

[症 例 報 告]

ブラインドサブカルチャーが有用であった *Bartonella henselae* 血流感染症・感染関連腎炎の1例

松井建二郎^{1) 3)}・成宮利幸²⁾・林 宏樹²⁾・塚本健太郎^{3) 4)}
櫻井亜樹^{3) 5)}・土井洋平^{3) 5) 6)}・坪井直毅²⁾

¹⁾ 藤田医科大学病院臨床検査部

²⁾ 藤田医科大学医学部腎臓内科

³⁾ 藤田医科大学医学部微生物学講座

⁴⁾ 大阪大学微生物病研究所附属感染症国際研究センター人獣共通細菌感染症研究グループ

⁵⁾ 藤田医科大学医学部感染症科

⁶⁾ 藤田医科大学感染症研究センター

(令和6年5月15日受付, 令和6年6月28日受理)

症例は高血圧・胸部大動脈解離の既往がある56歳男性。下腿紫斑, 遷延する発熱, 進行する腎機能障害の精査目的に入院となった。発症前にネコおよびネコノミとの濃厚接触歴があったことから *Bartonella* 感染症を疑い血液培養検査が実施された。血液培養ボトルは血液培養自動分析装置 (BACTEC FX) に装填され培養が開始された。装填後7日目の時点で陽性シグナルは認められなかったが, 培養液の一部を採取しサブカルチャー (ブラインドサブカルチャー) を実施したところ, 培養13日目にカリフラワー様のコロニー形成を認めた。分離株の *ssrA* 遺伝子・*rpoB* 遺伝子の塩基配列解析を行った結果 *B. henselae* であることが判明した。血液培養はその後2週間 (計3週間) 延長培養したが陽転化はみられなかった。*B. henselae* の分離・同定にブラインドサブカルチャーが有用である可能性が示唆された。

Key words: ブラインドサブカルチャー, *Bartonella henselae*

序 文

Bartonella henselae は猫ひっかき病の原因菌として知られる通性細胞内寄生性の多型性グラム陰性桿菌である。本菌は自然宿主であるネコの赤血球内に不顕性感染しており, 感染したネコに引っ掻かれたり噛まれたりすることによりヒトへの感染が成立する。また, *B. henselae* のネコ間での感染伝播にはネコノミが深く関わっているとされており, まれに感染ネコを吸血したノミを介したヒトへの感染例も報告されている¹⁾。

B. henselae によるヒト感染症の臨床像は多岐にわたり, 局所リンパ節腫脹や発熱を主症状とする猫ひっかき病から, 感染性心内膜炎, 視神経網膜炎, また免疫不全者における細菌性血管腫の原因となることもある²⁾。しかし *B. henselae* を臨床検体から分離培養することは極めて困難であり, 通常本菌によるヒト感染症の診断には血清学的検査や遺伝子学的検査が用いられる⁵⁾。

今回我々は, 血液培養自動分析装置で陽性アラームが検出される前の血液培養検体からサブカルチャー (ブラインドカルチャー) を実施することにより, *B. henselae* を分離する

ことに成功したため報告する。

症 例

患者: 56歳男性。

主訴: 発熱, 下腿紫斑。

既往歴: 高血圧, 胸部大動脈解離 (Yacoub 術後)。

嗜好歴: 喫煙 15本/日を40年間, 飲酒 焼酎3合/日。

現病歴: 入院6カ月前に拾ってきたネコを外飼いで飼い始めてから, ノミに頻回に刺されるようになった。同時期より両側下腿の紫斑が出現し, 入院3カ月前より微熱が出現した。入院2カ月前から間欠的に39-40℃の発熱を認めるようになったため近医を受診するも熱源は不明であった。その後, 腎機能障害が進行したため, 発熱・腎機能障害の精査目的に当院腎臓内科に入院となった。

入院時身体所見: 血圧144/88 mmHg, 脈拍89回/分, 体温37.4℃, 意識清明, 眼瞼結膜に出血斑なし, 肺野は清, 心音は整で雑音なし, 体表リンパ節は触知せず, 関節の腫脹・圧痛なし, 両下腿に多数の紫斑を認める (図1)。

