

[症例報告]

海外渡航歴のない日本人男性の血液培養から新規 *Brucella* 属菌を検出した一症例

加藤亮介¹⁾・井出京子¹⁾・上原雅江¹⁾・仲野 惟²⁾・池添正哉²⁾

岡田邦彦³⁾・嶋崎剛志³⁾・木村昌伸⁴⁾・今岡浩一⁴⁾

¹⁾ 佐久医療センター臨床検査科

²⁾ 佐久医療センター腎臓内科

³⁾ 佐久医療センター救命救急センター

⁴⁾ 国立感染症研究所獣医科学部

(令和2年2月26日受付, 令和2年5月25日受理)

ブルセラ症は *Brucella* 属菌によって引き起こされる世界的に重要な人獣共通感染症であるが, 家畜衛生対策が進んだ日本では家畜ブルセラ菌感染例は輸入例に限られている。今回我々は, 海外渡航歴のない日本人男性の血液培養より *Brucella* 属菌が分離された症例を経験した。当該菌の精査の結果, これまで日本では報告されていない *B. suis* biovar 5 に近縁な *Brucella* 属菌と確認され, 治療に用いられることが多い Rifampicin に耐性を示した。本菌の感染経路や国内における分布は不明ではあるが, 国内に定着している可能性も否定できないことから, 不明熱を呈する患者の血液培養から同定不能なグラム陰性小桿菌が検出された場合は, 本菌も考慮し可能な限り詳細な同定検査が望まれる。

Key words: 人獣共通感染症, *Brucella suis* biovar 5, 国内感染

序 文

ブルセラ症は *Brucella* 属菌により引き起こされる世界的に重要な人獣共通感染症である。*Brucella* 属菌は一属一種で, *B. melitensis* biovar *melitensis* や *B. melitensis* biovar *abortus* などと分類されるが, 自然宿主や人への病原性の違いなどから通常 *B. melitensis*, *B. abortus* などの旧表記が用いられる^{1)~3)}。日本では家畜伝染病予防法による家畜のブルセラ症対策が進み, 国内の家畜は清浄化している⁴⁾。そのため, ヒトが国内の家畜から家畜ブルセラ菌 (*Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) に感染することはないと考えられており, 感染の報告は輸入例に限られている¹⁾。今回, 海外渡航歴のない日本人男性の血液培養から *Brucella* 属菌を検出し, *B. suis* biovar 5 に近縁な *Brucella* 属菌と同定された症例を経験したので報告する。

症 例

患者: 60代日本人男性

既往歴: 高血圧, 2型糖尿病 (HbA1c7% 台後半で推移, コントロール不良), 慢性腎不全 (Cre1.7 mg/dL 程度)

現病歴: 入院2ヶ月前より食欲不振を認めていた。また, 39°C を超える間欠熱が1週間程度持続していた。入院1ヶ月前の糖尿病内科定期受診時に肝逸脱酵素の上昇 (AST 14

→223 IU/L, ALT 9→409 IU/L) を認めており, 肝炎が疑われたが, 症状は改善していたため経過観察となっていた。また, 2週間前より夕方になると悪寒を自覚するようになり, さらなる食欲低下や吐き気, 下痢症状も認めていた。今回, 代謝性アシドーシスを伴う腎機能の急速な悪化を認めたため, 慢性腎不全の急性増悪で入院となった。入院時の血液検査データを示す (Table 1)。

