

微生物検査

I. 試料 13

<13-1 同定検査>

正解 : *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* (MSSA)

正答率 : 100 % (43/43 施設)

<13-2 Zone edge 法によるβ-ラクタマーゼ産生試験>

正解 : 陽性

正答率 : 96.9 % (31/32 施設)

不正解 : 陰性 3.1 % (1/32 施設)

Zone edge 法 実施せず : 11 施設

【解説】

本設問では、β-ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）産生のメチシリン感性 *S. aureus* (MSSA) を出題した。

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) では

「*Staphylococcus* 属菌の薬剤感受性試験の結果、ペニシリンの MIC が $\leq 0.12 \mu\text{g/mL}$ または Disk 阻止円直径が $\geq 29 \text{ mm}$ の *Staphylococcus* 属菌 に対して、penicillin に感性であると報告する前にβ-ラクタマーゼ産生を検出するための検査を実施すること」としている。検出法の一つにニトロセフィン法によるβ-ラクタマーゼ試験がある。この試験の注意点は、penicillin または cefoxitin disk 周辺の阻止円周縁の誘導発育部を試験に用いることと、陰性判定は1時間後に行うことである。

CLSIM100-Ed33 では、ニトロセフィン法で判定する場合に「結果が陽性であればβ-ラクタマーゼ産生あるいは、penicillin 耐性と報告してよいが、陰性であれば penicillin 感性と報告する前に、penicillin zone-edge test

(以下 zone edge 検査) で確認すべき」とされており、

「検査室内で一つの検査のみ行うのであれば、zone edge 検査を実施すること」が推奨されている。これは、後者の方が、ニトロセフィン法より高感度にペニシリナーゼの産生を確認できるためである¹⁾。今回出題した供試菌株はニトロセフィン法および zone edge 検査共に陽性であるが、陰性報告が1施設で見られた。誤判定の原因として、Disk 阻止円の判読ミスまたは検査

に用いたペニシリンディスクの薬剤力価低下（保管状況、有効期限切れ等）が関与した可能性も考えられるが、詳細は不明であるため原因究明をお願いしたい。

また、zone edge 検査について「実施せず」と回答した施設が11施設で見られた。医師が治療薬として penicillin を選択する場合、検出菌のペニシリナーゼ産生は極めて重要な情報である。本調査を機に、「実施せず」と回答された施設では zone edge 検査の判定を含めて手順を理解いただき、正しい結果を報告できる体制の整備を推奨する。

II. 試料 14

<同定検査>

正解 : *Yersinia enterocolitica*

正答率 : 100 % (42/42 施設)

無回答 : 1 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 ($\mu\text{g/mL}$)
ABPC	R (自然耐性)	≤ 4
CAZ	S	≤ 1
MEPM	S	≤ 0.12
GM	S	≤ 2
LVFX	S	≤ 0.12

* Neg Combo EN 5J パネル (バックマン・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 (自然耐性)	22-24
CAZ	S	37-39
MEPM	S	34-36
GM	S	28-30
LVFX	S	32-34

* センシディスク (日本 BD) による測定結果

表 3. CLSI M100-Ed33 腸内細菌目細菌の判定基準
微量液体希釈法 ($\mu\text{g/mL}$)

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

※ボールド表記：CLSI M100-Ed33 より変更

表 4. CLSI M100-Ed33 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
GM	10 µg	≧18	15-17 [^]	≦14
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	測定不可
ABPC	36	1(2.8)	0	34(94.4)	1
CAZ	36	33(91.7)	0	2(5.6)	1
MEPM	36	33(91.7)	0	0	3
GM	36	35(97.2)	0	0	1
LVFX	35	34(97.1)	0	0	1

： 正解

【解説】

Yersinia enterocolitica は腸内細菌目、*Yersinia* 科に属するグラム陰性桿菌で、一般的には発熱、下痢、腹痛等を主症状とする胃腸炎の原因菌であるが²⁾、腸管膜のマクロファージに寄生し、回腸末端炎、腸間膜リンパ節炎や敗血症等の腸管感染症以外の病状を呈することもある¹⁴⁾。本菌はブタ等の家畜、げっ歯類、イヌ等に分布しており、本菌に汚染された豚肉、井戸水、湧水や、これらによって二次的に汚染された食品（野菜サラダ等）から経口的に感染する³⁾。1972年以降散発例と集団感染事例が報告されており、現在においても本菌による感染症は散見される⁴⁾。本菌の至適発育温度は28°C付近であるが、4°Cでも発育可能である。選

