

微生物検査

I. 試料 13

<13-1 同定検査>

正解 : *Streptococcus pyogenes*

正答率 : 100 % (43/43 施設)

<13-2 感染症法>

正解 : 5 類感染症全数把握、診断後 7 日以内に最寄りの保健所に届け出る。

正答率 : 88.4 % (38/43 施設)

不正解 : 5 類感染症全数把握、診断後直ちに最寄りの保健所に届け出る。9.3 % (4/43 施設)

不正解 : 3 類感染症、診断後直ちに最寄りの保健所に届け出る。2.3 % (1/43 施設)

Streptococcus pyogenes は、グラム陽性連鎖球菌で Lancefield の血清群別では A 群に凝集し、ピロリドニルアラリルアミダーゼ (PYR) 活性陽性、バシトラシン感受性、馬尿酸加水分解陰性である¹⁾。

主に急性咽頭炎、膿痂疹、蜂窩織炎の他、猩紅熱、中耳炎、肺炎、化膿性関節炎、骨髓炎、髄膜炎など感染症の原因となる。また、リウマチ熱や急性糸球体腎炎も引き起こし、特に、劇症型溶血性レンサ球菌感染症 (STSS: streptococcal toxic shock syndrome) は、急激で劇的な症状の進行を特徴とする致命率の高い感染症である¹⁾。

STSS は感染症法に基づく 5 類全数把握疾患であり、ショック症状に加えて肝不全、腎不全、急性呼吸窮迫症候群、播種性血管内凝固症候群、軟部組織炎、全身性紅斑性発疹、中枢神経症状のうち 2 つ以上を伴い、通常無菌的な部位 (血液、髄液、胸水、腹水)、生検組織、手術創、壊死軟部組織から β 溶血を示すレンサ球菌が検出された場合、届出対象となる²⁾。なお、5 類全数把握疾患のうち「直ちに届出」の対象は侵襲性髄膜炎菌感染症、風しん及び麻疹で、これら以外の感染症は「7 日以内に届出」となっている。しかしながら、両者を区別されていない回答がみられたので、再確認されることを推奨する。

近年、日本では *S. pyogenes* による STSS 症例および

咽頭炎症例が増加傾向にあり、特に 2010 年代に英国で流行した病原性および伝播性が高い *S. pyogenes* M1_{UK} lineage (UK 系統株) が、2023 年夏以降、日本国内でも確認されている。UK 系統株は関東地方や長野県を含めた関東周辺で検出数が増加しており、その割合も上昇している。しかし、STSS 症例届出数の増加や咽頭炎の報告数の増加と、UK 系統株との関連性は明らかではない³⁾。

前述の背景を踏まえ、*S. pyogenes* を出題したが、これを契機に、STSS 症例に遭遇した際の臨床への対応方法について再確認していただければと思う。

II. 試料 14

<14-1 同定検査>

正解 : *Proteus mirabilis*

正答率 : 100 % (43/43 施設)

<14-2 耐性機序>

正解 : ESBL

ESBL+外膜蛋白^β-リン減少/欠損

正答率 : 97.3 % (36/37 施設)

不正解 : AmpC+外膜蛋白^β-リン減少/欠損
2.7 % (1/37 施設)

判定カテゴリー:S, Susceptible; I, Intermediate; R, Resistant

表 1. 微量液体希釈法* による薬剤感受性結果

抗菌薬	判定カテゴリー	MIC (μg/mL)
ABPC	R	>16
CAZ	S	≤1
MEPM	S	≤0.12
MINO	R (自然耐性)	>8
LVFX	I	1

* Neg Combo EN 5J パネル (ベックマン・コールター)、ドライプレート栄研 (栄研化学) による測定結果

表 2. ディスク拡散法* による薬剤感受性結果

抗菌薬	判定カテゴリー	阻止円直径 (mm)
ABPC	R	6
CAZ	S	25-27
MEPM	S	26-28
MINO	R (自然耐性)	7-9
LVFX	I	18-20

* センシディスク (日本BD) による測定結果

表 3. CLSI M100-Ed34 腸内細菌目細菌の判定基準
微量液体希釈法 (μg/mL)

