

## [症例報告]

### 血液培養ボトルで継代することにより分離し得た *Leptotrichia hongkongensis* による敗血症の1例

仲田佑未<sup>1)</sup>・室田博美<sup>1)</sup>・森下奨太<sup>1)3)</sup>・寺岡千織<sup>1)</sup>

田仲祐子<sup>1)</sup>・大楠清文<sup>2)</sup>・千酌浩樹<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 鳥取大学医学部附属病院検査部

<sup>2)</sup> 東京医科大学微生物学分野

<sup>3)</sup> 鳥取大学医学部附属病院感染制御部

(平成30年7月5日受付, 平成30年12月25日受理)

症例は1歳9か月, 女児。発熱を認め来院, 受診時の血液培養検査が陽性となった。血液培養ボトル内溶液のグラム染色像は紡錘状グラム陰性桿菌を認めたが, 平板培地のサブカルチャーでは発育を認めなかった。そのため, ヒト血液に培養液を加えて血液培養ボトルに接種し, 再培養を実施した。再培養した血液培養ボトルは46.0時間で陽性になり, 嫌気条件下でのサブカルチャーでは平板培地に48時間後発育を認めた。発育したコロニーの質量分析では同定不能となり, 16S rRNA 遺伝子解析で *Leptotrichia hongkongensis* と同定された。グラム染色所見, 生化学性状, 遺伝子解析結果から総合的に判断して *L. hongkongensis* と同定した。通常 *Leptotrichia* は嫌気環境下で発育し, 特別な培養法を必要としないが, 本症例は初代培養では菌の分離が不可能であり, 血液培養ボトルで継代することにより分離し得た症例であった。

**Key words:** *Leptotrichia hongkongensis*, 紡錘状グラム陰性桿菌, 血液培養検査, 敗血症

#### 序 文

*Leptotrichia* 属はヒトの口腔内及び腸管内に常在する偏性嫌気性グラム陰性桿菌であり, 免疫能低下患者において口腔内感染症, 歯肉炎, 心膜炎, 関節炎及び敗血症などを起こすことが知られている<sup>1)~8)</sup>。*Leptotrichia* 属は以前から6菌種が確認されていたが, 新たに *L. hongkongensis* が確認され7菌種となった<sup>1)</sup>。*Leptotrichia* 属による血流感染症は近年多く報告されているが, その多くは *L. buccalis* や *L. trevisanii* によるものであり<sup>3)4)</sup>, 本邦での *L. hongkongensis* による感染症の報告は少ない。

また, 敗血症や菌血症などの血流感染症を疑う患者の血液培養検査は, 診断, 治療のために重要な検査項目の一つであり, 迅速かつ正確に菌を同定することが必要とされている。臨床材料から分離される菌の多くは自施設でサブカルチャーを実施して, 同定することができるが, まれにサブカルチャーに難澁する菌や同定することのできない菌に遭遇することがある。

今回我々は, サブカルチャーに難澁したものの, 血液培養陽性ボトルで継代培養することにより分離し得た *Leptotrichia hongkongensis* による敗血症の1例を経験したので報告する。

#### 症 例

患者: 1歳9か月女児

主訴: 発熱

既往歴: 低酸素性虚血性脳症, 點頭てんかん, 嚥下障害

現病歴: 20XX年5月17日発熱を認めたため当院救急外来を受診。初診時の体温37.9°C, 心拍数166回/分, 呼吸数32回/分であり, 血液検査と血液培養検査, 迅速抗原検出検査(咽頭A群連鎖球菌・咽頭アデノウイルス), 胸部X線検査が実施された。咽頭A群連鎖球菌および咽頭アデノウイルスはそれぞれイムノエース Strepto<sup>®</sup>A, イムノエース<sup>®</sup> アデノ(タウンズ)を用いて検査を行った。

初診時検査所見ではWBC  $21.1 \times 10^3 / \mu\text{L}$  の上昇を認め, 白血球分画はNeutrophil61%, Lymphocytes36%, Monocyto3%であった(表1)。胸部X線写真では左肺門部の気管支陰影が増強していた。急性気管支炎と診断されたが呼吸は促進しており, 酸素投与が必要なため, 入院となった。

