

## [症例報告]

### 血液培養の陽性判定と同定に苦慮した *Gordonia sputi* による菌血症の1例

松原未来<sup>1)</sup>・宮部安規子<sup>1)</sup>・齊藤知子<sup>1)</sup>・瀬川俊介<sup>1)</sup>・鈴木 眞<sup>1)</sup>  
山下晃司<sup>1)</sup>・藤川 樹<sup>1)</sup>・村田正太<sup>1)</sup>・石和田稔彦<sup>2)3)</sup>・矢口貴志<sup>2)</sup>  
伊藤純子<sup>2)</sup>・奥主朋子<sup>3)</sup>・日野もえ子<sup>3)</sup>・川崎健治<sup>1)</sup>・松下一之<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 千葉大学医学部附属病院検査部

<sup>2)</sup> 千葉大学真菌医学研究センター

<sup>3)</sup> 千葉大学医学部附属病院小児科

(令和5年11月23日受付, 令和6年3月18日受理)

血液培養陽性判定と同定に苦慮した *Gordonia sputi* による菌血症の1例を経験した。患者は中心静脈カテーテル留置状態で自宅療養中に発熱した6歳女児。血液培養装置の陽性シグナル検知時はグラム染色等にて菌体が確認されず偽陽性と判定した。サブカルチャーし血液培養ボトルを装置へ再装填した後、再び陽性となった。サブカルチャーより発育を認めたコロニーの特徴や各種染色法の結果から、弱抗酸性を有する菌種と疑い、陽性報告を行った。後日、質量分析測定と遺伝子解析から本菌と同定した。本菌は自然界に広く分布し、弱抗酸性を有するグラム陽性桿菌である。免疫不全患者ではカテーテル関連感染症として *Gordonia* 属による感染症が散見され、同定の困難さが問題点となる。患者情報、コロニー、染色性などの情報から菌種推定し迅速な報告につなげることが重要である。また、陽性シグナルの複数回の検知時は菌体の存在を強く疑う必要がある。

**Key words:** *Gordonia sputi*, カテーテル感染, 免疫不全患者, 質量分析装置, 弱抗酸性

#### 序 文

*Gordonia* 属は、自然界に広く分布する弱抗酸性を有するグラム陽性桿菌で、1980年代後半に *Rodococcus* 属から分離、独立された<sup>1)</sup>。近年、中心静脈カテーテルや皮下埋め込み式ポートに関連した、*Gordonia* 属による感染症が散見される<sup>2)~4)</sup>。

微生物学的検査における問題点はその同定の困難さである。同定キットが存在せず、近年普及の進んでいる質量分析装置による同定でも正確な同定は難しい。また、*Gordonia* 属は、薬剤感受性検査で多くの抗菌薬に対するMICが低値を示すとされる<sup>5)</sup>、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の判定基準は存在しない。

今回我々は神経芽腫に対する免疫療法中の女児患者の血液培養から *G. sputi* を検出したので、その際の検査過程と得られた知見を報告する。

#### 症 例

患者：6歳、女児

主訴：発熱

既往歴：神経芽腫、オプソクロモス・ミオクロモス症候群、黄色ブドウ球菌によるカテーテル関連血流感染 (Catheter Related Bloodstream Infection : CRBSI)

現病歴：神経芽腫に対する維持療法として抗 disialoganglioside 2 抗体療法を施行していた。20XX年1月、4コース目を終了し中心静脈カテーテル (Central Venous Catheter : CVカテーテル) が留置された状態で退院した。受診15日前、自宅療養中に38-39℃台の発熱を繰り返したため、休日夜間に外来を受診 (第1病日) した。外来受診時の白血球数は7800/μL、CRPは2.95 mg/dLと軽度の炎症反応上昇を認めた。全身状態良好であったことから、血液検査と血液培養検査を実施後、Cefditoren pivoxil 処方の上、帰宅した。

臨床経過：第5病日、血液培養陽性連絡を受け、治療目的に入院となった。入院後CVカテーテルを抜去し、Meropenem (MEPM) の投与が開始された。第11病日に薬剤感受性結果に基づき、Ampicillin (ABPC) へ de-escalation された。心臓および腹部超音波検査にて心内膜炎および肝臓播種性病変は認められなかったが、胸部CT検査所見で敗血症性肺塞栓を示唆する結節影を認めたため、第21病日に退院後も Amoxicillin (AMPC) 経口投与が2週間継続された。入院後は発熱を認めず経過良好で、後遺症なども認めなかった。