択分離培地としては CIN 寒天培地があり、48 時間培養でマンニットを分解して赤色コロニーを形成する²⁾。乳糖非分解であることから、SS 寒天培地では透明コロニーとなる⁵⁾。それ以外の生化学的性状としては白糖分解、オルニチン脱炭酸反応陽性、ウレアーゼ陽性等が挙げられる。また、30°C以下で周毛性鞭毛を発現することから25°C培養で運動性陽性²⁾、さらにVP反応も25°C培養で陽性となるため、本菌が疑われた場合には培養温度を変更して運動性、VP反応を確認することも必要である。

出題した菌株は ABPC の MIC 値が ≦8 µg/mL で感性的 (S) であるが、本菌種は ABPC に自然耐性であるため耐性 (R) として報告する必要がある⁸⁾。耐性と報告すべきところを感性と報告した場合、**very major error (以下 VME)** に該当するが、1 施設 (2.8%) で感性と報告されていた。薬剤感受性試験の結果は、感染症の治療方針を決定する上で非常に重要な要素である。VME が原因で誤った抗菌薬を選択した場合、患者の治療に悪影響を与える可能性が生じる。また、本菌は ABPC 以外に CVA/AMPC、第一世代セファロスポリンに対しても自然耐性を示す¹⁾。VME の発生を予防するためにも、CLSI ドキュメントの自然耐性 (内因性耐性) の項を再度確認することをお勧めする。

CLSI M100-Ed33 から腸内細菌目細菌の GM 判定基準が変更となったが、旧判定基準を用いた回答が 1 施設で見られた。

なお、ABPC の MIC 値において機器間差が認められたため評価対象外とした。

III. フォトサーベイ

【設問1】

<問題 1-1 推定微生物名>

正解 : *Gardnerella vaginalis*

Mobiluncus sp.

正答率 : 100 % (43/43 施設)

<問題1-2 スコア判定>

正解 : スコア10

正答率 : 97.7 % (42/43施設)

不正解 : スコア4 2.3 % (1/43施設)

健康成人女性の膣内常在細菌叢は *Lactobacillus* 属菌が大部分を占めており、膣内を pH4.5 以下に保つことで、その他の雑菌の侵入・増殖を防いでいる。膣内の *Lactobacillus* 属菌が減少することによって pH が上昇し、*Gardnerella vaginalis* や *Mobiluncus* 属といった菌が過剰増殖してくるものの、カンジダやトリコモナスなど特定の病原体は検出されない病態を細菌性膣症と呼ぶ。設問の写真のように扁平上皮細胞の上に多数の細菌が付着した“clue cell”が観察されることが細菌性膣症の特徴的な所見である。診断のためには膣内分泌物のグラム染色所見による判定基準“Nugent の方法”が用いられる。標本を 1,000 倍で鏡検し、1 視野あたりの *Lactobacillus* type、*Gardnerella* type、*Mobiluncus* type の菌数から算出した Nugent Score が 7 以上の場合に細菌性膣症と判定される^{6,7)}。本設問では、*Lactobacillus* type 観察されず：スコア 4、*Gardnerella* type >30/視野：スコア 4、*Mobiluncus* type >30/視野：スコア 2 であることから、Nugent Score : 10 と判定される所見である。

<設問 1-3 KOH 法>

正解：爪検体をセミアルカリプロテアーゼで溶解させる。

正答率：93.0% (40/43 施設)

不正解：コントラストを上げるために絞りを小さくし、コンデンサーを下げて低倍率 (100 倍) で鏡検する。4.7% (2/43 施設)

低倍率で菌糸を疑うものが観察されたら高倍率 (400 倍) で詳細な構造を観察する。2.3% (1/43 施設)

皮膚糸状菌などはコロニーの形成に時間を要するため、真菌感染症の診断においては検体の直接鏡検による診断が有用となる。爪や皮膚、毛髪を対象とし、水酸化カリウムで検体を溶かして観察し易くする KOH 法が最も代表的である。20~40% の KOH 溶液で検体を溶解させて観察する方法や、DMSO を追加して溶解を促進させる方法、インクの添加により真菌要素の染色を行う方法がある。まず、弱拡大でコントラストを高めて観察することで真菌の有無を確認し、疑わしい構造物が確認された場合は倍率を上げて詳細な構造を観察し、糸状菌や酵母様真菌の鑑別を行う⁸⁾。

酵母様真菌は球状の孢子集団が観察されるのに対し、糸状菌は菌糸や隔壁構造が観察されることが鑑別点となる。また、菌糸状に見えるが真菌ではなく、標本中に生じる真皮の弾性線維や細胞膜の脂質による菌様モザイクとの鑑別に熟練を要する⁹⁾。

【設問 2】

正解：*Scedosporium apiospermum* または *Scedosporium* sp.

