

[症例報告]

基礎疾患のない患者から *Burkholderia pseudomallei* が分離された一例

伊藤志昂¹⁾・大塚昌信¹⁾・青木弘太郎²⁾・村上日奈子³⁾

畠山 薫⁴⁾・石井良和²⁾・館田一博²⁾・草地信也⁵⁾

¹⁾ 東邦大学医療センター大橋病院臨床検査部

²⁾ 東邦大学医学部微生物・感染症学講座

³⁾ 東邦大学医療センター大森病院臨床検査部

⁴⁾ 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

⁵⁾ 東邦大学医療センター大橋病院外科

(平成 27 年 3 月 5 日受付, 平成 27 年 5 月 19 日受理)

33 歳, 男性がマレーシアでラグビーの試合中, 左大腿部を擦過受傷した。帰国後, 皮疹が残存したため近隣のクリニックを受診し, 裂孔形成の可能性が指摘された。そのため外科的処置および感染症が疑われ, 当院皮膚科に紹介受診となった。患者はすぐにマレーシアに戻る予定があったため外科的処置は見送られた。提出された左大腿膿瘍の検体から分離されたグラム陰性桿菌は, 自動機器やコロニーの生化学的性状だけでは同定が困難であったため, 16S rDNA を対象とした解析を行った。その結果, 本菌株の rDNA の塩基配列は *Burkholderia mallei* あるいは *Burkholderia pseudomallei* のものと 99% 一致した。両菌は rDNA の塩基配列では区別出来ないため MacConkey 寒天培地での発育, 運動性(+), 42°C での発育の違いから *B. pseudomallei* と同定した。さらに multilocus sequence typing (MLST) により本菌株は, これまでに報告されていない新規 ST 型 (ST1057) の菌株であることが判明した。

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, 渡航歴, multilocus sequence typing (MLST)

序 文

類鼻疽 (メリオイドーシス) は *Burkholderia pseudomallei* が起因菌の人畜共通感染症である。起因菌である *B. pseudomallei* は, 主に東南アジア及びオーストラリア北部の土壌や水辺に生息している¹⁾。*B. pseudomallei* は様々な国々から報告されているが, 国内には生息していない。現在に至るまで, 86 菌株の *Burkholderia* 属が登録されている (<http://www.dsmz.de>, 最終アクセス日時: 2015.01.21 12:00)。そのうち *Burkholderia mallei*, *B. pseudomallei* は, 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律 (感染症法) に基づいてバイオセーフティレベル 3

(BSL3), 特定病原体第 3 種に指定されている。さらに, 本菌による感染症は 4 類感染症に指定されており, 菌種名が確定した際, 直ちに保健所への届け出が義務付けられている。

本菌は糖尿病や免疫不全など基礎疾患を有する患者からの分離例が多く, 時として重篤な疾患を引き起こすことが知られている。オーストラリア北部の一部地域では市中肺炎, 敗血症の一般的な起因菌としても知られている²⁾。敗血症を発症した場合の致命率は高く, 50-90% と報告されている³⁾。

国内では, その感染事例の報告は稀であり, 国立感染症研究所の発生動向調査年別報告数⁴⁾によると 1999 年から 2014 年 3 月まで本症例を除き 8 例の報告があるに過ぎない。今回我々は基礎疾患のない患者から分離された *B. pseudomallei* による感染症を経験したので報告する。

著者連絡先: (〒153-8515) 東京都目黒区大橋 2-17-6
東邦大学医療センター大橋病院臨床検査部
伊藤志昂
TEL: 03-3468-1251 (内線 3258)
FAX: 03-3468-1906

症 例

患者：33歳，マレーシア在住の日本人男性。

既往歴：特になし。

現病歴：左大腿部に線状の褐色隆起病変。

2012年12月に左大腿部後面をマレーシアでラグビーの試合中に擦過し，その後同部位に皮疹が出現し徐々に拡大した。現地の医療機関にて抗菌薬（処方抗菌薬：不明）を処方されるも改善せず，10×100mm大の肉芽様になり排膿が持続していた。帰国後，近医を受診し，皮疹が残存し，且つ裂孔形成の可能性があるため真菌症や他感染症を疑い，当院紹介受診された。当院受診の際は，左大腿部に線状の褐色隆起病変があり，一部裂孔や排膿が認められた。また慢性膿皮症及び肥厚性癬痕も認められた。手術を勧めたが，当該患者はすぐにマレーシアに戻る予定があったため外科的処置は見送られた。フジジンレオ軟膏[®]2% 10g，ヒルドイドソフト軟膏[®]0.3% 25g，roxithromycin (RXM) 150mg/day，リザベンCap[®] 100mg/dayなどの外用，内服薬で経過観察とし帰国後治療法再検討することとなったが，現在に至るまで再来院されていない。