微生物学的検査：

血液培養検査と塗抹鏡見・分離培養検査：BDバクテック23F好気用レズンボトル (好気ボトル) とBDバクテック22F嫌気用レズンボトル (嫌気ボトル) (両ボトル共に日本ベクトン・ディッキンソン：日本BD) を1セットとし、第1病日から2セットを血液培養自動分析装置BDバクテックFXシステム (日本BD) にて35℃で培養した。培養開始から54時間後、好気ボトルのみ2セットとも陽性シグナルを検知した。ただちにパーミーM染色セット (武藤化学) でグラム

著者連絡先：(〒260-8677) 千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1  
千葉大学医学部附属病院検査部  
松原未来  
TEL: 043-222-7171 (内線 6211)

染色と、メチレンブルー原液（武藤化学）でメチレンブルー染色を行ったが菌体は確認できなかった。陽性シグナル検知時の蛍光量を示す波形の上昇がゆるやかであった点も加味して偽陽性と判定し、血液培養ボトルは血液培養自動分析装置に再装填し、培養を継続した。サブカルチャーは TSAII5% 血液寒天培地（血液寒天培地）（日本 BD）、BY チョコレート寒天培地（チョコレート寒天培地）（日本 BD）、ポアメディアドリガルスキー改良培地（BTB 寒天培地）（栄研化学）で行い、35°C、CO<sub>2</sub> ガス 7% 存在下で培養した。再装填から 18 時間後、好気ボトル 1 セットのみ再度陽性シグナルを検知したが、1 回目と同様の手順で再度偽陽性と判定した。サブカルチャーも 1 回目と同様に行った。

なお、嫌気ボトルの 2 セットは 7 日間培養で陰性だった。また、第 5 病日入院時に採取された血液培養も好気ボトルのみ 2 セット陽性、MEPM 開始 2 日後の第 7 病日採取の血液培養は 2 セットすべて 7 日間培養で陰性だった。

同定検査：最初に陽性シグナルを検知した際、サブカルチャーした血液寒天培地とチョコレート寒天培地で培養 34 時間後に黄色の微小なコロニーを認めた（Fig 1）。BTB 寒天培地では以降も発育はみられなかった。コロニー形態より抗酸菌を疑い、グラム染色とチール・カルボールフクシン液（武藤化学）を用いて Ziehl-Neelsen 染色し、同時に MALDI バイオタイパー（BDAL ver.9）（ブルカー・ジャパン）を用いて質量分析装置による同定を試みた。抗酸菌を疑っていたが、グラム染色で抗酸菌様ではないグラム陽性桿菌（Fig 2A）であることを確認し、Ziehl-Neelsen 染色で青色（陰性）（Fig 2B）、また質量分析装置の結果で低スコアながら *Gordonia* sp. や *Tsukamurella* sp. が候補として挙げたことをふまえ、追加で Kinyoun 染色<sup>6</sup>を行った。Kinyoun 染色では赤く染まった（陽性）（Fig 2C）ことから、弱抗酸性を有する菌種と疑い、臨床医に血液培養陽性報告をした。この時、血液培養自動分析装置に再々装填され 4 日間培養を続けていた血液培養ボトルの中の培養液をグラム染色したところ、わずかにグラム陽性桿菌の菌塊（Fig 2D）を認めた。サブカルチャーされた血液寒天培地とチョコレート寒天培地の 6 日後のコロニーは①コロニー径 0.5 mm、S 型②コロニー径 2 mm、R 型の 2 種類のコロニーが観察された（Fig 3）。それぞれ純培養したコロニーを、エタノール・ギ酸抽出法にシリカビーズによる物理的な菌体の破壊を加えた *Nocardia* extraction method in Department of Clinical Laboratory at Chiba University hospital 法<sup>7</sup>で前処理後、質量分析装置による同定を行ったところ、①のコロニーで最高スコア 1.856、②のコロニーで 1.975 となり、どちらも *G. sputi* が上位 5 菌種までを占めた。

遺伝子学的検査：secA1 遺伝子の塩基配列による系統解析を院内検査部と千葉大学真菌医学研究センターで実施した。Blast 検索の結果、secA1 遺伝子において *Gordonia sputi* DSM43896T を含む *G. sputi* として登録されている 20 菌株と 94.7-100% の相同性を示し、同一の分岐群に属していたため、*G. sputi* と同定した。なお、本菌株はナショナルバイオリソースプロジェクト（<http://www.nbrp.jp/>）の支援を受け、IFM 12288 として千葉大学真菌医学研究センターに保存されている。

