

緑膿菌に対する Break-point checkerboard plate による抗菌薬併用効果の検討

◎中野 雅巳¹⁾、南 健太¹⁾、大西 舞¹⁾、野尻 敬子¹⁾、本村 友希¹⁾、柴田 有理子¹⁾、久保田 芽里¹⁾
大阪医科大学附属病院 中央検査部¹⁾

【はじめに】*Pseudomonas aeruginosa* は様々な耐性機序により、容易に耐性化することで知られている。感染症法における5類感染症では、カルバペネム系、アミノグリコシド系、フルオロキノロン系のすべての系統に耐性を示すものを Multi-drug resistant *P. aeruginosa* (MDRP) と定義されるが、実際には2系統以上の抗菌薬に耐性であるときは治療に難渋することも少なくない。その際、複数の抗菌薬による併用療法が選択されることがある。今回我々は、緑膿菌に対する抗菌薬の併用効果について Break-point checkerboard plate (栄研化学、以下、BCプレート) を用いて検討を行ったので報告する。

【対象と方法】2015年から2018年に検出された臨床分離菌株を用い、VITEK2 AST-N268 (バイオメリュー) により2系統以上耐性と判定された15株を対象とした。併用効果はBCプレートを添付文書に従い実施し、2薬剤2濃度の組み合わせを19種測定した。測定結果から Fractional Inhibitory Concentration index (以下 FIC index) を算出し、 $FIC\ index \leq 0.50$ を相乗効果、 $0.50 < FIC\ index \leq 1.00$ を相加

効果、 $1.00 < FIC\ index \leq 2.00$ を不関、 $2.00 < FIC\ index$ を拮抗と判定した。

【結果】すべての組み合わせのうち、最も相乗効果があるとされた抗菌薬の組み合わせは ceftazidime と rifampicin であり 26.7% (4/15 株) であった。相乗・相加効果を合わせると rifampicin と colistin の組み合わせが 53.3% (8/15 株)、ceftazidime と rifampicin が 46.7% (7/15 株) であった。また、拮抗と判定された組み合わせは 42.1% (8/19 種) であったが、それぞれ1株ずつであった。

【考察】今回の検討では2濃度ずつの組み合わせでしか併用効果をみることができなかつたため、正確な MIC を判定できず測定に限界があった。また、2系統以上耐性と判定した菌株を対象としたため、単剤で MIC の低かつた amikacin の相乗・相加効果を結果として表すことができなかつた。しかし、いくつかの組み合わせでその効果を認めため、BCプレートの測定は抗菌薬併用治療の可能性を示唆できるものと考えられた。

会員外共同研究者：舌 智香子 連絡先：072-683-1221

DPS192iX を使用した *Corynebacterium* 属に対する薬剤感受性検査の検討

◎松本 紗也加¹⁾、大沼 健一郎¹⁾、石田 奈美¹⁾、小林 沙織¹⁾、西田 全子¹⁾、山下 愛¹⁾、楠木 まり¹⁾、今西 孝充¹⁾
国立大学法人 神戸大学医学部附属病院¹⁾

【背景】*Corynebacterium* 属はグラム陽性短桿菌で、ヒトの皮膚、上気道粘膜、腸管に常在しているが日和見病原菌としても知られている。特に、免疫不全者や無菌材料から検出された場合には同定検査および抗菌薬感受性検査の実施が必要となるが、自動機器での測定が可能な機器は少なく、当院では薬剤感受性パネルおよび E-test を使用し目視により MIC 値を判定している。今回、自動で培養、判定が可能な微生物感受性分析装置 DPS192iX (栄研化学、以下 DP192) を用い、*Corynebacterium* 属の薬剤感受性検査の精度を検証し、有用性を検討した。【対象および方法】対象は、*Corynebacterium* 属菌 29 株 (内訳: *C. amycolatum* 3 株, *C. jeikeium* 4 株, *C. striatum* 22 株) とした。マックファーランド 0.5 濁度の菌液 25 μ L をストレプト・ヘモサプリメント F2.5‘栄研’入りミュラーヒントンブイオン‘栄研’へ添加し、感受性測定プレート EP32 に接種した。DP192 を用い、35 $^{\circ}$ C、24 時間および 48 時間好気培養後の 8 薬剤 (PCG, MEPM, VCM, GM, EM, CLDM, ST, LZD)