抗菌薬療法は血液培養提出翌日より, Ampicilin/Sulbactam (ABPC/SBT) が投与開始され, 体温は同日には解熱した。全身状態は改善したが, 入院日に提出した血液培養検査が5月20日に陽性となり, 全身性炎症反応症候群(systemic inflammatory response syndrome; SIRS)を満たしており敗血症と診断された。ABPC/SBT点滴投与を5日間実施した。5月21日WBC  $8.5 \times 10^3 / \mu\text{L}$ , CRP 0.06 mg/dLと炎症反応の低下を認め, 全身状態良好なため5月23日退院となった。同日, 検査室より主治医に嫌気性菌疑いで検査を進めているが, サブカルチャーに難澁しており, 現在コロニーの発育を認めていないため, 同定, 感受性検査結果が報告できるのは, 少し時間がかかりそうであることを報告した。退院後, Amoxicillin/Clavulanate acid (AMPC/CVA)を10日間内服し,

著者連絡先: (〒683-8504) 鳥取県米子市西町36-1  
鳥取大学医学部附属病院検査部  
仲田佑未  
TEL: 0859-38-6825  
FAX: 0859-38-6820  
E-mail: ymaeda-ttr@umin.ac.jp

表1 初診時検査所見

Biochemistry				Complete blood count	
Na	139 mmol/L	AST	62 U/L	WBC	21.1×10 <sup>3</sup> /μL
K	4.3 mmol/L	ALT	48 U/L	RBC	5.42×10 <sup>6</sup> /μL
Cl	103 mmol/L	ALP	810 U/L	Hgb	15.2 g/dL
BUN	16.2 mg/dL	γ-GT	188 U/L	Hct	45.8 %
Cre	0.18 mg/dL	LD	297 U/L	PLT	306×10 <sup>3</sup> /μL
TP	7.0 g/dL	CRP	0.51 mg/dL	Neut	61 %
Alb	4.0 g/dL			Lymph	36 %
				Mono	3 %
Rapid antigen detection test					
Group A streptococci (-) Adenovirus (-)					

抗菌薬終了となった。6月12日に菌名、19日に感受性結果を主治医に報告し、検査終了となった。

## 細菌学的検査

### 1. 血液培養検査

救急外来受診時に静脈血培養検査が実施された。血液培養検査にはBacT/ALERT 3D微生物培養検査システム（シスメックス・バイオメリュー）を使用し、専用培養ボトルの小児用PF plus ボトル（シスメックス・バイオメリュー）で行った。血液培養検査開始62.5時間後（微生物担当者不在の当直直帯）に陽性となった。陽性となった培養液のグラム染色（Bart-holomew & Mittwer 法、和光純薬）では細長い紡錘状のグラム陰性桿菌を認めた（図1）。

5月21日陽性ボトルから採取した菌液を用いて、rapid BACproII（ニッターボーメディカル）で処理し、質量分析装置MALDI Biotyper（version 3.1.6）を用いて同定を試みた結果、最上位検出菌は *Leptotrichia trevisanii*、スコアは1.419でnot reliableであった。

### 2. 血液培養ボトルからの菌の分離

サブカルチャーにはバイメディア<sup>®</sup>羊血液寒天培地 M58/ドリガルスキー改良培地（栄研化学）を用い、35℃、5%炭酸ガス環境下で培養したが翌日には発育は認めなかった。そのため、羊血液寒天/チョコレートEXII培地（日本水製薬）、プルセラHK寒天培地（極東製薬）を追加し、35℃、それぞれ5%炭酸ガス環境下、嫌気環境下で培養した。また、増菌培地としてHK半流動生培地（極東製薬）も追加した。1週間培養継続するも平板培地での発育は認められなかった。HK半流動生培地には翌日発育を認め、混濁部分のグラム染色を実施したところ、血液培養陽性時のボトル内溶液と同様の所見であった。HK半流動生培地から羊血液寒天培地（極東製薬）を用いて35℃、5%炭酸ガス環境下で、羊血液寒天/チョコレートEXII培地、プルセラHK寒天培地を用いて35℃、嫌気環境下でサブカルチャーを行った。1週間培養継続するもいずれの培地からも菌の発育を認めなかった。HK半流動生培地でサブカルチャーを繰り返し、平板培地でサブカルチャーを実施したが、菌の発育は認められなかった。