薬剤感受性検査：薬剤感受性プレートはドライプレート（栄研化学）の CD17 と CD54 にストレプト・ヘモサプリメント（栄研化学）を添加して実施した。添付文書<sup>8</sup>に則り、最終接種菌量は約  $5 \times 10^4$  CFU/ウエルに調整した。35°C 大気下 48 時間で陽性コントロールウエルに菌の発育を認め、MIC を判定した（Table 1）。2 種類のコロニーにおける MIC に差はなかった。

## 考 察

二酸化炭素の増加に伴う蛍光量変化の検知が用いられている血液培養自動分析装置<sup>9</sup>では、陽性シグナル検知時、その蛍光量の変化を示す波形や培養時間が白血球代謝による偽陽性やコンタミネーションの推定につながる。また、陽性ボトル内溶液グラム染色を観察する際、菌種によって染色性が悪いことや、菌量が少ないことで菌体が確認できないことがある。今回我々は、陽性シグナル検知時の波形と陽性シグナル検知までの培養時間、そしてグラム染色とメチレンブルー染色で菌体を確認できなかったことから、陽性シグナル検知時には偽陽性と判定した。しかし、サブカルチャーを行っていたことで血液培養陰性との最終報告を防ぐことができたことから、サブカルチャーを行うことの重要性を再認識した。また、2 回以上もしくは 2 セット以上の陽性シグナルを検知した場合には、安易に偽陽性と判断せずに菌体の存在を強く疑うべきであるという結論に達した。

菌種同定に関して、今回、サブカルチャーによって発育したコロニー形態から当初は抗酸菌を疑っていたがコロニーのグラム染色の染色性からその推定を否定した。同時に、追加で行った Ziehl-Neelsen 染色でも抗酸菌と判定されず、質量分析測定では弱抗酸性を有する菌種が候補として挙げた。この結果がきっかけとなり、さらに追加で Kinyoun 染色を行い、弱抗酸性を有する菌種と疑うことができ診断治療につながる迅速な報告ができた。質量分析装置による同定は本菌のように確実な同定に至らないとしても菌種推定が可能になる場合がある。よって、コロニー形態と質量分析装置による同定の結果を組み合わせる菌種推定することは重要と考えられた。コロニーのオンプレート・ギ酸抽出法による同定ではスコアが低く確実な同定には至らなかったが、コロニーが十分に発育後、前処理をして測定したところ十分なスコアを得ることができた。一般的な微生物検査室では 16S rRNA 遺伝子解析に迅速性を求めることはできないが、*G. sputi* のような同定困難とされてきた菌種に対して質量分析装置を用いた同定が有用であり、質量分析装置を有する微生物検査室では迅速な同定が可能になることが示唆された。

薬剤感受性検査は当院微生物検査室で実施し多くの薬剤で MIC は低値を示した。*G. sputi* は CLSI の判定基準が存在しないので参考値ではあるが迅速な報告を実現し抗菌薬の de-escalation につながった。最終的に迅速で適切な検査結果による診断治療から抗菌薬が経口投与に切り替わり、患者は退院し QOL（Quality Of Life：生活の質）を高めることができた。*G. sputi* における薬剤感受性検査には確立した方法が存在しないが、一般的な微生物検査室でも実施可能で迅速な報告に有用と考えられる。

抜去した CV カテーテルの培養検査が行われなかったため、



Fig 1. *G. sputi* colonies on TSA II with 5% SB Agar (日本 BD) and BY Chocolate Agar (日本 BD), (35°C, 7% CO<sub>2</sub>, 34 hours)