正答率：95.3% (41/43 施設)

不正解：*Trichophyton* sp. 2.3% (1/43 施設)
Fusarium sp. 2.3% (1/43 施設)

Scedosporium apiospermum は土壌、沼地等の環境中に広く分布する糸状菌である¹⁰⁾。コロニー所見としては、初め凹凸のある白色のコロニー表面が時間の経過とともに灰色~黒色調に変色することが多く、7 日程度で成熟する¹¹⁾。また、顕微鏡的形態としては隔壁のある菌糸が分生子柄を伴い、その先端に卵円形の分生子が 1 個~複数個観察される⁸⁾。本設問においても特徴的なコロニー所見及び顕微鏡的形態から、*Scedosporium* 属菌を推定することが可能である。

本菌は血液腫瘍患者、ステロイド剤や免疫抑制剤を投与されている患者において、肺炎、骨髄炎、関節炎等の播種性・侵襲性感染を起こすことが知られている¹⁰⁾。また、河川や沼地の汚泥に生息する特徴から、洪水、津波等の自然災害における被災者の感染も報告されている¹¹⁾。

本菌はアムホテリシン B やミカファンギン等、多くの抗真菌薬に対して耐性を示し、治療薬としてはボリコナゾールが推奨される^{12,13)}。菌種が判明した時点で選択される抗真菌薬が限定されてしまうことから、正確かつ迅速な菌種同定が診断及び治療に不可欠である。

【設問 3】

<耐性機序>

正解：ESBL

正答率：95.3% (41/43 施設)

不正解：ESBL+外膜蛋白ポーリン減少/欠損
4.7% (2/43 施設)

基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (extended-spectrum β-lactamase : ESBL) は突然変異を起こしたペニシリンーゼ産生遺伝子によって産生され、ペニシリン系薬に加えセファロスポリン系薬、モノバクタム系薬を加水分解するβ-ラクタマーゼである。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は分解せず、クラブラン酸 (CVA)、スルバクタム (SBT)、タゾバクタム (TAZ) などのβ-ラクタマーゼ阻害剤によって酵素活性が阻害される。

ESBL 産生菌の検出法は CLSI に準拠したものが一般的であり、CLSI では *Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella oxytoca*、*Proteus mirabilis* を対象としたスクリーニング検査、確認検査についてディスク拡散法および微量液体希釈法の判定基準が設定されている¹⁴⁾。設問では、*E. coli* の薬剤感受性試験の結果から ESBL 産生を疑い、(フォト 3-A) に示す Double disk synergy test (DDST) による確認試験において、CTX および CPDX 単剤に比べ CVA による酵素活性の阻害を認めていることから ESBL 産生と判定する。2 施設において「ESBL+外膜蛋白ポーリン減少/欠損」と回答された。外膜ポーリン孔が減少または欠損した場合、カルバペネム系抗菌薬に耐性をもたらず主要な機序となるが、本設問では MEPM: S ≤ 0.5 μg/mL であることから「ESBL」のみを正解とした。CLSI のディスク拡散法による確認試験では、抗菌薬単剤に比べ抗菌薬とクラブラン酸の併用における阻止円が 5mm 以上の拡張を認めた場合 ESBL 産生と判定する。その他の検出法にはシカベータテスト (関東化学)、AmpC/ESBL 鑑別ディスク (関東化学)、PCR 法による遺伝子検査等がある¹⁵⁾。

国内で多く報告されている ESBL は Ambler の分類で主にクラス A に属し、酵素名は TEM 型、SHV 型、CTX-M 型などが知られている。伝達性プラスミドにコードされ、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。1990 年代は欧米を中心として TEM 型や SHV 型による院内感染の報告が多かったが、2000 年以降世界的に CTX-M 型の検出が増加し、さらに *E. coli* では同時にフルオロキノロン系薬に耐性を示す菌株が多く、尿路感染において院内のみならず

市中感染の原因となっている¹⁶⁾。

【設問 4】

<設問 4-1 推定微生物名>

正解 : *Granulicatella adiacens*

正答率 : 93.0 % (40/43 施設)

不正解 : Nutritionally variant streptococci (NVS)

4.7 % (2/43 施設)

Abiotrophia defectiva

2.3 % (1/43 施設)