入院経過 (Figure 1): 入院2日目に血液培養を2セット採取し BacT/ALERT 3D (ビオメリュー) にて培養を開始した。入院5日目に, 血液培養からグラム陰性桿菌を検出したため, 血液培養を再度2セット採取した後, 菌の形態から緑膿菌や嫌気性菌を考慮し Sulbactam/Cefoperazone の投与を開始した。入院8, 11日目に採取した血液培養からも同様のグラム陰性桿菌が検出されたことから, 先の抗菌薬では効果が乏しいと考え Tazobactam/Piperacillin および Gentamicin (GM) に変更した。入院14日目の血液培養で陰性化を確認した。その後, 入院23日目に, 分離菌が16S rRNA 遺伝子配列解析により *Brucella* sp. と判定され, ブルセラ症が疑われたため, Doxycycline (DOXY), Rifampicin (RFP) および GM に変更した⁵⁾。下痢や嘔吐, 食欲不振などの副作用により RFP は5日間で中止したが, DOXY を計6週間投与し, 治療を終了した。その後, 患者にはブルセラ症の再燃は認められていないが, 治療後も腎機能は回復せず, 維持透析導入となっている。

臨床微生物学的検査: 入院2日目に採取された血液培養の好気ボトルが70時間後に陽性となり, グラム陰性桿菌を認めた (Figure 2 (A))。後日再採取された血液培養6セットのうち4セットの好気ボトルからも同一菌を認めた。塗抹所見は小型で *Haemophilus* 属菌を疑った。サブカルチャー1

著者連絡先: (〒385-0051) 長野県佐久市中込 3400 番地 28
佐久医療センター臨床検査科
加藤亮介
TEL: 0267-62-8181
FAX: 0267-88-7324
E-mail: kato.ryosuke@sakuhp.or.jp

Table 1. 入院時血液検査所見

| | | | | | |
|-----|--------------------------|-------|-------------|------|--------------|
| WBC | 6.8×10 ³ /μL | TP | 5.7 g/dL | pH | 7.332 |
| RBC | 360×10 ⁴ /μL | Alb | 2.5 g/dL | PCO2 | 21.0 mmHg |
| Hb | 10.4 g/dL | T-Bil | 0.4 mg/dL | PO2 | 102.1 mmHg |
| Ht | 29.5 % | AST | 8 IU/L | HCO3 | 10.9 mmol/L |
| PLT | 17.5×10 ⁴ /μL | ALT | 25 IU/L | BE | -13.2 mmol/L |
| | | LD | 325 IU/L | AG | 17.8 mmol/L |
| | | ALP | 369 IU/L | | |
| | | γ-GT | 105 IU/L | | |
| | | UN | 105 mg/dL | | |
| | | CRE | 12.39 mg/dL | | |
| | | eGFR | 4 | | |
| | | CRP | 2.64 mg/dL | | |
| | | Na | 133 mEq/L | | |
| | | K | 5.5 mEq/L | | |
| | | Cl | 107 mEq/L | | |