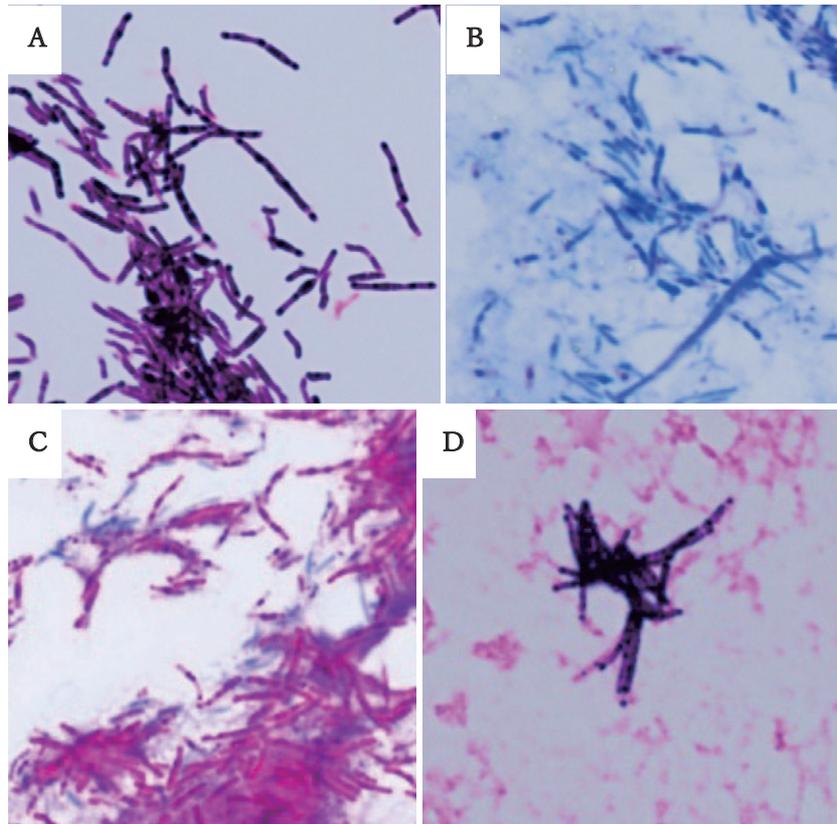


Fig 2.

- (A) Gram stain of the colony
- (B) Ziehl-Neelsen stain of the colony
- (C) Kinyoun stain of the colony
- (D) Gram stain of the blood culture bottle

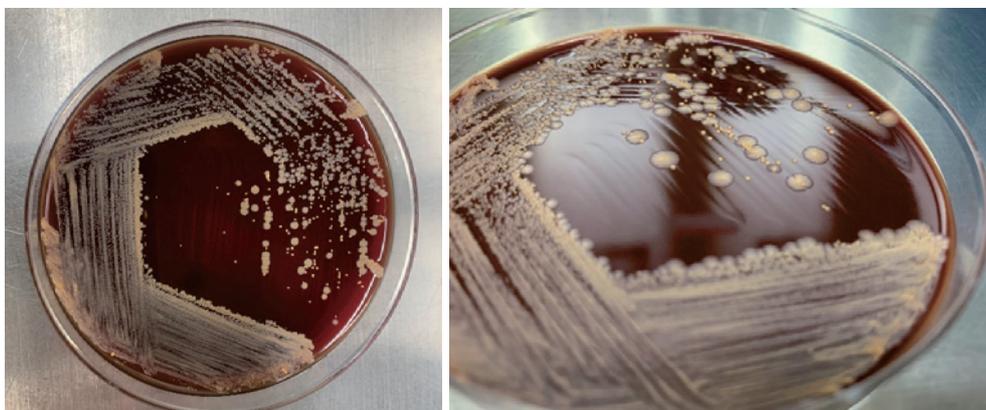


Fig 3. *G. sputi* colonies on BY Chocolate Agar (日本 BD), (35°C, 7% CO<sub>2</sub>, 5 days)

Table 1. Results of antimicrobial-susceptibility test

Antibiotics	MIC ( $\mu$ g/mL)
Penicillin G	0.12
Ampicillin	$\leq 0.12$
Clavulanic acid/Amoxicillin	$\leq 0.12$
Cefditoren pivoxil	0.12
Imipenem/Cilastatin	$\leq 0.06$
Meropenem	$\leq 0.06$
Clarithromycin	0.25
Clindamycin	0.5
Minocycline	1
Chloramphenicol	4
Vancomycin	1
Tosufloxacin	0.25
Cefotaxime	0.25
Ceftriaxone	0.5
Azithromycin	2
Levofloxacin	0.25
Sulfamethoxazole-trimethoprim	4

今回の菌血症における侵入門戸の確定はできないが、患者にCVカテーテルが留置されていたこと、在宅療養中で自然界に広く分布する本菌に接触する可能性があったこと、神経芽腫に対する維持療法中で免疫不全状態であったことから、臨床病型として *G. sputi* による CRBSI と考えられた。