血液培養陽転後9日目、ヒト血液9 mLに培養液1 mLを加えて新しい血液培養ボトル（好気用FA plus培養ボトル、嫌気用FN plus培養ボトル、以上シスメックス・バイオメリュー）に接種し、再培養を実施した。46.0時間後に嫌気用

FN plus培養ボトル、56.1時間後に好気用FA plus培養ボトルが陽転したため、その培養液を遠心し、得られた沈渣を羊血液寒天/チョコレートEXII培地、およびアネロコロンビアRS培地（日本ベクトン・ディッキンソン）を用いて嫌気環境下でのサブカルチャーを実施した結果、48時間後に両培地より微小な白色のコロニーの発育を認めた（図2）。コロニーは無臭、溶血は認められなかった。発育したコロニーのグラム染色像は培養液のグラム染色所見と同様な細長い紡錘状のグラム陰性桿菌を示した（図3）。

### 3. 同定検査

カタラーゼ試験は陰性、その他の生化学的性状はラピッドID 32 A（シスメックス・バイオメリュー）を使用した。その結果、α-ガラクトシダーゼ陰性、β-ガラクトシダーゼ陰性、α-グルコシダーゼ陽性、β-グルコシダーゼ陽性であった。本菌を塗布した羊血液寒天培地に、*Staphylococcus aureus* を画線し、35℃、5%炭酸ガス環境下でサブカルチャーを行った。48時間後に *S. aureus* 周辺で菌の発育が増強した（図4）。得られたコロニーを用いて質量分析装置MALDI Biotyperにて同定を行ったが、菌種同定には至らなかった。精査のため、16S rRNA 遺伝子解析を実施した。菌株からDNAを抽出した後、ブロード・レンジPCRで16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を増幅して塩基配列を決定し、基準株の塩基配列との相同性を比較・検討した。その結果、*Leptotrichia hongkongensis* の基準株（HKU24）と99.8%（1266/1268）の相同性であったことから本菌種と同定された。

### 4. 薬剤感受性検査

アネロコロンビアRS培地およびEtest（シスメックス・バイオメリュー）を用いた。35℃、嫌気環境下で48時間培養を行い、判定を行った（表2）。ニューキノロン系抗菌薬のMICは高値を示したが、その他の薬剤のMICは低値を示した。

## 考 察

*Leptotrichia* 属菌はヒトの口腔内及び腸管内に常在する偏性嫌気性グラム陰性桿菌である<sup>1)~8)</sup>。*Leptotrichia* 属は偏性嫌気性菌であるが、5%炭酸ガス培養下でも発育可能な菌種が存在する<sup>2)</sup>。血液培養では嫌気ボトルからだけではなく好気ボトルから検出される場合もあると報告されており<sup>3)~5)</sup>、今回の症例は小児ボトルからの検出であった。