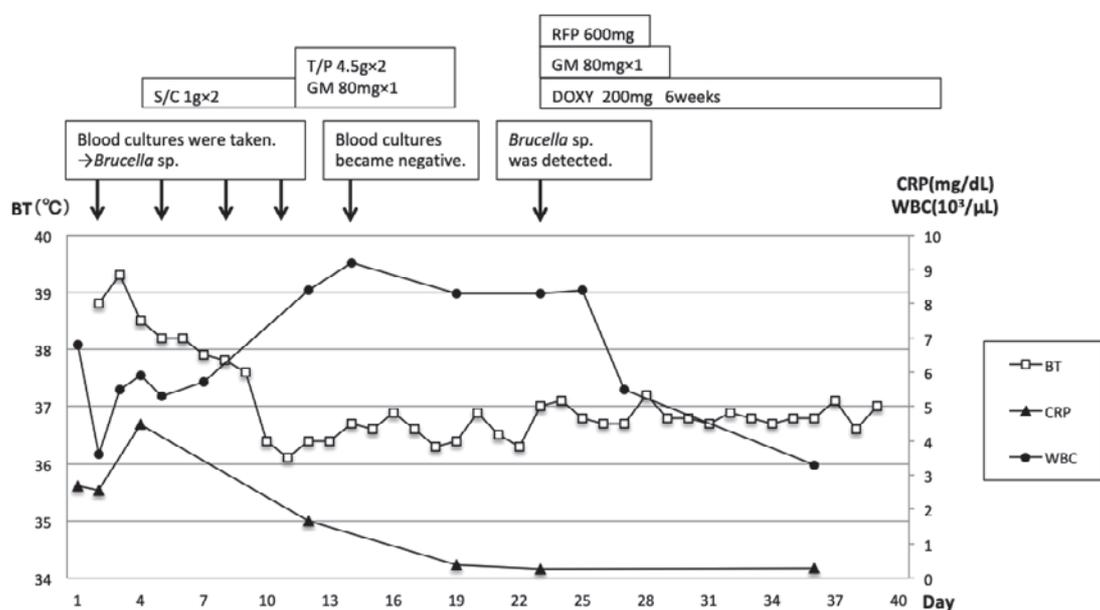


Figure 1. 臨床経過

S/C : Sulbactam/Cefoperazone, T/P : Tazobactam/Piperacillin, GM : Gentamicin, RFP : Rifampicin, DOXY : Doxycycline

日目にヒツジ血液寒天培地およびチョコレート寒天培地に約 1 mm のスムーズコロニーの発育を認めた (Figure 2 (B))。オキシダーゼ陽性, カタラーゼ陽性であった。BTB 乳糖加寒天培地で発育しないことから, 栄養要求の強いグラム陰性桿菌を疑い ID テスト HN-20 ラピッド (日水製薬) を行ったが同定には至らなかった。培養 2 日目以降, BTB 乳糖加寒天培地に発育を認めたためブドウ糖非発酵菌を疑い, MicroScan Neg NF combo 1J (ベックマン・コールター) にて検査を行い “Morax/Psychr spp” との結果を得たが, 確定には至らなかった。さらに BBL CRYSTAL E/NF (日本 BD) でも同定には至らなかった。各種微生物同定キットまたは機器による判定結果を示す (Table 2)。医師と相談し, 患者は糖尿病患者であり免疫不全があることから, 詳細な同定検査

を実施することとなった。外部検査機関にて質量分析法による同定検査を実施したが, 同定不能との結果であった。そこで, 民間検査機関に簡易 16S rRNA 遺伝子解析 (688 bp) を外注したところ, *Brucella* sp. と判定されたことから, 行政検査として国立感染症研究所に菌株および患者血清を送付し検査を実施した。患者血清を用いた抗体検査 (試験管内凝集反応) では, *B. abortus* に対する抗体は 160 倍 (陽性は 40 倍以上), *B. canis* に対する抗体は 20 倍 (陽性は 160 倍以上) と, 家畜ブルセラ菌に対する抗体が陽性であった。菌株の PCR 検査⁶⁾では *B. suis* のパターンを示したが, 国内において *B. suis* はすでに清浄化されている⁴⁾ことから, 他の菌種の可能性を考慮し, 16S rRNA 遺伝子解析と多遺伝子座配列解析 (Multilocus sequence analysis : MLSA) による系統樹

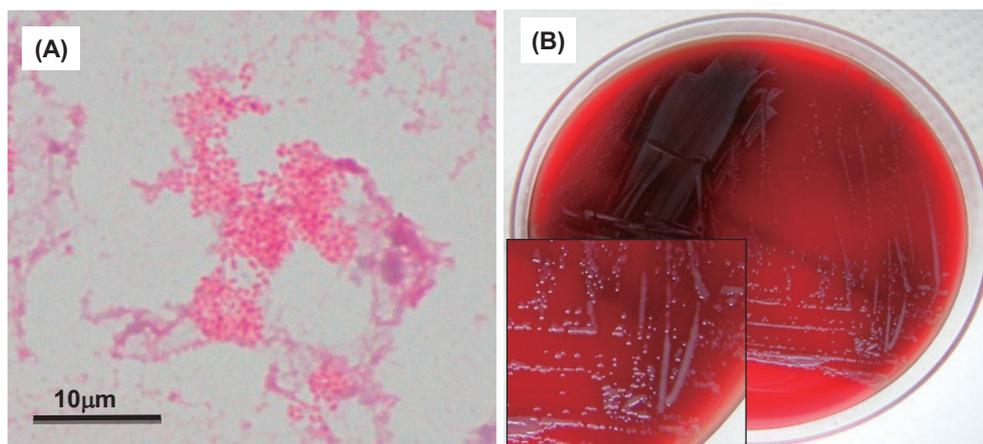


Figure 2. (A) 血液培養のグラム染色像 (×1,000, フェイバー G, サフラニン), (B) 分離菌株のコロニー (ヒツジ血液寒天培地, 48 時間培養)