抗菌薬	S	I	R
ABPC	≦8	16 [^]	≧32
CAZ	≦4	8 [^]	≧16
MEPM	≦1	2 [^]	≧4
MINO	≦4	8	≧16
LVFX	≦0.5	1 [^]	≧2

表 4. CLSI M100-Ed34 腸内細菌目細菌の判定基準
ディスク拡散法 (mm)

抗菌薬	薬剤含有量	S	I	R
ABPC	10 μg	≧17	14-16 [^]	≦13
CAZ	30 μg	≧21	18-20 [^]	≦17
MEPM	10 μg	≧23	20-22 [^]	≦19
MINO	10 μg	≧16	13-15	≦12
LVFX	5 μg	≧21	17-20 [^]	≦16

表 5. 薬剤感受性検査 回答数と比率 (%)

抗菌薬	n	S	I	R
ABPC	37	0	0	37(100)
CAZ	37	18(48.6)	0	19(51.4)
MEPM	37	36(97.3)	0	1(2.7)
MINO	36	0	1(2.8)	35(97.2)
LVFX	37	4(10.8)	22(59.5)	11(29.7)

： 正解 ※CAZ、LVFX は評価対象外

Proteus mirabilis は、腸内細菌目細菌の *Morganella* 科 *Proteus* 属で、IPA 陽性、硫化水素産生、インドール陰性である。また、本設問のように一部の *P. mirabilis* は

基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL) を産生する⁴⁾。

ESBL は、Class A β-ラクタマーゼ産生遺伝子の突然変異により、ペニシリン系薬に加えて第三・四世代のセファロsporin系薬やモノバクタム系薬を分解する酵素である。ただし、セファマイシン系薬、オキサセフェム系薬、およびカルバペネム系薬には作用せず、クラブラン酸 (CVA) などの β-ラクタマーゼ阻害剤によって酵素活性が抑制される。また、プラスミド上に ESBL 産生遺伝子が存在し、他の腸内細菌目細菌にも伝播するため、院内感染対策上重要である⁵⁾。

CLSI では M100-S19 までは、ESBL 確認試験が陽性と判定された場合、ペニシリン系、セファロsporin系、モノバクタム系薬を全て耐性として報告するよう記載されていたが、M100-S20 以降は判定カテゴリーを変更せずそのまま報告するよう変更され、現在に至っている。本設問では、CLSI M100-Ed34 に従って判定するよう指示がされていたが、セフトジジム (CAZ) の判定カテゴリーを S (感性) から R (耐性) に変換した回答が半数を占め、正答率が 80%未満となった。そのため CAZ のカテゴリーは評価対象外とした。

CLSI M100-Ed34 の内因性耐性の項では、*P. mirabilis* はテトラサイクリン系薬、ポリミキシン B (PL-B)、コリスチン (CL) に自然耐性とされているが、1施設でミノサイクリン (MINO) を I (中間耐性) で回答されていた⁶⁾。これは Minor error に該当するため、ご注意ください。

レボフロキサシン (LVFX) のカテゴリーの正答率は 80%未満となったことから評価対象外とした。また、カテゴリーは評価対象外ではあるが、判定基準について旧基準を使用している回答が散見された。このような回答をされた施設においては、基準値を再確認されることを推奨する。

III. フォトサーベイ

【設問1】

<問題 1-1 推定微生物名>

正解 : *Salmonella Paratyphi A*

正答率 : 100% (43/43 施設)

<問題1-2 行政への対応>

正解 : 3類感染症、診断後直ちに最寄りの保健所に届け出る。

正答率 : 100% (43/43施設)

Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar Paratyphi A は3類感染症であるパラチフスの原因菌として重要な菌種であり、パラチルスと診断された場合には直ちに届け出が必要となる。サルモネラ属菌の菌種鑑別には生化学性状と血清型別試験が必須であり、古典的な検査の実施と結果の解釈は必ず理解しておく必要がある。