の MIC 値を測定した。ブレイクポイントの判定は CLSI M45 3rd Edition を参照した。対照法として、ストレプト・ヘモサプリメント‘栄研’1mL とドライプレート栄研 DP32 を用いた微量液体希釈法、および E-test (PCG, MEPM) を用いたディスク法を施行し、DP192 と対照法における MIC 値一致率およびカテゴリー一致率を評価した。【結果】MIC 値一管差一致率は 80~100%、カテゴリー一致率は 64~100%で、VCM, LZD, MEPM, ST で高値、GM で低値であった。*C. amycolatum* は 24 時間培養では発育不良で 48 時間培養で判定可能であった。また、*C. jeikeium* 3 株は培養 48 時間時点でも発育不良であった。【結語】DP192 を用いた *Corynebacterium* 属の薬剤感受性検査は、対照法と同等の精度であり、菌種によって 48 時間判定が必要となったり発育不良となることが課題と考えられたが、目視判定による検査者間差や誤入力を防止でき、ルーチン検査に有用と考えられた。【謝辞】本発表に際しご指導賜りました当院検査部 三枝 淳先生に深謝致します。 連絡先 078-382-6327

Actinotignum urinae のウレアーゼ活性により高アンモニウム血症を来した 1 症例

◎阿部 教行¹⁾、佐藤 吉祥¹⁾、松本 学¹⁾、大野 裕貴¹⁾、松谷 日路子¹⁾、福田 砂織¹⁾、嶋田 昌司¹⁾、松尾 収二¹⁾
公益財団法人 天理よろづ相談所病院¹⁾

今回ウレアーゼ活性を有する細菌による尿路感染を契機に、高アンモニア血症を来したと思われた症例を経験したので報告する。

【現病歴】

100 歳代男性。意識障害を主訴に当院救急外来を受診された。血液検査にてアンモニア高値であり、肝酵素の上昇は認めなかった。排尿障害があったことから尿路感染が疑われ、尿培養と血液培養が提出された。尿グラム染色ではグラム陽性桿菌（GPR）を 4+ 認めた。好気培養では GPR が発育しなかったため、嫌気培養を追加したところ GPR の発育を認めた。質量分析計（MALDI Biotyper, Bruker 社）では同定できず嫌気性 GPR で報告したところ、主治医より本菌のウレアーゼ活性を調べて欲しいと問い合わせがあり、キット検査にて確認したところ陽性であった。本菌について 16srDNA シーケンスを行い、*Actinotignum urinae* と同定した。血液培養は陰性であった。導尿後より血中アンモニア値の低下と意識障害の改善を認め、他に意識障害の原因が明らかでなかった

ことから、本菌のウレアーゼ活性が原因となった高アンモニア血症と考えられた。

【考察】尿路感染の起炎菌となる GPR の内、ウレアーゼ活性を有し高アンモニア血症の原因菌として代表的なのは *Corynebacterium urealyticum* である。*A. urinae* はカタラーゼ陰性であるため鑑別が可能となる。*Actinotignum* 属は通性嫌気性で、*Actinobaculum* 属から分離し *A. urinae* を含め 3 菌種あるが、ウレアーゼ活性を示すのは本菌のみである。当院の質量分析計のデータベースでは *Actinobaculum urinae* となっており、質量分析の同定は上記となったが、同定スコアが低く断定できなかったため遺伝子学的同定を行った。嫌気培養ないし炭酸ガス培養、カタラーゼ試験およびウレアーゼ活性を検査することで本菌を迅速に疑うことが可能となる。

【まとめ】尿培養において GPR を認めた場合、血中アンモニア値や意識状態などを確認し、*A. urinae* の可能性を考慮して培養検査を進めるべきである。

[連絡先：臨床検査部 0743-63-5611 内線 8665]

Ziehl-Neelsen 染色を追加したことで皮下膿瘍から *M.chelonae* を検出できた 2 症例

◎伊藤 拓哉¹⁾、小浦 範明¹⁾、山中 陽子¹⁾
高砂市民病院¹⁾

【はじめに】*Mycobacterium chelonae* は Runyon のグループ IV に分類される非結核性抗酸菌 (NTM) の一種で、土壌、水など自然環境に常在する。今回、皮下膿瘍から *M. chelonae* を検出した症例を 2 例経験したので報告する。

【症例 1】67 歳男性、他院にて維持透析の患者。3 週間前より右足関節内側部に発赤腫脹を認め、当院形成外科を受診。軟膏処置を行ったが軽快せず入院となった。切開排膿時に採取された膿汁のグラム染色にて難染性の菌が確認され Ziehl-Neelsen 染色を追加したところ、抗酸菌を認めた。

【症例 2】44 歳男性、ステロイド依存性ネフローゼ症候群で他院通院中の患者。4 日前より疼痛を伴う腫瘤を胸部に認め、当院形成外科を紹介受診。切開排膿時に採取された膿汁のグラム染色では白血球を多数認めたが、菌は認められなかった。患者背景から抗酸菌による感染の可能性も考慮し Ziehl-Neelsen 染色を追加したところ、抗酸菌を認めた。