Table 2. 各種微生物同定キットまたは機器による判定結果

| 同定キット名 | 会社名 | 同定菌種 | プロファイル No |
|---------------------------|-------------|------------------|-----------|
| ID テスト HN-20 ラピッド「ニッスイ」 | 日水製薬 | 該当菌無し | 7130002 |
| MicroScan Neg NF combo 1J | バックマン・コールター | Morax/Psychr spp | |
| BBL CRYSTAL E/NF | 日本 BD | その他グラム陰性桿菌 | 3110000 |

解析を行った⁷⁾。その結果、当該菌株は *B. suis* biover 5 と近縁な *Brucella* 属菌であることが明らかとなった (Figure 3)。

当該菌株の薬剤感受性検査は Etest (バイオメリュー) を用いて実施した。McFarland 0.5 に調整した菌液を 5% ヒツジ血液ミューラーヒントン寒天培地 (日本 BD) に塗布し、各薬剤の Etest ストリップを静置した後、37°C で 48 時間培養し判定した。結果を Table 3 に示す。なお MIC カテゴリーは CLSI M45 を用いて判定した。基準の無い RFP および Ciprofloxacin については文献に準じ^{8)~12)}、*Haemophilus influenzae* の判定カテゴリーを使用した。

検査を担当した検査技師 3 名は菌への曝露の可能性が高いと判断され、3 週間の DOXY および RFP 予防内服¹⁵⁾と、0, 6, 12, 18 週間の血清抗体価フォローを実施したが、抗体価の上昇は認められなかった。

本症例患者については、聞き取り調査および自宅周辺の環境調査を行っている。居住地は民家のまばらな人里離れたところで、猫・鶏を飼育し、イヌも 3~4 年前までは飼育していた。キツネ、タヌキやアライグマなどの野生動物もまれに出没し、追い払う際に接触したことはあるが、げっ歯類との明らかな接触歴は無かった。乳製品や羊肉、馬肉は市販物の購入のみであった。また、自宅周辺の土壌、鶏舎糞、シカ糞等を採取し分離培養を試みたが *Brucella* 属菌およびその遺伝子は検出されず、感染経路等の特定には至らなかった。

なお、本菌および本症例の取り扱いについて、厚生労働省及び農林水産省の担当部局に問い合わせを行った。その結果、現状においては、本菌は感染症法に定めるブルセラ属菌種 (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*) に該当するとは確定されていないことから、本感染症は感染症法に基づく

感染症発生動向調査による 4 類感染症には該当せず、また、本菌は特定病原体にも該当しないと、厚生労働省により判断されている。さらに本菌は、家畜伝染病予防法上のブルセラ病対象動物 (牛, めん羊, 山羊, 豚, 水牛, しか, いのしし) において、感染が確認されていないことから家畜伝染病病原体には該当しないと、農林水産省により判断されている。