また、*Leptotrichia* 属は、免疫能低下患者において様々な

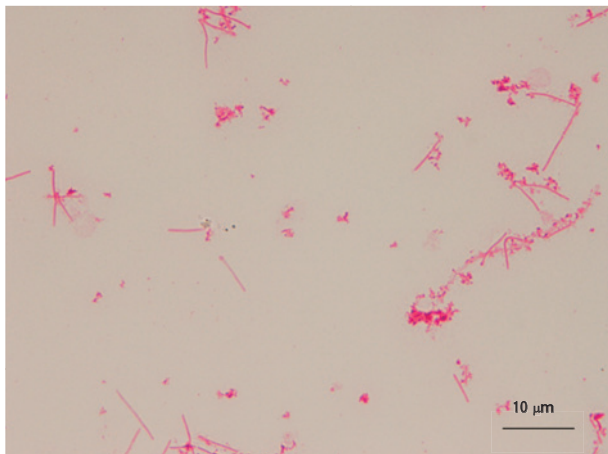


図1 血液培養ボトル内溶液のグラム染色所見  
細長い紡錘状のグラム陰性桿菌を認めた(×1,000 Bartholomew&Mittwer)。

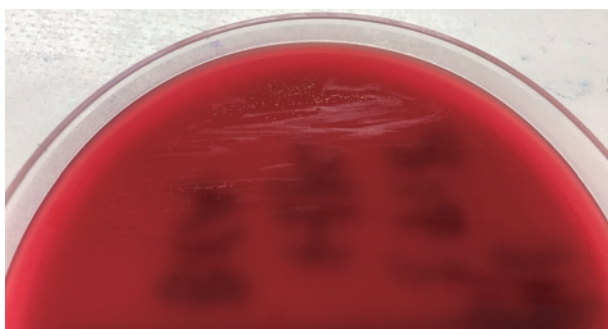


図2 アネロコロンビアRS培地に発育した *Leptotrichia hongkongensis*  
血液培養陽性ボトル内溶液を血液培養ボトルで継代し、陽転後培養液の沈渣をアネロコロンビアRS培地に接種し、35℃、嫌気条件下、48時間培養した集落。微小な白色コロニーの発育を認めた。

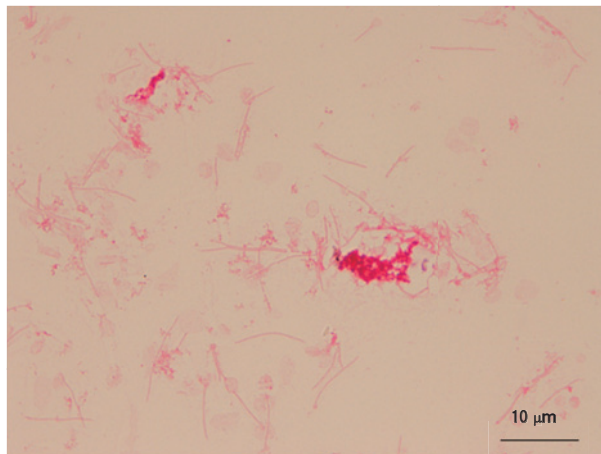


図3 分離菌のグラム染色所見  
アネロコロンビアRS培地に発育したコロニー(35℃、嫌気条件下、48時間培養)のグラム染色所見(×1,000 Bartholomew&Mittwer)。発育したコロニーのグラム染色像は培養液のグラム染色所見と同様な細長い紡錘状のグラム陰性桿菌を示した。

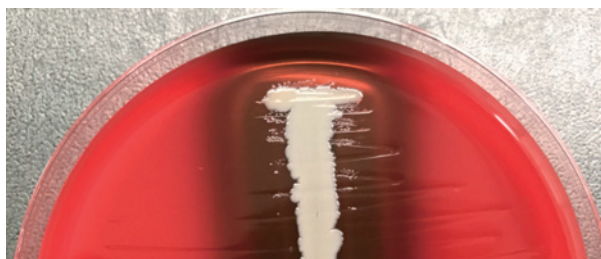


図4 羊血液寒天培地での衛星現象  
本菌を塗布した羊血液寒天培地に、*Staphylococcus aureus* を画線し、35℃、5%炭酸ガス環境下、48時間培養した集落。*S. aureus* 周辺で菌の発育が増強した。

感染症を起こすことが知られている<sup>1)~8)</sup>。今回我々が経験した症例の菌のエントリーは、経管栄養により損傷した腸管粘膜、または誤嚥性肺炎による肺末梢からの混入が考えられた。

*Leptotrichia* 属菌は以前から *L. buccalis*, *L. goodfellowii*, *L. hofstadii*, *L. shahii*, *L. trevisanii*, *L. wadei* の6菌種が確認されていたが、新たに *L. hongkongensis* が確認され7菌種となった<sup>1)</sup>。*Leptotrichia* 属の報告は近年多くされているが、その多くは *L. buccalis* や *L. trevisanii* であり<sup>3)4)</sup>、本邦での *L. hongkongensis* の報告はない。また、海外での *L. hongkongensis* は菌血症で分離された症例はある<sup>1)</sup>が、症例数は少ない。そのため、一般的に使用されている同定キットや質量分析装置には本菌種がライブラリーに収録されておらず、同定不能または類縁菌種の誤同定となり、本菌の存在が明らかにされにくい要因になっているものと思われる。今回の場合も MALDI Biotyper では良好な波形は得られたものの、ライブラリー (Version 3.1.66.0) にないため、同定不能となった。発育後のコロニーを用いた質量分析装置を用いた同定では、菌種同定に至らなかった原因としては、培地への