来院時の検査所見を表1に示す。血液検査で汎血球減少, 血清クレアチニン値上昇を, 尿検査で尿タンパク・尿潜血を認めた。

画像検査結果: 胸腹部CTで脾腫, 両側の腎腫大を認めた。

臨床経過: 臨床経過を図2に示す。発症前にネコ (ネコノミ) との濃厚接触歴があったことから *Bartonella* 感染症を疑い, 血液培養採取後の入院3日目より minocycline (MINO) 100 mg×2/day を開始した。また同菌による感染性心内膜

著者連絡先: (〒470-1192) 愛知県豊明市杣掛町田楽ケ窪1番地98
藤田医科大学病院臨床検査部
松井建二郎
TEL: 0562-93-2304
FAX: 0562-93-4003
E-mail: kenjiro.matsui@fujita-hu.ac.jp

炎を強く疑い、入院8日目に rifampicin (RFP) 300 mg×2/day を追加した。経食道心臓超音波検査では疣贅や弁破壊など感染性心内膜炎を示唆する所見を認めず、入院14日目に実施した腎生検で半月体形成性糸球体腎炎および急性尿細管壊死を示唆する腎組織所見を認めた。*B. henselae* の血清抗



図1. 両下腿の点状紫斑
下腿前面を中心とする点状紫斑を認める。

体価（間接蛍光抗体法）を SRL に外部委託し測定した結果、IgM 抗体は陰性であったが IgG 抗体価は 1 : 512 倍と高値を示した。入院20日目、後述する手法により実施した血液培養検体のサブカルチャーからコロニーの発育を認め、同分離株は *B. henselae* と同定された。これら臨床所見、病理組織所見、血清学および微生物学的検査所見から *B. henselae* による血流感染症、および同感染に伴う急速進行性糸球体腎炎と診断した。抗菌薬治療開始後、解熱ならびに腎機能の改善を認め入院31日目に自宅退院となった（RFPは計2週間で終了）。退院後も MINO 内服を継続し、計56日の治療を完遂した。抗菌薬終了後も *Bartonella* 感染症の再燃を認めていない。

微生物学的検査

1. 血液培養検査

入院時（＝抗菌薬投与前）に採取された血液培養検体を用い血液培養を実施した。血液培養には BACTEC FX（日本ベクトン・ディッキンソン；以下日本 BD）を用い、血培ボトルに BD バクテック 23F 好気用レズンボトル（日本 BD）、

表1. 入院時検査所見

生化学検査		血液検査		尿検査	
CRP	2.64 mg/dL	WBC	$2.4 \times 10^3 /\mu\text{L}$	尿 pH	5
AST	24 U/L	RBC	$2.76 \times 10^6 /\mu\text{L}$	尿比重	1.01
ALT	29 U/L	Hb	8.6 g/dL	尿蛋白	(2+)
LD	202 U/L	Hct	25.7 %	尿糖	(-)
UN	27.6 mg/dL	PLT	$9.4 \times 10^4 /\mu\text{L}$	尿潜血	(3+)
UA	6.4 mg/dL	MCV	93 fL	尿ウロビリノゲン	(1+)
CRE	2.47 mg/dL	MCH	31.2 Pg		
Na	136 mmol/L	MCHC	33.5 %	尿沈渣細菌	(3+)
K	3.5 mmol/L			糸球体赤血球	(+)
Cl	104 mmol/L				
Ca	8.2 mg/mL			尿 NAG	15.2 U/L
TP	3.1 mg/mL				