考 察

ブルセラ症は *Brucella* 属菌による世界的に重要な人獣共通感染症である^{1)~3)}。感染家畜では、流産や不妊など繁殖障害が認められ、飼育群内に速やかに感染が拡大し、畜産農家に多大な経済的損失と感染リスクをもたらす⁴⁾。家畜ブルセラ菌のヒトへの感染は、感染動物の加熱殺菌が不十分な乳・チーズなど乳製品や肉の喫食による経口感染が最も一般的であり、家畜の流産仔や悪露への接触、汚染エアロゾルの吸入でも感染する^{1)~4)}。日本国内の犬の 3% 程度が感染しているイヌブルセラ菌 (*B. canis*) については、ヒトの *B. canis* 感染者が毎年報告されている¹⁾。一方、家畜伝染病予防法による家畜ブルセラ症対策により、国内の家畜はすでに清浄化しており⁴⁾、現在では家畜ブルセラ菌感染報告は輸入例に限られている¹⁾。本症例では海外渡航歴や感染原因と考えられる輸入食品等の喫食歴が無いことから、海外での感染や海外からの汚染飲食物等の喫食等による感染は否定的であり、国内に存在していた菌に、国内で感染した可能性が高い。

MLSA による遺伝子解析の結果では、当該菌は *B. suis* biover 5 に近縁であった。*B. suis* は biover 1 から 5 に分類されており、biover 1 から 4 は主にブタやいのしし、野ウサギなどを宿主としており、中でも biover 1, 3 はヒトで一般的な *B. suis* 感染症の原因菌である¹³⁾。一方、biover 5 は南