微生物学的検査

1. 培養同定および生化学的同定法による同定

病変部から採取された創部検体は，ヒツジ血液寒天培地（日本製薬），チョコレートII寒天培地（日本BD），DHL寒天培地（極東製薬）および，スタヒロコッカスNo.110寒天培地（極東製薬）を用い35℃で好気培養を行った。24時間後，ヒツジ血液寒天培地，チョコレートII寒天培地及びDHL寒天培地にグラム陰性桿菌様のコロニーの発育を認めた。スタヒロコッカスNo.110寒天培地にはコロニーの発育を認めなかった。ヒツジ血液寒天培地に発育したコロニーに対しオキシダーゼ試験を実施したところ，陽性であった。

生化学的同定検査はMicroScan Walk Away 96SI（シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス）を使用しNegCombo 3.12Jパネル（シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス）およびAPI20NE（シスメックス・ビオメリユー）を用い菌種同定を行った。その結果MicroScan Walk Away 96SIにてBiotype：02000776 *B. pseudomallei* 81.84%，*Ochrobactrum anthropi* 18.16%と同定された。またAPI20NEを実施した結果，一部の反応が弱く48時間では判定するのが困難であった。そのため72時間まで培養を延長したところ，プロファイルNo.1156557 *B. pseudomallei*

87.5%と同定された。

これらの結果から血液寒天培地に発育したコロニーに対しフェイバーGセットFニッスイ（日本製薬）を用いグラム染色を行った結果，安全ピン様に両端が濃染された極染色性のグラム陰性桿菌が観察された（Fig. 1）。また鞭毛染色はKodakaらの方法⁵⁾に従い実施したところ極多毛性の鞭毛が確認された（Fig. 2）。

培養を継続したところ48時間後には正円状のムコイド型の集落を形成し3日後には表面中心部に皺のあるコロニーを形成，4日目以降は集落全てに対し，皺の形成を認めた（Fig. 3）。これらの性状から *B. pseudomallei* が強く疑われたためMacConkey寒天培地での発育，42℃での発育（+）を確認し，*B. pseudomallei* と確定した。

2. 薬剤感受性検査

薬剤感受性検査はClinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のM45-A2[®]に従い微量液体希釈法にてMICを測定した。MicroScan Walk Away 96SIにてNC 3.12Jパネルを用い piperacillin (PIPC)， piperacillin/tazobactam (TAZ/PIPC)， cefsulodin (CFS)， ceftazidime (CAZ)， cefepime (CFPM)， ceftazopran (CZOP)， sulbactam/cefoperazone (CPZ/SBT)， imipenem (IPM)， meropenem (MEPM)， gentamicin (GM)， amikacin (AMK)， tobramycin (TOB)， minocycline (MINO)， fosfomycin (FOM)， aztreonam (AZT)， levofloxacin (LVFX)， ciprofloxacin (CPF)， sulfamethoxazole-trimethoprim (ST) の計18種類を35℃好気下で20時間培養後，MIC値の判定を行った。分離菌株の薬剤感受性結果をTable 1に示す。ペニシリン系薬，第1，第2世代セファロsporin系薬，アミノグリコシド系薬，マクロライド系薬など多くの抗菌薬に耐性を示した。一方 *B. pseudomallei* の第一選択薬であるCAZ，IPM，MEPMには良好な感受性を示した。

分子生物学的検査

1. 16S rDNA 遺伝子配列決定

1) 核酸の調整

血液寒天培地で24時間培養した菌を，滅菌水100μlに懸濁した。95℃で10分間熱処理を行い，12,000rpmで1分間遠心し，上清を鋳型DNA溶液として使用した。

2) PCR反応

鋳型DNA溶液0.5μlとPCR反応液50μl（dNTP Mixture 12.5nmol，Taq DNA polymerase 2.5U，10×Bufferおよびprimer sets）を混和した。Primerは