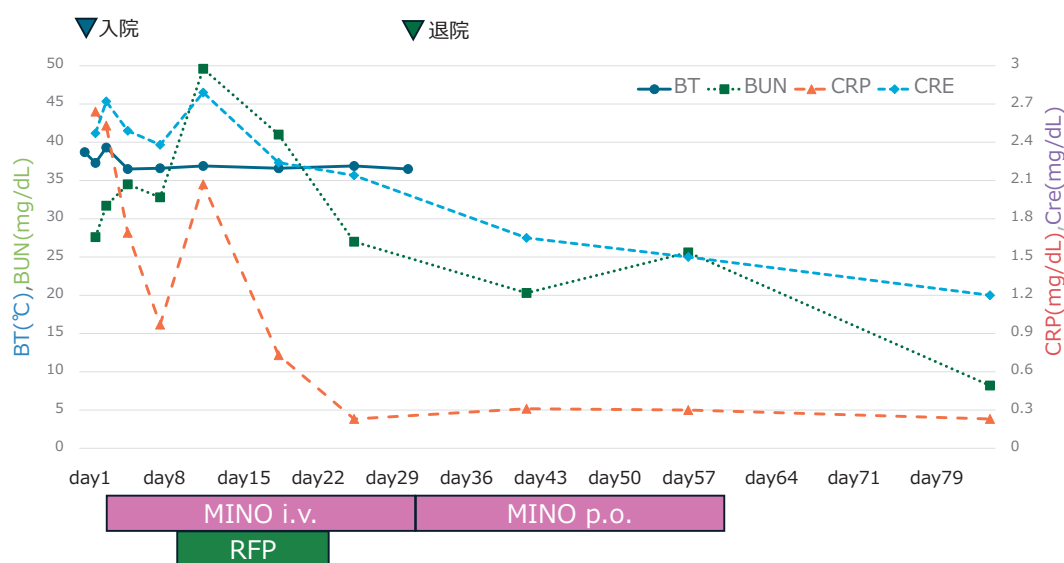


図2. 臨床経過

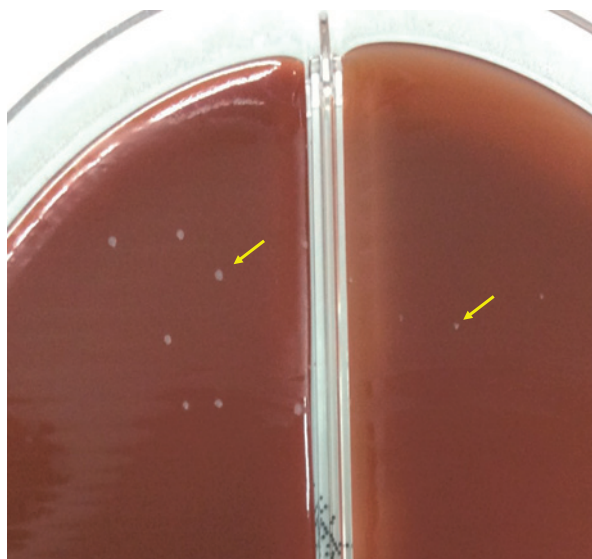


図 3-A. TWIN プレート 9 上のコロニー
チョコレート (左) と TSA (右) 上に灰色で皺のよったコロニー
を認める。

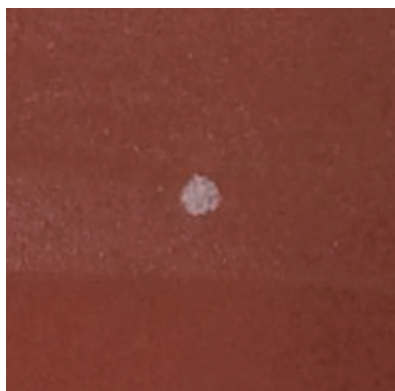


図 3-B. コロニーの拡大図
カリフラワー様のコロニーと表現されるコロニー。

BD バクテック 21F 溶血タイプ嫌気用ボトル (日本 BD) を使用した。診療科より *Bartonella* 感染症が疑われる症例であることが検査室に共有されたため、血液培養開始 7 日後の時点で陽性シグナルは認められなかったが、ブラインドサブカルチャーを実施した。

ブラインドサブカルチャーの手順として、まず一度ボトルを BACTEX FX から抜き、好気ボトルと嫌気ボトルのそれぞれの培養液を 15 mL の遠心チューブに 5 mL 採取した。その後、好気ボトルは滅菌蒸留水を 10 mL 加え溶血操作を行い 3000 G で 10 分間遠心した。遠心後に上清を捨て、沈査を用いてサブカルチャーを実施した。ブラインドサブカルチャーは提出された 2 セット共にを行った。

サブカルチャーには TWIN プレート 9 (TSA + チョコレート) (極東製薬) を使用し、35°C 5% CO₂ 下で湿潤状態にして 2 週間培養した。ブラインドサブカルチャー開始後 13 日目に、両セットの好気ボトルの培養液において、チョコレート寒天培地上にコロニー形成を認め、20 日後には血液寒天培