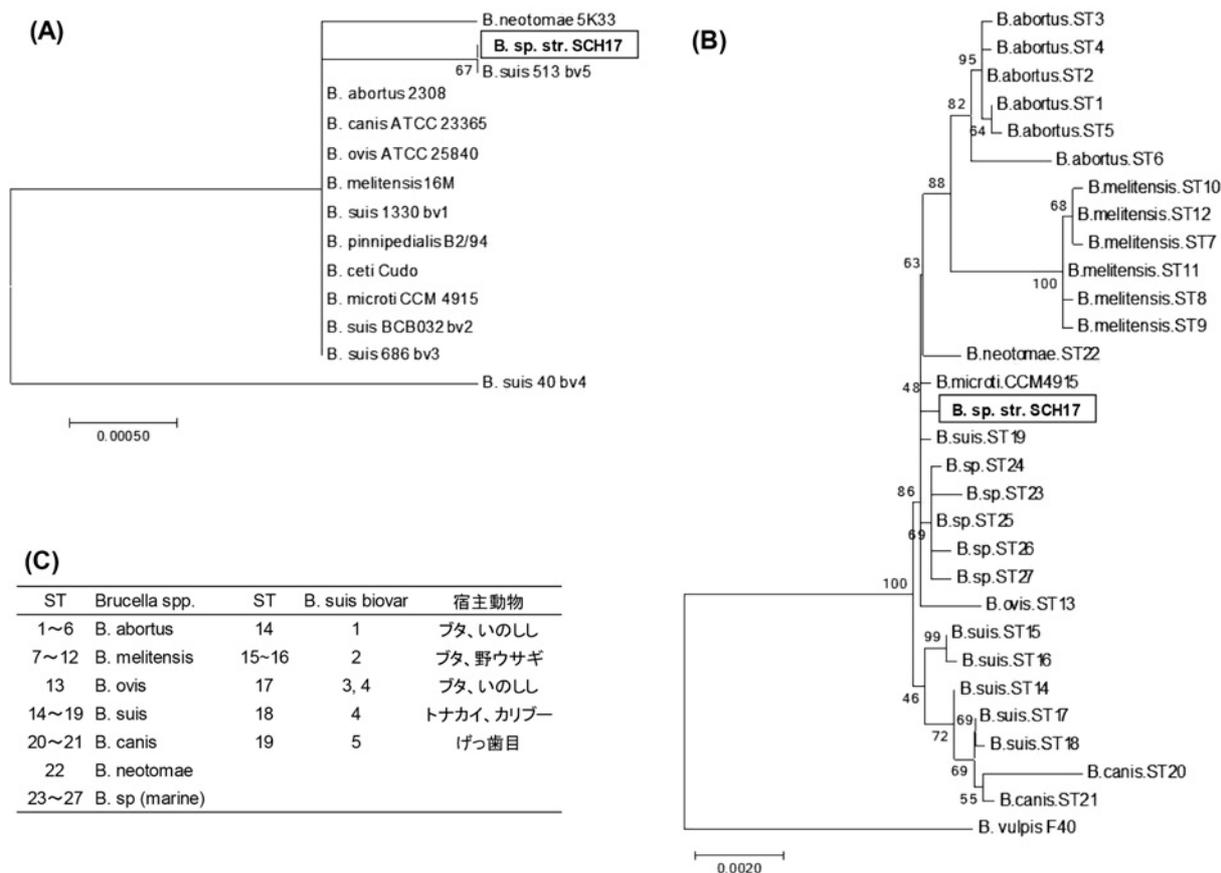


Figure 3. MEGA7 を用いて NJ 法により系統樹を推定・作成した。ブランチ横にブートストラップ値 (1000 回複製) を表示した。枝長, 縮尺は推定に用いられた進化距離と同じ縮尺で記載 (p-distance) した。(A) 16S rRNA 遺伝子 (1,464 bp), (B) 9 座の連結配列 (4,396 bp) : aroA (565 bp), coQ (422 bp), dnaK (470 bp), gap (589 bp), glk (475 bp), gyrB (469 bp), int-hyp (430 bp), omp25 (490 bp), trpE (486 bp), (C) シーケンスタイピング (ST1 ~ 27) と菌種および *B. suis* における宿主動物

Table 3. 分離菌株の薬剤感受性 (MIC)

| Antimicrobial agents | MIC (ug/mL) | 判定 |
|-------------------------------|-------------|----|
| Benzylpenicillins | 0.38 | S |
| Ceftriaxone | 0.25 | S |
| Imipenem | 0.5 | S |
| Gentamicin | 0.094 | S |
| Tetracycline | 0.094 | S |
| Doxycycline | 0.25 | S |
| Ciprofloxacin | 0.25 | S |
| Chloramphenicol | 0.75 | S |
| Sulfamethoxazole/Trimethoprim | 0.094 | S |
| Rifampicin | 12 | R |

コーカサス地方の野生のげっ歯目から分離報告された¹³⁾。今回実施した系統樹解析の結果からは、本症例の検出菌および *B. suis* biover 5 が、他の *B. suis* biover1~4 と遺伝子学的に離れていることが明らかになった。また、*B. melitensis* や *B. abortus* とも遺伝子学的に離れており、本症例の検出菌および *B. suis* biover 5 が、いわゆるヒトに感染する主要な *Brucella* 属菌とは異なることが推測された。我々がこの

菌を検出した翌年に、長野県内の他施設の患者から、本症例と同様な *B. suis* biover 5 と近縁な菌が分離された¹⁴⁾。そのブルセラ症患者が報告された地域が、近隣であることから、長野県内に当該菌および宿主動物・感染源が存在している可能性が示唆される。Zesludkov ら¹³⁾は、*B. suis* biover 5 が患者および複数の患者が発症前に接触した猫から菌が検出された事実から、猫が自然宿主であるげっ歯目から感染し、媒介した可能性を示唆している。今回の症例及び県内の他施設での検出例¹⁴⁾、どちらにおいても、患者には屋外と屋内を行き来する猫の飼育歴・接触歴があることから、猫が感染経路となった可能性が考えられる。

薬剤感受性検査により、本菌は RFP に耐性を示した。近年の報告では、モンゴル⁸⁾やトルコ⁹⁾では RFP に対する感受率は 96.5~97.8% とほとんど低下していないが、イラン¹⁰⁾やエジプト¹¹⁾、カタール¹²⁾など中東地域では 21.7~64.9% と低下が認められるなど、地域差はあるが RFP 耐性菌が報告されている。そのため、以前は成人の治療では DOXY + RFP が奨励されていたが¹⁵⁾、現在では DOXY + GM (+RFP) が推奨されている⁵⁾。今後、RFP は経口投薬できる利便性はあるが、RFP 耐性菌を考慮した抗菌薬選択も必要であると考えられた。