【細菌学的検査】両症例とも抗酸菌を認めたため TRC Rapid-160 (東ソー) にて遺伝子検査を実施したが MTB、MAC 共に陰性であった。NTM 感染症を疑い、培養は 5% ヒ

ツジ血液寒天培地 (栄研) と 2% 小川培地 (極東製薬) を用い、30°C および 37°C で好気培養を行った。その結果、5% ヒツジ血液寒天培地において 30°C 培養で 4 日後に微小コロニーの発育を認めた。いずれの培養温度においても発育は認められたが、30°C 培養での発育がより良好であった。同定は DDH マイコバクテリア (極東製薬) および VITEK MS (バイオメリュー) を用い、いずれも *M. chelonae* と同定された。【考察】*M. chelonae* による皮膚感染症は糖尿病、悪性腫瘍などの基礎疾患をもつ患者や、ステロイド内服中の患者では播種性皮膚感染症のリスクが高くなるといわれている。症例 1 ではグラム染色で難染性の菌を認めたため Ziehl-Neelsen 染色を追加するに至ったが、症例 2 は検体中の菌量が少なかった可能性が高く、グラム染色で菌を確認することができなかった。皮下膿瘍で、白血球多数にもかかわらずグラム染色で菌が認められない場合には、抗酸菌による感染も疑い検査を進めていく必要がある。また、医師とのコミュニケーションを積極的にとり、患者背景などの情報共有も重要であると考え。連絡先：079-442-3981

迅速発育抗酸菌における血液寒天培地発育能の検討

◎谷野 洋子¹⁾、山田 幸司¹⁾、京谷 憲子¹⁾、安本 都和¹⁾、大長 洋臣¹⁾、鬼界 里英¹⁾、小森 千裕¹⁾、古屋 智子¹⁾
京都府立医科大学附属病院¹⁾

【目的】近年、非結核性抗酸菌による感染症報告例が増えている。非結核性抗酸菌の中でも遅発育菌と迅速発育菌では薬剤感受性検査方法が異なるため、適切な治療を行うためにもこの二つの判別は重要である。そこで、血液寒天培地を用いて培養を行い、簡便に遅発育菌と迅速発育菌の判別が可能か検討を行ったので報告する。

【対象】当院で抗酸菌培養陽性となった検体のうち、遺伝子検査（コバス TaqMan）にてTB およびMAC が陰性となり、質量分析装置（Biotyper）で同定可能であった80 検体（迅速発育菌：29 件、遅発育菌：51 件）を対象とした。*Mycobacterium* 属の主な内訳は *M. paragordoniae* 23 件、*M. gordonae* 22 件、*M. abscessus* 11 件、*M. chelonae* 7 件、*M. kansasii* 4 件、*M. fortuitum* 3 件、*M. goodii*/*M. mucogenicum*/*M. wolinskyi* 各 2 件であった。

【方法】培養陽性となった液体培地より血液寒天培地（日水製薬）に塗布し、CO₂ 条件下で培養を行った。2 日目、3 日目、5 日目に観察を行い血液寒天培地上のコロニーの有無とチールネルゼン染色にて抗酸菌であるこ

との確認を行った。

【結果】血液寒天培地 5 日間培養で抗酸菌の発育が確認できた検体は 80 件中 27 件であった。すべて迅速発育菌であり、遅発育菌と同定された株の中で血液寒天培地に発育してきたものはなかった。血液寒天培地で未発育となった迅速発育菌 2 件の内訳は *M. chelonae* 1 件、*M. mucogenicum* 1 件であった。

【考察】今回の検討結果より、抗酸菌培養陽性となった場合、血液寒天培地に塗布することにより発育の有無で遅発育菌と迅速発育菌の判別ができ、十分なコロニーが得られた段階で迅速発育菌として薬剤感受性検査を行うことが可能であることが判明した。血液寒天培地未発育であった迅速発育菌 2 件については、抗酸菌培養陽性まで 40 日以上要しており、菌種の特長ではなく抗酸菌培養陽性までの時間や液体培地内の菌量などが影響したと考えられる。今後、別メーカーの血液寒天培地での発育能や、今回用いた菌種以外の血液寒天培地発育能についても検討を続けていく予定である。 (075-251-5654)

Mycobacterium abscessus complex における Clarithromycin 誘導耐性化の予測

erm41-RT-qPCR を用いて

◎辰己 純一¹⁾、阿部 教行²⁾、野口 延由³⁾、大野 裕貴²⁾、中村 彰宏¹⁾、小松 方¹⁾、嶋田 昌司²⁾、松尾 収二²⁾
天理医療大学 臨床検査学科¹⁾、公益財団法人 天理よろづ相談所病院 臨床検査部²⁾、公益財団法人 天理よろづ相談所病院 臨床検査部、天理医療大学 臨床検査学科³⁾