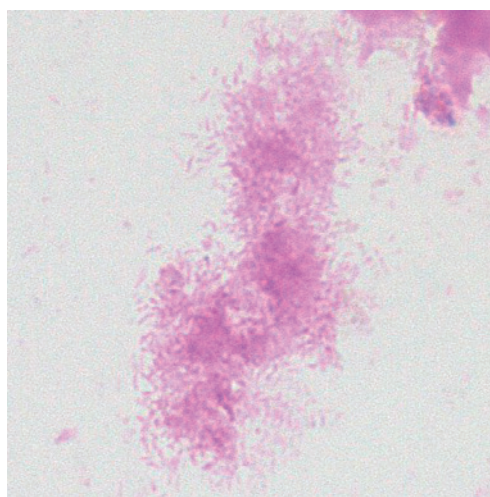


図 4. コロニーからのグラム染色像 (×1000 倍)
小型の湾曲したグラム陰性桿菌が観察される。

地上にもコロニーを認めた。コロニーの性状は灰色で皺がよったカリフラワー様コロニーであり (図 3-A, 3-B), コロニーからのグラム染色では小型の湾曲したグラム陰性桿菌が観察された (図 4)。同分離株を質量分析装置 VITEK MS Knowledge Base version 3.0 (バイオメリュー・ジャパン) にかけてが同定結果を得られず、以下に示す遺伝子検査を実施した。なお、嫌気ボトルの培養液からの発育は認められなかった。

2. 遺伝子検査

分離株のコロニーを滅菌水に懸濁後、95°C で 5 分加熱処理したものをテンプレートとして用い *Bartonella* 属菌の *ssrA* 遺伝子と *rpoB* 遺伝子を PCR 法で増幅した。PCR に使用したプライマー配列を表 2 に示す。PCR 酵素には KOD-FX Neo (東洋紡) を使用し、94°C 2 分の後、98°C 10 秒、55°C 30 秒、68°C 1 分を 1 サイクルとして 35 サイクルの増幅反応を行った。その後、2% アガロースゲル電気泳動で確認された増幅産物のバンドを切り出し、PureLink quick gel extraction kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて PCR 産物を精製した。精製後の PCR 産物を DNA シーケンスサービス (ユーロフィンジェノミクス) に送り塩基配列の決定を行った。得られた塩基配列を BLAST で検索した結果、*B. henselae* 標準株と高い相同性 (*ssrA*, 251/252 bp, identity 99.6%; *rpoB*, 819/822 bp, identity 99.6%) を示すことが判明した。以上の結果より *B. henselae* と同定した。退院 1 週間後に外来で採取された血液培養にて同様の手技を行ったが、菌は検出されなかった。

考 察

今回我々は、血液培養検体から菌の分離・同定に成功した *B. henselae* による血流感染症・感染関連腎炎の一例を経験した。通常難培養として知られる *B. henselae* が培養し得た背景にはいくつかの要因が関わっていると考えられ、以下に考察する。

まず、本例では臨床症状が出現する前にネコ (ノミ) との濃厚接触歴があったことを診療担当医が入院時の問診で把握

表 2. プライマー配列

遺伝子	プライマー	配列	PCR 産物	アニーリング温度
ssrA	ssrA-F	GCTATGGTAATAAATGGACAATGAAATAA	301 bp	58.2℃
	ssrA-R	GCTTCTGTTGCCAGGTG		57.5℃
rpoB	1400F	CGCATTGGCTTACTTCGTATG	825 bp	58.8℃
	2300R	GTAGACTGATTAGAACGCTG		54.5℃

しており、血液培養が抗菌薬開始前の段階で適切に採取されていた。さらに、これらの臨床情報が速やかに臨床微生物検査室に共有されたことが *B. henselae* を念頭においた培養の試みに繋がったと考えられる。*Bartonella* 感染症では、感染源への暴露から発症、さらに医療機関への受診までの期間が長く、本例のように数カ月に及ぶことも少なくない²⁾。また以下で述べるように、本菌を発育させるためには特殊な培養条件が必要であり、過去まで遡った詳細な病歴聴取、適切な検体採取、さらに診療科と臨床検査部の綿密な情報共有が重要と考えられる。