本菌は、自動同定機器や同定キットのみでは菌種同定が困難であったが、詳細な遺伝子学的な手法を用いることで同定に至った。本菌が国内に存在・伝播している可能性も考えられることから、主として不明熱の患者検体から本菌と同様の性状を示す菌の発育を認めた場合は、可能な限り詳細な菌種同定を行うことが望まれる。近年、質量分析装置が広く用いられるようになってきたが、ブルセラ属菌はバイオテロ防止の観点から、一般的な医療機関等で利用されている通常のデータベースには含まれておらず、同定不能と判定される。なお、MALDI バイオタイパー (Bruker) ではセキュリティーライブラリーを併用することで *Brucella* 属菌も同定可能である。一般病院で遺伝子学的な同定検査の実施は困難だが、今回のように、16S rRNA 遺伝子配列の解析だけでも外部委託することで菌種が絞られ、行政検査依頼等による詳細な菌種同定に結びつくと考えられた。

CDC (米国疾病対策センター) は *Brucella* 属菌が実験室・検査室内感染の多い細菌であるとして注意喚起を行っている¹⁶⁾。本症例では *Brucella* 属菌を全く考慮せず検査を行い、培地の観察時や同定キットへの接種時などに菌に曝露している可能性が生じたため担当検査技師は予防内服および抗体検査によるフォローアップを実施した⁵⁾。*Brucella* 属菌は質量分析装置や自動同定機器、同定キットの使用で、*Ochrobacterium anthropi* や *Moraxella phenylpyruvica* (現 *Psychrobacter phenylpyruvicus*) と誤同定されることが報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾。本症例でも MicroScan Neg NF Combo 1J パネルの使用で “*Morax/Psychr spp*” と同定された。*Brucella* 属菌の場合、各種同定キットの使用は、誤判定による検査室内感染のリスクを高めることとなるため注意が必要である¹⁶⁾¹⁹⁾。これらの菌に同定された場合は、*Brucella* 属菌である可能性もあるため、感染リスクを考慮し、検査設備の整備された専門施設に検査を依頼することが重要だと考えられた。今回は、患者に直近の渡航歴や犬の飼育が無く、当初からブルセラ症を疑うことは難しい事例であった。しかし、今回の例の様に、国内に *B. suis* biover 5 近縁菌が存在し、ヒトに感染しうることが明らかになったことを考えると、日頃から臨床検体や分離菌の取扱いなどに伴う、検査室におけるバイオリスクに注意しておく必要があると思われる。

なお、本症例は、第 30 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 (2019 年) において発表した。

