis</i>	4	2009/9/18	34歳	外来	女性	皮膚科	皮膚	1コロニー	陰性	皮膚ノカルジニア症	
<i>Nocardia brasiliensis</i>	5	2009/9/28	20歳	外来	女性	整形外科	膿 (開放)	20コロニー	陰性	膝膿瘍	
<i>Nocardia brasiliensis</i>	6	2015/10/27	77歳	外来	女性	皮膚科	創部分泌物	1+	陰性	右臀部皮下膿瘍	関節リウマチ
<i>Nocardia elegans</i>	7	2013/5/17	70歳	入院	男性	呼吸器内科	ドレーン排液	10コロニー	陰性	膿胸	肺癌, 糖尿病
<i>Nocardia species</i>	8	2014/12/11	41歳	入院	男性	整形外科	組織	5コロニー	陰性	左手貫通創	
グラム陽性桿菌											
<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>	1	2008/12/10	26歳	外来	女性	乳腺内分泌外科	囊腫穿刺液	30コロニー	多数	乳腺腫瘍	
	2	2009/8/10	31歳	外来	女性	乳腺内分泌外科	膿 (非開放)	2コロニー	多数	化膿性乳腺炎	
	3	2009/10/5	42歳	外来	女性	乳腺内分泌外科	膿 (非開放)	1+	陰性	化膿性乳腺炎	
	4	2012/10/3	20歳	外来	女性	乳腺内分泌外科	膿 (開放)	1+	少数	乳腺膿瘍	
	5	2012/11/27	35歳	外来	女性	乳腺内分泌外科	穿刺液	30コロニー	多数	乳房腫瘍	
	6	2015/8/25	29歳	外来	女性	乳腺内分泌外科	膿 (非開放)	20コロニー	多数	乳腺膿瘍	
	7	2015/9/25	31歳	外来	女性	乳腺内分泌外科	膿 (非開放)	3コロニー	ごく少数	乳腺炎	
真菌											
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	2008/5/2	68歳	入院	男性	腎臓高血圧内科	胸水	1コロニー	陰性	胸水貯留	慢性腎不全
	2	2012/10/19	78歳	入院	女性	呼吸器内科	気管支洗浄液	1コロニー	多数	肺真菌症	関節リウマチ
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1	2014/5/3	67歳	外来	男性	救命救急センター	膿 (非開放)	5コロニー	多数	膿疱症	
	2	2014/7/31	65歳	外来	男性	整形外科	膿 (非開放)	1コロニー	ごく少数	右足底胼皮下膿瘍	肺癌
その他											
<i>Bordetella holmesii</i>	1	2011/11/4	28歳	入院	女性	整形外科	関節液	50コロニー	多数	左化膿性関節炎	
<i>Capnocytophaga cynodegmi</i>	2	2015/7/22	57歳	外来	男性	整形外科	ドレーン排液	10コロニー	陰性	化膿性関節炎 (動物咬傷後)	
2005/7/1 ~ 2016/7/31											

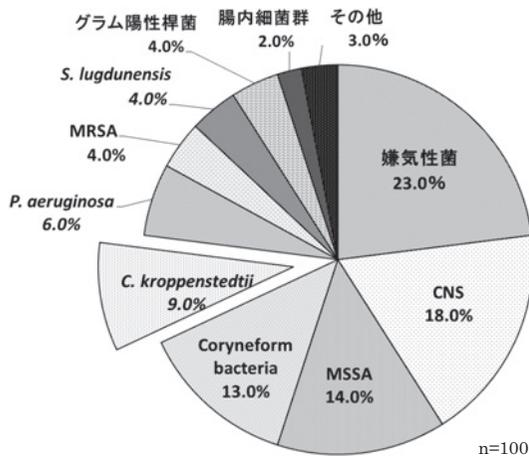


図3. 乳腺・内分泌外科材料より検出された分離菌 (2006年1月～2009年11月14日: 培養陽性79症例, 100株)

く見られた。基礎疾患では糖尿病, 固形悪性腫瘍や関節リウマチなどステロイド治療歴を有する症例が多かった。本菌属は一般細菌と比較して発育が遅いため数日から1週間以上の延長培養が必要である。血液寒天培地上の所見は, 培養日数と共にコロニーが固くなり培地に食い込む性状があるため, 微小コロニー形成後直ちにグラム染色を行なうのがよい。コロニーのグラム染色所見は, 難染色性のグラム陽性顆粒桿菌あるいは短桿菌様など多形成である。本菌は弱抗酸性であるため Kinyoun 染色は必須となる。

グラム陽性桿菌 (*C. kroppenstedtii*)

グラム陽性桿菌は自然界に広く分布し, 臨床材料から分離されることが多い。延長培養で検出されるグラム陽性桿菌の中で, *Corynebacterium* 属はコンタミネーション的要素が高い。しかし, *C. kroppenstedtii* は乳腺外科領域での感染症起炎菌としての意味合いが強い。本菌は1998年に新種登録された菌種⁷⁾で脂肪親和性をもつことが特徴である。欧米では肉芽腫性乳腺炎の起炎菌として知られている。近年, 本邦における *C. kroppenstedtii* の症例報告が増加している^{8)~10)}。集計期間内で本菌が分離された症例は13例で, 7例がグラム染色陰性であった。1例を除くすべてにおいて好中球が観察され, 発育コロニー数は2コロニーから1+と少数であった。発育日数は, 2, 3日目以降に微小コロニーを形成する。延長培養でも分離されないことがあるため増菌培養を行なう必要がある。その際, プロスが混濁せず試験管に沈殿することが多いので注意を要する¹¹⁾。患者背景は, 年齢20歳から42歳で中央