培養に関しては、本例では血液培養自動分析装置から陽転化前の好気性血液培養ボトルを培養 7 日目に取り出し、チョコレート寒天培地へのブラインドサブカルチャーを実施することにより菌の分離に成功した。通常、血液培養自動分析装置は微生物の増殖に伴う血液培養ボトル内の CO₂ 量や酸素消費量の変化をアルゴリズムで捕らえ、微生物の発育を判定する³⁾。しかし *B. henselae* は遅発育菌で CO₂ 産生量が少ないことから、その血液培養ボトル内での発育を自動分析装置が検出することは難しいとされている^{3,4)}。過去の研究では、延長培養が *Bartonella* 属菌の検出に有効であったとする報告³⁾もあるが、本症例では 3 週間の培養後も陽性シグナルは認められず、延長培養のみで菌を検出することは困難であったと考えられる。

今回我々が実施したブラインドサブカルチャーは、血液培養検体からの *Bartonella* 属菌の検出方法として過去の研究でも報告されており、1) 血液培養自動分析装置への搭載後 7 日目以降に実施すること、2) *Bartonella* 属菌の増殖にヘムの存在が必須であることから、ヘムを含有するチョコレート寒天培地や血液寒天培地等をサブカルチャーの培地に使用することが推奨されている^{4)~6)}。また本手法による検出率は、抗菌薬投与前の血液培養検体を用いることで上昇することが知られており、このことは本例で菌が分離し得た一因となっていると考えられる。さらに本例では実施しなかったが、培養 7 日目以降の血液培養検体にアクリジンオレンジ染色や Warthin-Starry 染色などの特殊染色を施すことにより菌体が確認されたとする報告もあり⁶⁾、*Bartonella* 属菌による血流感染症が強く疑われる症例では、上記培養・染色を検討すべきと考えられる。一方で、血液培養検体を用いた *Bartonella* 属菌の分離率は研究ごとによらつきがあり^{4,6)}、また菌体が得られるまでに 3~4 週、もしくはそれ以上の期間を要することも稀ではない^{4,7)~10)}。よって本手法はあくまで血清学的検査、遺伝子学的検査 (PCR 法)、病理組織検査などに加えるかたちで、補助的に用いられるべきである。

本症例では、分離された菌株を質量分析装置 (VITEK MS) にて同定を試みたが、ライブラリーに *Bartonella* 属菌のデー

タがなく同定には至らなかった。そのため菌株より DNA を抽出し、ssrA 遺伝子と rpoB 遺伝子を PCR 法で増幅し、シーケンス解析することで菌種を同定した。これらの PCR 検査は、菌株だけではなく、直接検体 (血液、ぬぐい液、リンパ節) からの *Bartonella* 属菌遺伝子の検出にも有用とされており、外注検査でも実施可能である¹¹⁾。また、*Bartonella* 属菌に対する薬剤感受性試験法に関しては、ガイドラインで定められた標準化された検査手法がなく、本例では実施していない¹²⁾。

本症例では複数の要因が重なり、血液培養検体から *B. henselae* を検出することができた。*Bartonella* 属菌を血液検体から分離・同定することは、血流感染の直接的な証拠を掴むだけでなく、人畜共通感染症である本菌のヒトへの病原性ならびに疫学情報をより詳細に把握するためにも重要と考えられる。ブラインドサブカルチャーはコストや手間がかかり、日常検査として実施することは現実的ではない。しかし、*Bartonella* による血流感染症が強く疑われる症例では、上記条件を踏まえたブラインドサブカルチャーが適切な診断支援に繋がる可能性がある。

倫理的配慮: 本学園の規定する個人情報保護方針に則り、個人を特定できる情報はすべて削除した上で症例報告を行っている。また患者本人より症例報告に関する同意を取得している。

本論文の要旨は第 35 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 (2024 年 2 月 横浜市) にて発表した。