謝辞：本報告における解析の一部は、AMED の課題番号 JP18fk0108017, JP19fk0108097 の支援を受けた。

利益相反：申告すべき利益相反はありません。

文 献

- 国立感染症研究所. 2012. ブルセラ症 1999 年 4 月～2012 年 3 月. 病原微生物検出情報 33: 183-185.
- 厚生労働省. 感染症法に基づく医師の届け出のお願い. http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansensho_u11/01-04-28.html 2019 年 10 月 23 日現在.
- Corbel, M.J. 2006. Brucellosis in humans and animals. World Health Organization.
- 星野尾歌織. 2012. 国内の家畜ブルセラ病. 病原微生物検出情報 33: 191-192.
- Skalsky, K., D. Yahav, J. Bishara, et al. 2008. Treatment of human brucellosis: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Br Med J* 336: 701-704.
- Imaoka, K., M. Kimura, M. Suzuki, et al. 2007. Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. *Jpn J Infect Dis* 60: 137-139.
- Whatmore, A.M., L.L. Perrett, A.P. Macnillan. 2007. Characterization of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiol* 7: 34.
- Liu, Z.G., D.D. Di, M. Wang, et al. 2018. In vitro antimicrobial susceptibility testing of human *brucella melitensis* isolates from Ulanqab of Inner Mongolia, China. *BMC Infectious Diseases* 18: 43.
- Sayan, M, S Kilic, M.H. Uyanik. 2012. Epidemiological survey of rifampicin resistance in clinic isolates of *Brucella melitensis* obtained from all regions of Turkey. *J Infet Chemother* 18: 41-46.
- Asadi, F.T., S.H. Hashemi, M.Y. Alikhani, et al. 2017. Clinical and Diagnostic Aspects of Brucellosis and Antimicrobial Susceptibility of *Brucella* Isolates in Hamedan, Iran. *Jpn J Infect Dis* 70: 235-238.
- Abdel-Maksoud, M, B. House, M. Wasfy, et al. 2012. In vitro antibiotic susceptibility testing of *Brucella* isolates from Egypt between 1999 and 2007 and evience of probable rifampin resistance. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 11: 24.
- Deshmukh, A., F. Hagen, O.Al. Sharabasi, et al. 2015. In vitro antimicrobial susceptibility testing of human *Brucella melitensis* isolates from Qatar between 2014-2015. *BMC Microbiol* 15: 121.
- Zeludkov, M.M., L.E. Tsirelson. 2010. Reservoirs of *Brucella* infection in nature. *Biology Brulletin* 37: 709-715.
- 小野寺翔, 山本智清, 内坂直樹, 他. 2018. 家族内に複数人の感染者を見た既存のブルセラ属菌とは異なるブルセラ属菌による感染事例. 病原微生物検出情報 39: 123-124.
- WHO. Joint FAO/WHO expert committee on brucellosis 6 th report (1986). <http://apps.who.int/iris//handle/10665/40202> 2020 年 4 月 20 日現在.
- CDC. Brucellosis Overview of Laboratory Risk. <https://www.cdc.gov/brucellosis/laboratories/risks.html> 2019 年 10 月 23 日現在.
- Poonawala, H., T.M. Conner, D.R. Peaper. 2018. The Brief Case: Misidentification of *Brucella melitensis* as *Ochrobacterium anthropi* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *J Clin Microbiol* 25: 56.
- Batchelor, B.I., R.J. Brindle, G.F. Gilks, et al. 1992. Biochemical mis-identification of *Brucella melitensis* and subsequent laboratory-acquired infection. *J Hosp Infect* 22: 159-162.
- 今岡浩一. 2017. ブルセラ症. *JBSA ニュースレター* 7: 7-13.

A case of detecting a novel *Brucella* sp. from blood cultures of a Japanese patient who has never been abroad

Ryosuke Kato¹⁾, Kyoko Ide¹⁾, Masae Uehara¹⁾, Yui Nakano²⁾, Masaya Ikezoe²⁾, Kunihiro Okada³⁾, Takeshi Simazaki³⁾, Masanobu Kimura⁴⁾, Koichi Imaoka⁴⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Saku Central Hospital Advanced Care Center

²⁾Department of Nephrology, Saku Central Hospital Advanced Care Center

³⁾Department of Emergency and Critical Care Medicine, Saku Central Hospital Advanced Care Center

⁴⁾Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases

Brucellosis is one of the important zoonotic disease worldwide caused by *Brucella* spp. Patients infected with livestock *Brucella* spp. are considered imported cases because of no endemic circulation of livestock *Brucella* spp. in Japan. Here we report a case isolated *Brucella* strain from blood culture from the Japanese patient with an undulant fever who has never been abroad. An isolate from the patient was closely related to *B. suis* biovar 5, which has not been reported in Japan, by phylogenetic analyses based on 16S rRNA gene and multilocus sequence analysis and showed resistance to Rifampicin by Etest. It is still obscure that the infection route, host animals and epidemiological feature, but this *Brucella* strain might be colonized in Japan, especially in the area of Nagano prefecture. When unidentifiable gram-negative bacilli are detected from blood cultures of patients with a fever of unknown origin, we should consider the possibility of *Brucella* spp. and perform identification tests as detailed and careful as possible.