【目的】

M. abscessus complex (*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*) の *erm41* 保有株は本菌感染症の治療薬である clarithromycin (CAM) の暴露により誘導耐性を示す。本菌の CLSI 標準法による薬剤感受性検査の判定は 14 日間と長期間を要する。今回 *erm41* 保有株における CAM 誘導耐性の発現を早期に検出する目的として *erm41* の mRNA を定量し、その定量値を MIC と比較した。

【対象】

2016 年から 2019 年に天理よろづ相談所病院で 8 症例から分離した 8 株を使用した。これら全ての株は *erm41* 遺伝子を保有し、かつ CAM 非誘導耐性の要素である 23S rRNA A2058G 変異を保有していなかった。亜種レベルの同定は *hsp* および *rpoB* の 2 つの遺伝子の PCR ダイレクトシーケンスで決定した。

【方法】

1) MIC 測定法

CLSI M24-A2 (2011) に準拠した微量液体希釈法を実施した。MIC 判定は 3、7 および 14 日目に行った。

2) *erm41*-mRNA の RT-qPCR

RNA 抽出は RNeasy® Mini Kit 50 (QIAGEN)を用いた。対象株をミューラーヒントンブロスで 3 日間培養後、1/8×MIC に調整した CAM に 3 日間暴露させ耐性を誘導させた。RT-qPCR は CAM 暴露群と非暴露群の菌液から RNA を抽出して行った。

【結果および考察】

対象の 8 株は 23S rRNA 変異を持たないため、MIC 測定の 3 日目判定はすべて感性であった。14 日目判定では耐性が 5 株、感性が 3 株あった。耐性株 5 株中 3 株で、CAM 暴露後有意に mRNA の発現量が上昇した。感性株全ては CAM 暴露の有無にかかわらず mRNA の発現はわずかであった。

以上の結果より CAM 暴露後に mRNA の発現量を測定することで 14 日目の MIC 判定を待たずに誘導耐性を予測できる可能性があること示唆された。

天理医療大学 臨床検査学科：0743-63-7811

当院の外部委託検査における抗酸菌検査の現状

◎安井 孝輔¹⁾、佐子 肇¹⁾、高橋 秀一¹⁾
社会福祉法人恩賜財団 済生会 中和病院¹⁾

【はじめに】

当院は外部委託による抗酸菌検査を実施している。近年、結核は年々減少傾向にあるのに対して、非結核性抗酸菌症(以下 NTM)は 2014 年に結核の罹患率を上回ったことから NTM が感染症として軽視できない状況にある。今回我々は、当院の抗酸菌分離状況について調査した。

【対象と方法】

2015 年 4 月から 2019 年 3 月までの期間に当院で抗酸菌検査依頼のあった 1,644 件のうち新規陽性となった結核菌群(以下 TB) 20 件および NTM 149 件を対象とした。抗酸菌分離状況、年齢、性別、材料比および各患者の治療の有無について後向き調査をした。ただし、同一患者で前回提出日が 1 ヶ月以内の検体は除外した。

【結果・考察】

対象は喀痰、気管支洗浄液などの呼吸器材料が 91.6% を占め、他に胃液、リンパ節等であった。抗酸菌の検出率は 8.5% ～ 11.6% と漸増傾向であった。分離菌の内訳は TB12.7%、NTM の内、MAC(*M.avium* complex)は *M.avium*

42.0%、*M.intracellulare* 33.1%が占め、その他の抗酸菌が 14.0%だった。結核患者はすべて転院先で治療したが、薬剤耐性は認めなかった。肺 MAC 症と診断された患者は経過観察が 70.4%、外来治療が 29.6%であった。治療を開始した患者の病態は 84.8%が結節気管支拡張型(NB)であった。男性 38.6%、女性 61.4%の割合で 65 歳～85 歳の高齢者に多い傾向にあり、TB 及び MAC 共に女性が優位であった。TB の感受性は小川比率法で実施されていたが、NTM は適用外であるにもかかわらず、同法で実施されていた。MAC に関して、中心的治療薬であるクラリスロマイシンは継時的な感受性試験が推奨されているため、標準法による感受性が必要である。当院は、塗抹または培養が陽性の時、遺伝子同定検査を依頼するため、塗抹陰性、培養陽性が 90 件あり、その内 TB が 8 件あった。外部委託は塗抹検査および遺伝子同定検査に 2～4 日を要している。結核を疑う患者に対して、院内検査で迅速な検査対応をすることで、他者への感染リスクを減らすことができ、早期診断・治療につながると思われる。 連絡先:0744-43-5001