<設問 4-2>

正解 : Pyridoxal hydrochloride

正答率 : 100 % (43/43 施設)

栄養要求性レンサ球菌 (NVS : nutritionally variant streptococci) とは、発育に L-cysteine と pyridoxal hydrochloride (ビタミン B6) を要求する、通常の連鎖球菌とは栄養要求性が異なる菌である。NVS の中で、*Granulicatella balaenopterae* 以外の *Abiotrophia defectiva*、*Granulicatella adiacens*、*Granulicatella elegans* はヒトの口腔内や消化管内に常在し、臨床材料からも分離される¹⁷⁾。

NVS は微好気性のグラム陽性球菌で、性状はカタラーゼ陰性、PYR 陽性、LAP 陽性を示す。NVS は感染性心内膜炎、敗血症、結膜炎、中耳炎、腭膿瘍、創部感染などの起炎菌となるが¹⁹⁾、その栄養要求性の厳しさのため、報告までに非常に時間を要する場合や、培養陰性と報告 (偽陰性化) されてしまう可能性があり、その存在と性状を正しく理解しておく必要がある。

NVS はハートインフュージョンベースの血液寒天培地 (以下 HIA) や、トリプチケースソイブロスベースの血液寒天培地 (以下 TSA) での好気培養では発育を認めない。しかし、HIA や TSA に、pyridoxal あるいは L-cysteine を添加した特殊な血液寒天培地 (NVS 発育支持培地) では発育を認める。この機会に、自施設の血液寒天培地のベースが何であるのか、再度確認されたい。

NVS はチョコレート寒天培地以外に変法 GAM 寒天培地、ブルセラ HK 寒天培地などの嫌気性菌用寒天培地の炭酸ガス培養もしくは嫌気培養で発育する。グラ

ム染色で連鎖球菌を認めるものの通常の血液寒天培地で発育を認めない際は、これらの培地や培養条件を併用する事で、菌の推定や報告時間の短縮に努めたい。

NVS の薬剤感受性試験については、CLSI M45-Ed3 の Table1 の Medium に CAMHB-LHB に対して 0.001% の pyridoxal hydrochloride を添加して検査する旨が記載されている¹⁸⁾。判定基準も専用のものが記載されているので併せて確認されたい。

【設問 5】

正解： *Actinotignum schaalii*

正答率：93.0% (40/43 施設)

不正解： *Cutibacterium* sp. 2.3% (1/43 施設)

Lactobacillus sp. 2.3% (1/43 施設)

Aerococcus urinae 2.3% (1/43 施設)

Actinotignum schaalii は、アクチノマイセス科、*Actinotignum* 属の無芽胞、非抗酸性の通性嫌気性グラム陽性桿菌で、主に尿路感染症からの報告があるが、菌血症、皮膚軟部組織感染症、感染性心内膜炎、関節炎などの報告もある¹⁹⁾。本菌は 5%炭酸ガス培養や嫌気培養で発育し、好気条件でほとんど発育しない。そのため、尿検体の培養を好気条件のみで実施している施設では本菌の検出が困難となる。また、本菌を含む複数の菌が存在する検体では、好気培養で発育する菌が先に検出され、発育の遅い本菌は見逃されてしまう状況となり、本菌の検出率および有病率は過小評価されている可能性がある¹⁹⁾。本菌はグラム染色でコリネフォームを呈するため、グラム染色で *Corynebacterium* spp. と誤判定されてしまうことも過小評価される要因の一つである。

Actinotignum 属菌の同定には、16S rRNA 遺伝子解析や質量分析法が必要であり、同定キットによる同定が困難である¹⁹⁻²¹⁾。また、質量分析法においても機種間差があり、VITEK MS (ビオメリュエ社) では本菌の同定が可能とされているが、MALDI バイオタイパー (ブルカー社) では「*Actinotignum sanguinis* と極めて似たスペクトルパターンを示すため、これらの種を区別するのは難しい。」との注記コメントが付記される。そのため生化学的性状、コロニーの色の違い、溶血性の違い

などを確認する必要がある。*A. sanguinis* との鑑別には L-アラビノース、D-リボース、マルトースが有用で、本菌はすべて陽性、*A. sanguinis* はすべて陰性である。コロニー所見では、本菌は α 溶血を呈するのに対し、*A. sanguinis* は溶血を示さない。また、*Corynebacterium* 属菌との鑑別点としてはカタラーゼ試験が挙げられるため、コロニーを発育させることができれば簡易的な鑑別は可能である。よって塗抹鏡検にてグラム陽性桿菌が確認され、好気培養で発育が認められない場合、本菌を念頭に置き、培養を追加することが重要となる。遺伝子検査設備や質量分析装置を持たない施設では同定まで至ることはできなくとも本菌を考慮した検査の進め方を構築する必要があると考えられる。