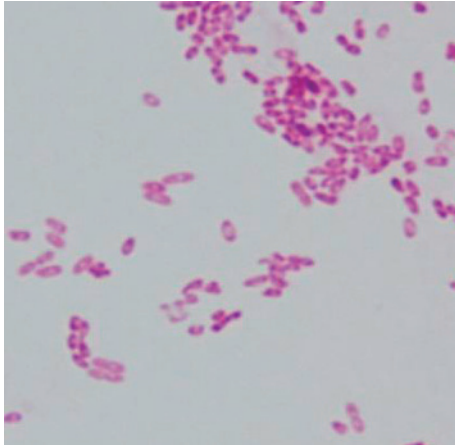


Fig. 1. Gram negative rod with safety pin appearance on Gram stain (magnification, $\times 1000$)

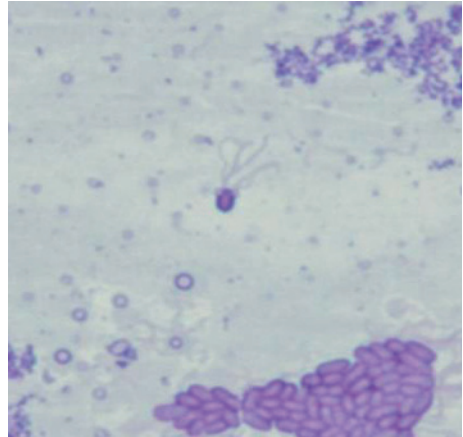


Fig. 2. Multi flagella appearance on Flagellar stain (magnification, $\times 1000$)

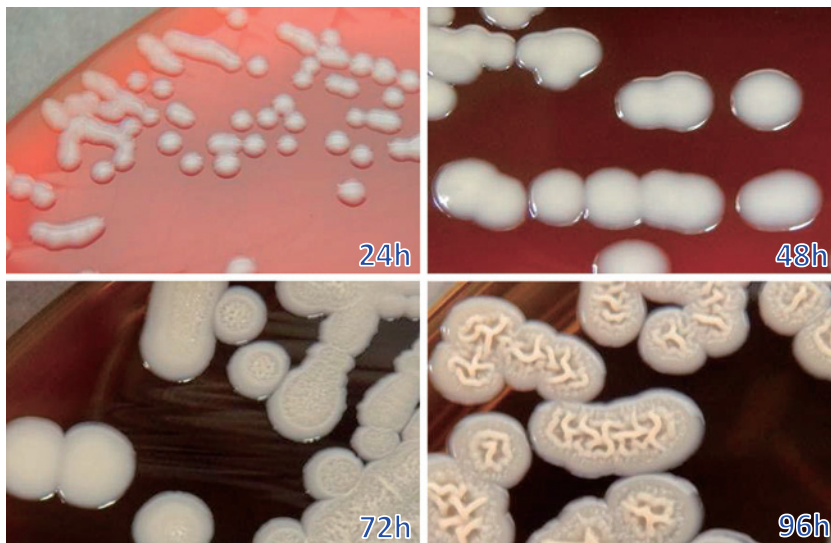


Fig. 3. Temporal change of colonies on Sheep blood agar

Dharakul らの報告に従い⁷⁾, Primer Outer U33 [5'-AAG-TCG-AAC-GGC-AGC-ACG-G-3'], OL731 [5'-TTT-GCT-CCC-CAC-GCT-TTC-G-3'] を用いた。94°C で5分間反応させたのち、95°C 1分、60°C 1分、72°C 1分を35サイクル、72°C 10分の条件でPCRを実施した。その後、2% アガロースゲル、1 kb DNA marker (Biolabs) を用いて電気泳動を行い、終了後、エチジウムプロマイド染色にて397 bp 付近の増幅産物を確認した。その後PCR産物の塩基配列を Big-

Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) を用いて決定した。その結果、本菌株のrDNAの塩基配列は *B. pseudomallei* または *B. mallei* と99%一致した。両菌はrDNAの塩基配列では区別出来ないため、MacConkey 寒天培地での発育、運動性 (+)、42°C での発育の性状及びコロニーに皺形成を認めたことから *B. pseudomallei* と確定した。

2. MLST (Multilocus Sequence Typing) 法による型別

PubMLST 掲載の方法に基づき, Qiagen Taq polymerase を用い 95°C で 4 分間反応させたのち, 95°C で

30 秒, 62°C で 30 秒, 72°C で 60 秒を 30 サイクル行った。さらに, 72°C 10 分の条件で PCR を実施した。*B. pseudomallei* の染色体上の 7 種類の house-keeping 遺伝子(*ace*, *glt*, *gmhD*, *lepA*, *lipA*, *narK*, *ndh*) の塩基配列を基に PubMLST で照合を行い, ST 型を決定した。