非チフス性サルモネラではSS寒天培地への発育とともに硫化水素産生が特徴的な所見であるのに対し、チフス菌やパラチルス A 菌では硫化水素産生が少量あるいは陰性のものも多く見受けられる。その他にはクエン酸利用能も非チフス性サルモネラとの鑑別ポイントとなる。また、チフス菌とパラチルス A 菌の鑑別ポイントにはブドウ糖からのガス産生、リジン脱炭酸反応、オルニチン脱炭酸反応などがある。血清型別試験ではO抗原 (O2群) 陽性、H抗原 (1相 : a, 2相 (-)) である^{7,8)}。

パラチルスは東南アジアや中南米、アフリカなどの衛生水準の低い発展途上で流行を繰り返している。日本においては年間でも100例に満たない程度の発生数であり、そのほとんどが海外での感染例である。潜伏期間は2週間前後といわれており、病期により症状は変遷していく。発熱と下痢を伴う症例が多いが、便秘の場合もある。その場合、設問の症例のように消化器症状として自覚していないこともあるため、海外渡航歴やその他行動歴などの問診が重要となる^{8,9)}。

【設問2】

正解 : *Aspergillus niger*

正答率 : 100% (43/43施設)

Aspergillus niger は土壌、水、植物、空気中など自然環境中に普遍的に生息する糸状菌であり、肺アスペルギルス症、耳真菌症、副鼻腔真菌症などの原因菌となる。外耳道から分離されることが最も多いが、肺の既

存空洞における fungus ball (菌球) の原因になる頻度も高い。好中球減少、免疫抑制薬投与、低栄養状態、臓器移植後などの他、本設問のように糖尿病、ステロイド大量長期投与、間質性肺炎の背景がある場合、侵襲性肺アスペルギルス症 (IPA) を発症するリスクがある。IPA の臨床症状としては、急な発熱、全身倦怠感などの全身症状と咳嗽、喀痰、血痰、呼吸困難などの呼吸器症状であり、急速に増悪する。治療はボリコナゾール (VRCZ) が第一選択となっている¹⁰⁾。

A. niger の発育速度は速く、培地上で速やかに綿毛様の巨大コロニーを形成する。コロニーの色調は初め白色を呈するが後に黒色に変わる。顕微鏡下では分生子柄が滑面で頂囊が球形であること、複列性のフィアライドが頂囊の全体を覆い放射状に分生子が配列していることが特徴である¹¹⁾。しかし、*A. niger* においても形態学的な同定と遺伝子学的分類が異なる隠蔽種が問題となることは認識しておく必要がある。*A. niger* の隠蔽種である *Aspergillus tubingensis* の中には、治療において第一選択薬となるアゾール系に耐性を示す株が存在する¹²⁾。これらは質量分析法で同定しても、*A. niger* または *Aspergillus niger complex* との同定に留まる。正確な同定が求められるものの、日常検査の範囲では困難であると言わざるを得ない。

培養以外の所見としては、*A. niger* はシュウ酸を代謝するため、生体内ではカルシウムと結合してシュウ酸カルシウム結晶を析出することが挙げられる。病巣中の本結晶の存在は *A. niger* の起炎菌推定の指標となり得る¹³⁾。

【設問3】

正解 : *Pasteurella multocida*

正答率 : 97.7% (42/43施設)

不正解 : *Capnocytophaga canimorsus*

2.3% (1/43施設)

Pasteurella multocida は通性嫌気性グラム陰性短桿菌であり、*P. multocida* subsp. *multocida*、*P. multocida* subsp. *gallicida*、*P. multocida* subsp. *septica* の3亜種に分類される¹⁴⁾。ヒトを除く哺乳類の口腔内に常在しているが、人獣共通感染症の原因菌として知られおり、咬傷や搔

傷によってヒト、動物共に蜂窩織炎や膿瘍などの局所感染を引き起こす。重症化した場合は壊死性筋膜炎を引き起こし、さらに敗血症、髄膜炎等の全身感染症や、呼吸器感染症の原因ともなる¹⁵⁾。

本菌はコロニー所見、臭気共に *Haemophilus influenzae* に類似しているが、ヒツジ血液寒天培地に発育可能である。動物との接点がある患者で *H. influenzae* 様のコロニーが発育した場合は本菌を強く疑いたい。また、BTB 乳糖加寒天培地に非発育とする教本もあるが、発育することが多い¹⁶⁾。本菌の同定には、生化学的性状による同定（同定キット）や質量分析法が用いられている。