表2 *Leptotrichia hongkongensis* の薬剤感受性試験結果

Antimicrobial agents	MIC (μg/mL)
Ampicillin/Sulbactam	≤0.01/0.005
Piperacillin/Tazobactam	≤0.01/0.0025
Ceftriaxone	0.125
Imipenem	0.125
Meropenem	0.032
Ciprofloxacin	>32
Minocyclin	0.032
Metronidazole	≤0.01

発育が極めて悪かったことも一因と考えられる。

*L. hongkongensis* は血液培養ボトルからのサブカルチャーに難渋した場合、継代培養することで分離培養可能であったという報告がある<sup>1)</sup>。本症例でも、グラム染色で菌は確認できたが、サブカルチャーに難渋し、血液培養ボトルで継代することで分離可能であった。HK 半流動生培地は今回使用した嫌気培養用培地であるプルセラ HK 寒天培地組成に



表3 *Leptotrichia* 属の生化学的性状

菌種	CAT	α-Gal	β-Gal	α-Glu	β-Glu
<i>L. buccalis</i>	-	+	-	+	+
<i>L. goodfellowii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. hofstadii</i>	+	-	-	+	+
<i>L. shahii</i>	+	-	-	+	-
<i>L. trevisanii</i>	+	-	-	+	+
<i>L. wadei</i>	+	-	-	+	+
<i>L. hongkongensis</i>	-	-	-	+	+
This case	-	-	-	+	+

CAT, catalase ; Gal, galactosidase ; Glu, glucosidase。  
文献1) 3) より引用

加えギ酸ナトリウム、フマル酸ナトリウムの添加により嫌気性菌の発育支持能力を高め、チオグリコール酸ナトリウム、塩酸システインの添加により、培地の酸化還元電位を低く保つことが可能となり、嫌気性菌の発育環境を良好にし、また、Pre-Reduced and Anaerobically Sterilized : PRAS 培地であり、平板培地に比べより厳密に嫌気状態が保たれているため、翌日発育を認めることができたと考えた。また血液培養ボトルを用いて継代培養し、陽性となったボトル内溶液を集菌し培地に塗布した結果コロニー化した理由としては、血液培養ボトルの組成が不明であるため、詳細は不明であるが、血液培養ボトルで継代することにより分離できた症例<sup>1)</sup>が報告されており、血液培養ボトルで継代することにより、菌発育能力を高めたのではないかと考えられた。発育後のコロニーの生化学的性状と血液培養ボトル内溶液からの直接同定で候補となった *L. trevisanii* の典型的な生化学的性状と比較すると、カタラーゼ試験の結果が乖離していた (表3)<sup>1)3)</sup>。また、*L. hongkongensis* を塗布した培地に *S. aureus* を画線することにより発育が増強されるという特徴が報告されており<sup>1)</sup>、本菌も同様な性状を認めた。したがって生化学的性状も含め、16S rRNA による遺伝学的解析結果の *L. hongkongensis* を支持するものであった。

*Leptotrichia* 属菌の抗菌薬に対する感受性はβ-ラクタム系薬のMICは低値を示すが、ニューキノロン系薬のMICは高値を示す株が報告されている<sup>2)~4)</sup>。*L. hongkongensis* の報告においても、同様な傾向を示しているがニトロイミダゾール系薬に耐性を示すという報告<sup>1)</sup>がされている。しかしながら、今回分離された株はニトロイミダゾール系薬に感受性であり、既報とは異なる結果となった。しかしながら、*L. hongkongensis* の報告が少ないため、さらに症例が報告されることが望まれる。今回使用されていたABPC/SBTのMICは低値を示しており、敗血症の治療に有効であったと考えられた。

臨床材料から分離される大半の菌は、自施設でサブカルチャーを実施し同定することができるが、まれにサブカルチャーに難渋する菌や同定することのできない菌に遭遇することがある。このような場合、どのようにサブカルチャーし、同定していけば良いか、検査室のデータベースとして残しておくこと、また、自施設で困難な場合は必要に応じ外部施設