*G. sputi* は *Corynebacterium* 様を示すグラム陽性桿菌とされるが<sup>10)</sup>、今回我々が血液培養ボトル内の培養液やサブカルチャー後のコロニーをグラム染色した際に見られたグラム陽性桿菌は長い菌体も存在し *Corynebacterium* 様と断定はできなかった。よって、血液培養陽性時にグラム陽性桿菌が検出された際には典型的な *Corynebacterium* 様でなくとも、*Gordonia* 属の可能性も考慮すべきである。さらに、免疫不全状態の時には *Gordonia* 属などの稀な菌種が病原菌になり得るという認識と、それらの菌種の知識を身につけておく必要がある。

利益相反：報告すべき利益相反なし

倫理的配慮：当院の個人情報保護方針に則り、症例報告の際の患者同意は不要となっている

## 文 献

- Stackebrandt, E., J. Smida, M.D. Collins. 1988. Evidence of phylogenetic heterogeneity within the genus *Rhodococcus*: Revival of the genus *Gordonia* (*Tsukamura*). J. Gen. Appl. Microbiol. 34: 341-348.
- 榎園恭子, 村上日奈子, 大楠清文, 他. 2010. 在宅中心静脈栄養患者にみられた *Gordonia sputi* 敗血症の1例—原因菌の分離・同定・鑑別を中心に—. 日臨微誌 20 (3): 188-194.
- 戸田圭三, 下田颯子, 田中育子, 他. 2019. 16S rRNA および *secA1* 遺伝子解析で *Gordonia sputi* と同定した1例. 医学検査 68: 291-295.
- Negishi, T, T Matsumoto, S Saito, et al. 2016. Catheter-Related Bacteremia Due to *Gordonia sputi* in a Patient with Acute Lymphocytic Leukemia: a Case Report. Jpn J Infect Dis 69 (4): 342-343.
- Blaschke, AJ, J Bender, CL Byington, et al. 2007. *Gordonia* species: emerging pathogens in pediatric patients that are identified by 16S ribosomal RNA gene sequencing. Clin Infect Dis 45: 483-486.
- 水口國雄. 2021. 染色法のすべて (水口國雄 編集代表, 白石泰夫 発行者 第1版), p. 366-367, 医歯薬出版, 東京.
- Segawa, S, M Nishimura, K Sogawa, et al. 2015. Identification of *Nocardia* species using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. Clin Proteomics 12 (1): 6.
- ドライプレート栄研 添付文書 第20版. 2024年3月6日現在.
- BD バクテック FX システム 添付文書 第3版. 2023年3月26日現在.
- Murray, P.R. 2015. The Clinician and the Microbiology Laboratory. p. 191-223, In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th ed. (J.E. Bennett, R. Dolin, M.J. Blaser, ed.).

A case of bacteremia caused by *Gordonia sputi*, which was difficult to detect

Mirai Matsubara<sup>1)</sup>, Akiko Miyabe<sup>1)</sup>, Tomoko Saito<sup>1)</sup>, Syunsuke Segawa<sup>1)</sup>, Shin Suzuki<sup>1)</sup>, Koji Yamashita<sup>1)</sup>,  
Tatsuki Fujikawa<sup>1)</sup>, Shota Murata<sup>1)</sup>, Naruhiko Ishiwada<sup>2) 3)</sup>, Takashi Yaguchi<sup>2)</sup>, Jyunko Ito<sup>2)</sup>, Tomoko Okunushi<sup>3)</sup>,  
Moeko Hino<sup>3)</sup>, Kenji Kawasaki<sup>1)</sup>, Kazuyuki Matsushita<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Laboratory Medicine, Chiba University Hospital

<sup>2)</sup>Medical Mycology Research Center, Chiba University

<sup>3)</sup>Department of Pediatrics, Chiba University Hospital

We report a case of bacteremia caused by *Gordonia sputi* that was difficult to detect on routine microbiologic examination. A six-year-old girl developed a fever while recuperating at home with an indwelling central venous catheter. Despite a positive signal in a blood culture system, Gram staining did not reveal the presence of microorganisms. Therefore, we determined that it was a false-positive signal. However, when the bottles were sub cultured and reloaded into the system, they again produced a positive signal. Based on the morphology of the colonies in the subculture and the results of various stains, we determined that the bacterium was a mildly acid-fast species. In addition, mass spectrometry and genetic analysis confirmed the *G. sputi* infection. *G. sputi* is a gram-positive, mildly acid-fast bacilli that is widely distributed in water and soil. Catheter-related infections with *Gordonia* sp. occur in immunocompromised patients. Therefore, estimation of the causative microorganism based on the patient history, colony morphology, and staining is important for prompt reporting. In addition, we must consider the presence of an organism when positive signals are detected in multiple bottle sets or times in the culture system.