薬剤感受性試験では多くの抗菌薬に対し感性を示すが¹⁶⁾、嫌気性菌を含む複数菌が同時に検出されることもあるため^{15,16)}、治療にはβ-ラクタマーゼ阻害剤を配合したペニシリン系抗菌薬が推奨されている^{16,17)}。また、セファレキシン (CEX)、エリスロマイシン (EM)、クリンダマイシン (CLDM) には耐性であり、テトラサイクリン (TC) 耐性株やβ-ラクタマーゼ産生株も報告されている点についても注意頂きたい¹⁸⁾。

近年では伴侶動物との関わり方の変化により、*P. multocida* の他に *Pasteurella canis*, *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella stomatis* などの主に動物の感染症に関連している *Pasteurella* 属菌もヒトの感染症の起炎菌として報告されており注意が必要である¹⁶⁾。

【設問 4】

正解： *Streptococcus intermedius*

正答率：90.7% (39/43 施設)

不正解： *Streptococcus mitis* 2.3% (1/43 施設)

Enterococcus faecium 2.3% (1/43 施設)

Peptostreptococcus sp. 4.7% (2/43 施設)

Streptococcus intermedius は通性嫌気性グラム陽性球菌で *Streptococcus anginosus* group に属する連鎖球菌である。*S. anginosus* group は *S. anginosus* subsp. *anginosus*, *S. anginosus* subsp. *whitleyi*, *S. intermedius*, *S. constellatus* subsp. *constellatus*、*S. constellatus* subsp. *pharynges*, *S. constellatus* subsp. *viborgensis* の3菌種5亜種から構成されており¹⁹⁾、口腔内をはじめ、消化管、泌尿生殖器

に常在しているが、膿瘍を形成しやすい特徴から、全身の化膿性感染症に関与する^{20,21)}。特に出題菌である *S. intermedius* は細胞溶解毒素であるインターメディリシンや定着因子の作用により、深部膿瘍形成能が高く、肝膿瘍、脳膿瘍等から検出されることが多い^{22,23)}。

S. anginosus group のグラム染色所見は他の連鎖球菌と比べて菌体が小さく、連鎖状・一部集塊状の球菌として観察される²⁰⁾。集落は24時間培養でも0.5 mm程度の大きさで、特有のキャラメル臭を発する²⁴⁾。また、*S. anginosus* group の一部の菌株は、初代分離培養で嫌気条件下においてのみ発育することが知られており^{20,24)}、嫌気性菌と認識されてしまう可能性がある。しかしながら、継代培養を重ねることで、炭酸ガス培養でも発育が認められるようになる^{20,24)}。

本菌の同定は生化学的性状を用いた同定キットおよび質量分析法で容易に可能だが、前述のとおり、嫌気性菌と誤認してしまい難渋するケースがある。グラム染色像や臨床所見から本菌を疑い検査を進めることが、正確な同定を実施する上で重要である。

【設問 5】

正解： *Clostridium perfringens*

正答率：100% (43/43 施設)

Clostridium perfringens (ウエルシュ菌) は偏性嫌気性有芽胞のグラム陽性桿菌で、下水、河川、海、土壤など自然界に広く分布している。ヒトにおいても大腸内の常在菌である一方、外傷後にガス壊疽を引き起こす代表的な起炎菌として知られている²⁵⁾。ガス壊疽の他に本菌は食中毒、敗血症などの原因菌でもあり、特に敗血症は急激な溶血を伴い、劇症型の経緯を辿ることもあり^{26,27)}、予後不良であることが多いと報告されている²⁸⁾。しかし、血液培養において、鼠径部から採血された場合に本菌はしばしばコンタミネーションとして扱われることもあるため、敗血症の起炎菌かコンタミネーションかの判断は慎重に行う必要がある。敗血症が疑われる場合、速やかに抗菌薬治療を開始する必要があるため、臨床医との密な情報交換は必須である。検査所見についてだが、本菌は有芽胞菌であるが実際にグラム染色で芽胞を確認出来る事はほとんどない