に菌種同定を依頼することも重要である。

通常 *Leptotrichia* 属菌は嫌気環境下で発育し、特別な培養法を必要としないが、今回のケースはサブカルチャーに難渋し、ヒト血液を加えた血液培養ボトルで継代することにより分離し得た症例であった。また質量分析の最新のデータベースであっても *L. hongkongensis* は登録がなく、各種同定キットでも同定困難であるため、本菌の同定には遺伝子解析が有用であったが、検査室の大小の規模を問わず実施することのできるグラム染色所見の特徴や生化学的性状は本菌種同定の一助となると考えられた。

要旨は第29回日本臨床微生物学会 (平成30年2月 岐阜市) にて発表した。

利益相反：申告すべき利益相反なし

## 文 献

- 1) WOO, P. C. Y., S. S. Y. WONG, J. L. L. TENG, et al. 2010. *Leptotrichia hongkongensis* sp. nov., a novel *Leptotrichia* species with the oral cavity as its natural reservoir. J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol) 11: 391-401.
- 2) Eribe, E.R., I. Olsen. 2008. *Leptotrichia* species in human infections. Anaerobe 14: 131-137.
- 3) 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.
- 4) 川島千亜紀, 澤村治樹, 横山明孝, 他. 2016. 血液培養より *Leptotrichia trevisanii* が検出された一症例. 日臨微誌 26: 131-135.
- 5) Coorman, S., C. Schuermans, J. Van Schaeren, et al. 2011. Bacteraemia caused by *Leptotrichia trevisanii* in a neutropenic patient. Aneerobe 17: 1-3.
- 6) Couturier, M. R., E. S. Slechta, C. Goulston, et al. 2012. *Leptotrichia* Bacteremia in Patients Receiving High-Dose Chemotherapy. Journal of Clinical Microbiology 50: 1228-1232.
- 7) 渡部邦友. 2006. いわゆる嫌気性菌が関与する感染症に関する細菌の話題. 感染症学雑誌 80: 76-83.
- 8) 寺岡千織, 森下奨太, 室田博美, 他. 2017. 血液腫瘍患者における *Leptotrichia goodfellowii* による血流感染症の1例. 医学検査 66: 570-575.

A case of *Leptotrichia hongkongensis* sepsis caused that it could be isolated by subculturing with a blood culture bottle

Yumi Nakada<sup>1)</sup>, Hiromi Murota<sup>1)</sup>, Shota Morishita<sup>1) 3)</sup>, Chiori Teraoka<sup>1)</sup>,  
Yuko Tanaka<sup>1)</sup>, Kiyofumi Ohkusu<sup>2)</sup>, Hiroki Chikumi<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Clinical Laboratory, Tottori University Hospital

<sup>2)</sup>Department of Microbiology, Tokyo Medical University

<sup>3)</sup>Department of Infection Control and Prevention, Tottori University Hospital

We encountered a case of sepsis caused by *Leptotrichia hongkongensis*. A 1-year-old girl was admitted to our hospital with fever. The blood culture turned out to be positive in the child bottle. Fusiform gram-negative rods were observed in a gram stain of the blood culture, although no bacterial growth was observed in the subcultures. Then, another blood culture was carried out by adding the first positive culture to human blood and inoculating new blood culture bottles with this mixture. In the second blood culture, the anaerobic bottle was found to be positive after 46 h of incubation. Bacterial growth was observed after anaerobic cultivation for 48 h on sheep blood agar / chocolate agar medium (Nissui Pharmaceutical) and Anero Columbia RS ager medium (Becton Dickeinson and Company). The isolated bacteria were catalase test negative,  $\alpha$ -galactosidase negative,  $\beta$ -galactosidase negative,  $\alpha$ -glucosidase positive, and  $\beta$ -glucosidase positive. The isolated colony could not be identified with a MALDI Biotyper mass spectrometer (Bruker Daltonics), but was identified as *L. hongkongensis* via 16S rRNA genetic analysis. Based on the results of the gram staining, biochemical tests, and 16S rRNA genetic analysis, we comprehensively identified the bacteria as *L. hongkongensis*.