本菌株の allelic profile は 3-1-3-3-1-2-3 となり, MLST データベースに登録されていない新規 ST 型 (ST 1057) であることが判明した。

考 察

今回我々は 2 種類のキットを用いて同定を実施した結果, 8 割程度の確率で *B. pseudomallei* であることが示唆された。しかし, 両法の結果はいずれも同定確率が低い点や, 48 時間培養時点で *B. pseudomallei* のコロニーの特徴である皺形成が確認されなかったこと, 日本での分離例が稀であることなどから, 分離された菌株が *B. pseudomallei* であることを疑う事は困難であった。我々は, キットでの同定確率が低いものの, *B. pseudomallei* の菌名が挙がったことおよび渡航歴を基に検査を進めた。培養 72 時間後, コロニーの皺形成が認められたため, *B. pseudomallei* を強く疑い 16S rDNA の塩基配列から, 本菌株は, *B. mallei* または *B. pseudomallei* のものと 99% 一致した。両菌種は rDNA の塩基配列からは区別できないため,

Table 1. Antibiotic susceptibilities

Antimicrobial agent	MIC (µg/ml)	Result
Piperacillin	16	N/A
Tazobactam/Piperacillin	≤8	N/A
Cefsulodin	>16	N/A
Ceftazidime	4	S
Cefepime	>16	N/A
Cefozopran	>16	N/A
Sulbactam/Cefoperezone	≤16	N/A
Imipenem	≤1	S
Meropenem	≤1	N/A
Gentamycin	>8	N/A
Amikacin	>32	N/A
Tobramycin	>8	N/A
Minocycline	≤2	N/A
Fosfomycin	>16	N/A
Aztreonam	>16	N/A
Levofloxacin	2	N/A
Ciprofloxacin	2	N/A
Sulfamethoxazole/Trimethoprim	≤2	S

Table 2. Characteristics of Isolated strain, *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* and *B. cepacia*

Test	Isolate	<i>B. pseudomallei</i>	<i>B. mallei</i>	<i>B. thailandensis</i>	<i>B. cepacia</i>
Oxidase	+	+	v	+	+
Catalase	+	+	-	+	+
MacConkey	+	+	+	+	+
42°C	+	+	-	+	v
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	+
Citrate	+	+	-	v	+
Gelatin	+	v	-	v	v
Esculin	+	v	-	v	v
Glucose	+	+	+	+	+
Xylose	-	+	v	+	+
Lactose	+	+	v	+	+
Sucrose	+	v	-	v	v
Maltose	+	+	-	+	+
Mannitol	+	+	-	+	ND
Arabinose	-	-	ND	+	ND
Motility	+	+	-	+	+

ND: No data

Partial change of reference No. 8

MacConkey 寒天培地での発育、運動性 (+), 42°C での発育の性状から *B. pseudomallei* と確定した。さらに、流行地域の *B. pseudomallei* との関連性を調べるために MLST を実施した。その結果、本菌は新規 Sequence type である ST1057 であることが判明した。現在に至るまで、日本国内から報告された *B. pseudomallei* の ST は ST404, ST821 である。ST404 はタイから、ST821 は日本国内からそれぞれ分離されている。

本菌は、その同定上、鑑別しなければならない菌種として *B. mallei*, *Burkholderia thailandensis* があげられる (Table 2)。*B. mallei* は、国内からの報告はなく、72 時間後からコロニーの形成が認められ、1 週間程度で大きなコロニーとなる。42°C での発育はなく、*B. pseudomallei* のようにカビ臭や土壌臭のような臭気はないとされている⁸⁾。また *B. pseudomallei* は極多毛性の鞭毛を有するが *B. mallei* は鞭毛を有さない。*B. thailandensis* は *B. pseudomallei* と同じ発生地帯の土壌や環境から分離されるが、病原性は低いとされている⁹⁾。本菌の性状は *B. pseudomallei* と酷似しているが、アラビノース分解能の違いによって区別可能とされている¹⁰⁾。

B. pseudomallei は菌種によって糖分解能など異なる点があり、病院検査室レベルでは菌種推定が出来ても菌種同定まで至ることは困難である。最終同定は分子生物学的手法と生化学的手法を併用することによってなされる。オキシダーゼ検査と薬剤感受性パターンから、*B. pseudomallei* を推定することが可能である³⁾。すなわち、オキシダーゼ陽性で、GM 耐性、コリスチン耐性、アモキシシリン/クラバン酸に感受性を示す菌株は *B. pseudomallei* である可能性が高い。