^{29,30)}。コロニー性状は、24 時間培養では smooth 型のコロニーだが、48 時間以降の培養では辺縁が不規則で鋸歯状の Rough 型のコロニーを形成する。ヒツジ血液が添加された培地では β 溶血環と α 溶血環の 2 重溶血環を呈し、その培地を大気中においておくと緑色を帯びてくる²⁹⁾。同定検査では、レシチナーゼを産生することから、卵黄を加えた CW 寒天培地でコロニーの周囲に白濁したハローを形成する点が特徴である。簡易な同定法として、逆 CAMP 試験が有用である³⁰⁾。

本菌の抗菌薬治療については、嫌気性菌検査ガイドライン³¹⁾では特にペニシリン系およびクリンダマイシンの薬剤感受性試験を実施することが推奨されている。また、 β -ラクタマーゼ非産生のペニシリン耐性株が存在するため、注意が必要である。

設問とは異なるが、本菌による食中毒も軽視してはならない。近年、高齢者福祉施設や寮施設、合宿所などにおけるウエルシュ菌食中毒事例が散見されており、1 事例あたりの平均患者数は約 80 名と、他の細菌性食中毒に比べて大規模な事例となることが多い。これはカレーなどの煮込み料理を大量に調理した際、すぐ提供されずに増殖可能な温度で長時間置かれることで急激に増え、不十分な再加熱により死滅せずに喫食されることが原因である³²⁾。背景からウエルシュ菌の関与が疑われる場合は、嫌気培養を実施し本菌を検出することで事態の早期解明に貢献できると思われるので、是非覚えておいていただきたい。

IV. 参考文献

- 1) 日本臨床衛生検査技師会監修. 2017. 臨床微生物検査技術教本. p. 135-136. 丸善出版, 東京.
- 2) 劇症型溶血性レンサ球菌感染症 感染症法に基づく医師及び獣医師の届出について 厚生労働省. <https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekakukansenshou11/01-05-06.html> 2024 年 7 月 27 日現在.
- 3) A 群溶血性レンサ球菌による劇症型溶血性レンサ球菌感染症の 50 歳未満を中心とした報告数の増加について 国立感染症研究所. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/group-a-streptococcus-m/group-a-streptococcus-iasrs/12461-528p01.html>

2024 年 7 月 27 日現在

- 4) 日本臨床衛生検査技師会監修. 2017. 臨床微生物検査技術教本. p. 161-162. 丸善出版, 東京.
- 5) 西 順一郎. 2022. グラム陰性桿菌-ESBL. 医学と薬学 79: 629-634.
- 6) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2024. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100-Ed34, CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 7) チフス菌・パラチフス A 菌 検査・診断マニュアル (2021 年 9 月改訂) 国立感染症研究所 https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/typhoid_paratyphoid20210916.pdf 2024 年 12 月 21 日現在
- 8) 厚生労働省検疫所 FORTH 腸チフス、パラチフス <https://www.forth.go.jp/moreinfo/topics/name11.html> 2024 年 12 月 21 日現在
- 9) 渡邊 浩. 2019. 腸チフス・パラチフス. 日臨微誌. 29:135-139.
- 10) 深在性真菌症のガイドライン作成委員会. 2014. 深在性真菌症の診断・治療ガイドライン. p. 12-13, 医歯薬出版, 東京.
- 11) D.H. ラローン (山口英世 監修・吉田敦 共訳, 他.). 2013. 医真菌同定の手引き 第 5 版. p. 284-286. 栄研株式会社, 東京.
- 12) 松本泰伸, 鈴木真言, 二瓶博義, 他. 2022. 形態学的に *Aspergillus niter* と同定された菌株の MALDI-TOF MAS と遺伝子系統解析による同定検討. 日本臨床微生物学会雑誌 32 (1): 23-28.
- 13) 山口英世, 内田勝久. 1994. 真菌症診断のための検査ガイド. p. 115-119. 栄研株式会社, 東京.
- 14) Mutters R, I'm P, Pohl S, Frederiksen W, Mannheim W. Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dogmatic*, *Pasteurella cans*, *Pasteurella stomata's*, *Pasteurella anattas*, and *Pasteurella longa*. Int. J. Syst. Bacteriol. 1985; 35:309-322.
- 15) 大橋久美子, 滝川久美子, 荒井ひろみ, 他. 2016. *Pasteurella multocida* の分離状況と患者背景—最