値31歳, 全例が乳腺外科外来の女性で基礎疾患は認められなかった。外来受診時の病名は乳腺腫瘍2例, 乳腺膿瘍2例, 化膿性乳腺炎2例, 乳腺炎1例であった。本菌による感染症は, 難治で再燃する傾向がみられるため, 臨床側への情報提供として, 脂肪親和性を有する肉芽腫性乳腺炎の起炎菌であることや脂溶性の高い抗菌薬選択についてコメントすべきである。

当院の乳腺・内分泌外科における2006年～2009年の調査では, 本菌の検出率が9%であった(図3)。

Cryptococcus neoformans

血液培養除く対象期間中の *C. neoformans* の分離は, 8症例10株であった。グラム染色陰性となったのは胸水と気管支洗浄液から分離した2症例のみで, いずれも発育コロニー数が1コロニーと極端に少なかった。患者背景は慢性腎不全, 関節リウマチの基礎疾患を有する入院患者であった。

Trichophyton mentagrophytes

皮膚糸状菌である *Trichophyton* 属は, 臨床側からの目的菌依頼や皮膚科検体からの分離例が多い。しかし今回, 救命センターと整形外科外来の非開放膿より *T. mentagrophytes* が分離された。後ろ向きに見た受診時の病名は膿疱症, 足底肝臓膿瘍となっていたことより, 積極的に臨床情報や材料の由来を考慮すべきであった。

おわりに

グラム染色所見と培養結果が不一致になった時, 我々検査技師は何とか起炎菌を分離しようと努力することは言うまでもない。しかし, グラム染色陰性・培養陰性で最終判定を2, 3日で打ち切った場合, 今回の47株は分離できなかったと考える。グラム染色陰性の場合, グラム染色の欠点である「菌数が少ないと検出できない, 不染・難染色性の菌種がある, 採取部位により成績のばらつきがある」などを念頭に置くべきである。日常検査における培養期間の打ち切りは各施設に委ねられており一定していないのが現状である。延長培養は培地を置くスペースの確保以外, 特に難しいことはないが, 発育菌の多くは特殊な菌であるため専門機関への同定依頼が必要となる。さらに, 感染症の起炎菌が常在菌・汚染菌の見極めが難しいため, 患者基本情報や臨床検査データを加味したうえで検査を進めることが重要である。ただし, 結核菌群の発育が見られたことよりバイオハザード面の対策や, 培養期間が長い場合フラン器の精度管理はきちんと行わなければならない。「過去11年間の培養結果を振り返って」思うことは, 初めて感染症の起炎菌として気

付く菌種があったこと、臨床側とコミュニケーションをとることにより治療に貢献できたこと、菌株の精査を通じて多くの先生方と知り合えたことが貴重な経験となった。また、諦めずに菌名同定に繋げる姿勢を常に持ち続けることが大切と考える。

最後に、多くの菌株を精査して頂きました東京医科大学微生物学教授の大楠清文先生、また、長年に渡って *Nocardia* 属を精査して頂いた千葉大学真菌医学研究センター微生物資源分野の各先生方に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 阿部千代治, 小林郁夫. 2011. 検体前処理液NALCNaOHの抗酸菌の生残に及ぼす影響. 結核 86: 368.
- 2) 丸茂健治, 青木良雄. 1983. 抗酸菌に対するNaOHの殺菌作用. 結核 58: 515-520.
- 3) 山田 俊. 2010. マイコプラズマ・ウレアプラズマと早産. 日本性感染症学会誌 21: 28-34.
- 4) 三鴨廣繁, 山岸由佳. 2010. 産婦人科領域におけるマイコプラズマ属の臨床的意義. 化学療法の領域 26 (11): 2226-2232.
- 5) Choucino, C, SA Goodman, JP Greer, et al. 1996. Nocardial infections in bone marrow transplant recipients. Clin. Infect. Dis. 23: 1012-1019.
- 6) 横田 昌, 川辺桂太郎, 山田秀樹, 他. 2010. 再生不良性貧血に合併した *Nocardia farcinica* による皮下膿瘍の1例. 真菌誌 51: 93-97.
- 7) Collins, MD, E Falsen, E Akervall, et al. 1998. *Corynebacterium kroppenstedtii* sp. nov., a novel *Corynebacterium* that does not contain mycolic acids. Int J Syst Bacteriol 48: 1449-1454.
- 8) 菅原芳秋, 大楠清文, 大塚喜人, 他. 2012. 再発を繰り返した *Corynebacterium kroppenstedtii* による乳腺炎の1症例. 日本臨床微生物学雑誌 22: 161-166.
- 9) 重松英朗, 中村吉昭, 古閑知奈美, 他. 2008. *Corynebacterium kroppenstedtii* 感染にて発症した肉芽腫性乳腺炎の1例. 日本臨床外科学会雑誌 69: 3069-3073.
- 10) 後藤正和, 森本忠興, 三浦連人, 他. 2012. 肉芽腫性乳腺炎の4例. 日本臨床外科学会雑誌 73: 1331-1336.
- 11) 大柳忠智. 2016. *Corynebacterium kroppenstedtii* 検査の進め方. 検査と技術 44: 1170-1175.