薬剤感受性試験についてだが、CLSI および EUCAST では *A. schaalii* に対して抗菌薬のブレイクポイントは設定されていない。既報によれば β -ラクタム系抗菌薬、TEIC、VCM に対しては低い MIC 値を示し、ST 合剤、CPFX に対しては高い MIC 値を示すとのことである^{19, 20)}。ST 合剤やフルオロキノロン系抗菌薬は、一般的に尿路感染症に対して経験的治療としてよく使用されるが、*A. schaalii* の関与が考えられる場合は、 β -ラクタム系薬や、VCM などの抗 MRSA 薬の使用を検討する必要があることが報告されている¹⁹⁾。

IV. 参考文献

- 1) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2023. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100-Ed33, CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 2) 日本臨床衛生検査技師会監修. 臨床微生物検査技術教本. 2017. p. 160-161. 丸善出版, 東京.
- 3) 塚野尋子. 2003. エルシニア属のヴィルレンス遺伝子 (ペスト菌, 仮性結核菌, エンテロコリチカ菌) 日本臨床 第 61 巻 第 3 号 増刊号 p. 709-715. 株式会社日本臨牀社, 東京.
- 4) エルシニア感染症. 厚生労働省. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansenmohanashi/364-yersinia-intro.html> 2023 年 12 月 26 日現在.
- 5) 堀井俊伸監修. 2016. 微生物検査ナビ 第 2 版. p. 84-85. 栄研化学格式会社, 東京.

- 6) Nugent RP, et al. J Clin Microbiol 1991; 29: 297-301
- 7) 日本産科婦人科学会、日本産婦人科医会. 日本産婦人科診療ガイドライン—婦人科外来編 2020.
- 8) D.H.ラローン. 2013. 医真菌同定の手引き 第5版. p. 208-211. 栄研化学株式会社, 東京.
- 9) 望月 隆ら, 2019. 日本皮膚科学会皮膚真菌症診療ガイドライン 2019
- 10) Luna-Rodríguez CE, Treviño-Rangel RJ, Montoya AM, et al. 2019. Scedosporium spp.: Chronicle of an emerging pathogen. Medicina Universitaria 21 : 4-13.
- 11) 中館俊英, 井上義博, 前門戸任. 2018. 津波肺：スケドスポリウム症の特徴と診療の実際. 新薬と臨床. 67 : 258-266.
- 12) 4) 山口英世. 2007. 病原真菌と真菌症 第4版. p. 202-203. 南山堂, 東京.
- 13) 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 2014. p. 130-134. 協和企画, 東京.
- 14) 赤松紀彦, 柳原克紀. 2022. β-ラクタム系薬剤耐性菌検査法の現状と今後に向けて. 臨床と微生物 49 (増刊号) : 509-517.
- 15) 西 順一郎. 2022. グラム陰性桿菌-ESBL. 医学と薬学 79: 629-634.
- 16) Benjamin A Rogers, Hanna E Sidjabat, David L Paterson. 2011. Escherichia coli O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. J Antimicrob Chemother. 66(1): 1-14
- 17) 江成 博. 2015. 栄養要求性レンサ球菌の検出と同一に関する問題点. 日臨微誌 25: 10-18.
- 18) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2015. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria, M45 3rd Edition. p12-13.
- 19) 米谷正太, 荒木光二, 井田陽子, 他. 2018. *Actinotignum schaalii* (旧 *Actinobaculum schaalii*) が血液培養から検出された 4 例. 日臨微誌 28 : 35-41.
- 20) 中岡裕輔, 木場由美子, 田寺加代子, 他. 2021. 菌血症を伴った *Actinotignum schaalii* による尿路感染症の 1 例. 広島臨床検査 10 : 35-38.

- 21) 加嶋菜々子, 平野大志, 橋本大, 他. 2023. *Actinotignum schaalii* による尿路感染症の 1 例. 小児科臨床 76: 77-80.

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ラトリー)

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
三浦 信樹 長野市民病院 臨床検査科
小口 はるみ 諏訪赤十字病院 検査・輸血部
高見沢 将 佐久総合病院 佐久医療センター 臨床検査科
小口 渉 岡谷市民病院 検査科