- 近 9 年間の成績—。日本臨床微生物学会雑誌 26 (2): 34-40.
- 16) 静野 健一. 2021. グラム陰性桿菌 パスツレラ属菌. 検査と技術(増刊号) vol49 (3) : 341-343.
- 17) 佐々木 雅一, 岡秀昭 . 2018. *Pasteurella multocida*. 微生物プラチナアトラス : 107-109.
- 18) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2016. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria, M45 3rd Edition. Table 17
- 19) Jensen A, Hoshino T, Kilian M. 2013. Taxonomy of the Anginosus group of the genus *Streptococcus* and description of *Streptococcus anginosus* subsp. *whileyi* subsp. nov. and *Streptococcus constellatus* subsp. *viborgensis* subsp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 63: 2506-2519.
- 20) 永田邦昭. 2022. 感染症診断に役立つグラム染色 第3版. p. 53-63. シーニュ, 東京.
- 21) Pilarczyk-Zurek M, Sitkiewicz I, Koziel J. 2022. The Clinical View on *Streptococcus anginosus* Group - Opportunistic Pathogens Coming Out of Hiding. Front Microbiol. 13: 956677.
- 22) 長宗秀明. 2008. アンギノーサス群連鎖球菌の病原因子. 日本細菌学雑誌. 63: 425-435.
- 23) Issa E, Salloum T, Tokajian S. 2020. From Normal Flora to Brain Abscesses: A Review of *Streptococcus intermedius*. Front Microbiol. 11: 826.
- 24) 仲宗根勇. 1998. *Streptococcus milleri* group の同定. 検査と技術. 26: 15-19.
- 25) Kiu R, Hall LJ. 2018. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. Emerg Microbes Infect. 7: 141.
- 26) 土手内靖他. 2012. 高度の血管内容血を合併した *Clostridium perfringens* の劇症感染に関する検討. 松山赤十字医誌 12: 61-66.
- 27) 塚田彩実他. 2018. 高度の血管内容血を呈した劇症型 *Clostridium perfringens* 感染症の 1 症例. 医学検査 67(4): 569-574.
- 28) 小田真隆. 2012. ウエルシュ菌 α 毒素研究の最新知見. 日本臨床. 70(8): 1313-1317.
- 29) 犬塚和久, 他. 2016. 微生物検査ナビ. 第 2 版. p. 310-311. 栄研化学, 東京.
- 30) 永田邦昭. 2006. 感染症診断に役立つグラム染色. p. 139-141. シーニュ, 東京.
- 31) 日本臨床微生物学雑誌. 2012. 嫌気性菌検査ガイドライン 22(1): 1-142.
- 32) ウエルシュ菌感染症とは 国立感染症研究所. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/324-c-perfringens-intro.html> 2024 年 7 月 27 日現在.

V. 問い合わせ

微生物検査研究班研修会では本サーベイの出題内容に触れることもありますので、是非、研修会をご活用いただき、検査精度の向上に努めてくださいますようお願いいたします。

なお、精度管理調査の改善に繋がるようなご意見、ご提案などございましたら、私どもまでご連絡くださいますようお願いいたします。

<精度管理事業委員 微生物担当者の連絡先>

小山 忍 (株式会社ミロクメディカルラボトリー)
TEL : 0267-54-2111
FAX : 0267-54-2444
E-mail : mml-kensa@miroku-lab.co.jp
FAX または E-mail にてお願いいたします。

フォトサーベイ設問 担当者
名取 達矢 信州大学医学部附属病院 臨床検査部
小口 はるみ 諏訪赤十字病院 検査・輸血部
小口 渉 岡谷市民病院 検査科
三浦 信樹 長野市民病院 臨床検査科
高見沢 将 佐久総合病院 佐久医療センター 臨床検査科