メリオイドーシスの診断で標準的な方法は、培養であるとされ、主として血液寒天培地や MacConkey 寒天培地など日常検査で使用している培地での発育が良好である。敗血症における血液培養陽性までの時間は BacT/Alert (シスメックス・ビオメリユー) で 23.9 ± 14.9 時間 (95% 信頼区間: 20.4-27.5 時間) と報告されており、62% が 24 時間以内に、90% 以上が 48 時間以内に陽性になるとされている²⁾。

B. pseudomallei は敗血症に陥った場合の致命率が高いことや、使用抗菌薬に限られることから、最終同定結果が得られなくても、グラム染色性とコロニー形態、推定菌種、および薬剤感受性検査成績を臨床側に

迅速に報告することは、その治療、感染対策上重要であると思われた。

利益相反：申告すべき利益相反なし。

文 献

- 1) Limmathurotsakul, D., S. J. Peacock. 2011. Melioidosis: a clinical overview. *Br.Med.Bull.* 99: 125-139.
- 2) Cheng, A. C., B. J. Currie. 2005. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin.Microbiol.Rev.* 18: 383-416.
- 3) Lipsitz, R., S. Garges, R. Aurigemma, et al. 2012. Workshop on treatment of and postexposure prophylaxis for *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei* Infection, 2010. *Emerg.Infect.Dis.* 18: e2.
- 4) 国立感染症研究所 発生动向調査年別報告数一覧 <http://www.nih.go.jp/niid/ja/allarticles/surveillance/2085-idwr/ydata/4405-report-ja2012.html>.
- 5) Kodaka, H., A. Y. Armfield, G. L. Lombard, et al. 1982. Practical procedure for demonstrating bacterial flagella. *J.Clin.Microbiol.* 16: 948-952.
- 6) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline-second Edition. CLSI document M45-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- 7) Dharakul, T., S. Songsivilai, S. Viriyachitra, et al. 1996. Detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in patients with septicemic melioidosis. *J.Clin.Microbiol.* 34: 609-614.
- 8) LIPUMA, J.J., B.J. CURRIE, G.D. LUM. 2007. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralsonia*, *Cupriavidus*, *Pandora*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delftia*, and *Acidovorax*. p. 749-769. In: *Manual of Clinical Microbiology* 9th ed.
- 9) Brett, P. J., D. DeShazer, D. E. Woods. 1998. *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 48 (Pt 1): 317-320.
- 10) Glass, M. B., J. E. Gee, A. G. Steigerwalt, et al. 2006. Pneumonia and septicemia caused by *Burkholderia thailandensis* in the United States. *J.Clin.Microbiol.* 44: 4601-4604.

A case of isolated from no underlying disease of *Burkholderia pseudomallei* infection

Yukitaka Ito¹⁾, Masanobu Otsuka¹⁾, Koutaro Aoki²⁾, Hinako Murakami³⁾, Kaoru Hatakeyama⁴⁾,
Yoshikazu Ishii²⁾, Kazuhiro Tateda²⁾, Shinya Kusachi⁵⁾

¹⁾Department of Laboratory Medicine, Toho University Ohashi Medical Center

²⁾Department of Microbiology and Infectious Diseases, Toho University School of Medicine

³⁾Department of Laboratory Medicine, Toho University Omori Medical Center

⁴⁾Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

⁵⁾Department of Surgery, Toho University Ohashi Medical Center

A 33-years-old man was presented with the left femoral region in a game of the rugby match in Malaysia. After returning Japan, he consulted a local clinic but was referred to the dermatology department of our hospital for surgical treatment due to the possibility of hiatus formation and persistence of a rash, as well as the suspicion of infection. Since the patient was scheduled to return to Malaysia soon, surgical treatment was postponed. As the Gram-negative bacilli isolated from the sample of an abscess in the left femoral region were difficult to identify by automated analyses or on the basis of biochemical test of the colony. 16S rDNA sequencing analyses finally revealed as *B. mallei* or *B. pseudomallei*. The strain was identified as *B. pseudomallei* because of its growth in MacConkey ager, Mobility and growth difference at 42°C. Moreover, by multilocus sequence typing (MLST), this strain was found to be a previously unreported novel ST type strain (ST1057).