謝辞: 本研究の遂行にあたり御協力を賜りました藤田医科大学臨床検査部 伊藤 弘康先生に御礼を申し上げます。

利益相反: 申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) Oshima, Y, M Fujii, K Shiogama, et al. 2016. *Bartonella henselae* infection caused by cat flea bite. Pathol Int 66 (3): 177-179.
- 2) Rose, SR, JE Koehler. 2019. *Bartonella*, Including Cat-Scratch Disease. p. 2824-2843. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 9th Ed, Chapter 234. (J.E. Bennett, R. Dolin, M.J. Blaser, et al. ELSEVIER, Amsterdam.
- 3) Tierno, PM Jr, K Inglima, MT Parisi. 1995. Detection of *Bartonella (Rochalimaea) henselae* bacteremia using BacT/Alert blood culture system. Am J Clin Pathol 104 (5): 530-536.
- 4) La Scola, B, D Raoult. 1999. Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from Human Samples: a 5-Year

- Experience (1993 to 1998). J Clin Microbiol 37 (6): 1899-1905.
- 5) Giladi, M, R Gutiérrez, S Harrus. 2023. *Bartonella*. In: Manual of Clinical Microbiology, 13th Ed, Chapter 51. (K.C. Carroll, M.A. Pfaller, J.A. Tenover, et al. ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 - 6) Larson, AM, MJ Dougherty, DJ Nowowiejski, et al. 1994. Detection of *Bartonella (Rochalimaea) quintana* by routine acridine orange staining of broth blood cultures. J Clin Microbiol 32 (6): 1492-1496.
 - 7) Maurin, M, V Roux, A Stein, et al. 1994. Isolation and characterization by immunofluorescence, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, western blot, restriction fragment length polymorphism-PCR, 16S rRNA gene sequencing, and pulsed-field gel electrophoresis of *Rochalimaea quintana* from a patient with bacillary angiomatosis. J Clin Microbiol 32 (5): 1166-1171.
 - 8) Robert, M, R Lecomte, M Michel, et al. 2022. *Bartonella quintana* infective endocarditis in a homeless man with unexpected positive blood culture. IDCases 30: e01647.
 - 9) Maurin, M, R Birtles, D Raoult. 1997. Current knowledge of *Bartonella* species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 16 (7): 487-506.
 - 10) 常岡英弘, 石田千鶴, 梅田昭子, 他. 2004. *Bartonella henselae* 検出のための分離培地の検討. 感染症誌 78 (7): 574-579.
 - 11) ネコひっかき病 (*Bartonella henselae*)-DNA 同定. LSI メディエンス.
<https://data.medience.co.jp/guide/guide-06010074.html>
2024 年 6 月 10 日現在
 - 12) Rolain, JM, P Brouqui, JE Koehler, et al. 2004. Recommendations for Treatment of Human Infections Caused by *Bartonella* Species. Antimicrob Agents Chemother 48 (6): 1921-1933.

Bartonella henselae bacteremia and infection-related glomerulonephritis detected by a blind subculture of blood culture media

Kenjiro Matsui^{1) 3)}, Toshiyuki Narimiya²⁾, Hiroki Hayashi²⁾, Kentaro Tsukamoto^{3) 4)},
Aki Sakurai^{3) 5)}, Yohei Doi^{3) 5) 6)}, Naotake Tsuboi²⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Fujita Health University Hospital

²⁾Department of Nephrology, Fujita Health University School of Medicine

³⁾Department of Microbiology, Fujita Health University School of Medicine

⁴⁾International Research Center for Infectious Diseases Laboratory of Bacterial Zoonoses, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

⁵⁾Department of Infectious Diseases, Fujita Health University School of Medicine

⁶⁾Center for Infectious Disease Research, Fujita Health University

Bartonella species, which can cause blood stream infections including infective endocarditis, are rarely isolated from clinical specimens. Here, we present a 56-year-old male with a history of hypertension and thoracic aortic dissection who was hospitalized for prolonged fever and worsening renal function. Given the history of cat exposure and flea bites prior to the onset of symptoms, *Bartonella* infection was suspected. Therefore, blood culture specimens incubated on BACTEC FX Blood Culture System were subjected to blind subculture (i.e., subculture in the absence of detectable growth) and extended incubation. Blind subculture on chocolate agar plate was conducted on day 7 of incubation, which yielded small gray-colored colonies on day 13. These colonies were identified as *Bartonella henselae* based on sequencing of the *ssrA* and *rpoB* genes. Blood culture bottles did not flag positive by 3 weeks of incubation. Blind subculture of blood culture media might be useful for detecting *Bartonella* spp. from clinical specimens.