



# ONE POINT MEMO No.207

## 臨床検査ひとくちメモ

Q

### 最近のブドウ球菌の同定

外注先の血液培養で*Staphylococcus intermedius*が分離されました。誤同定の可能性が高いので、コアグラゼの有無を再確認したところ、この検査センターでは、「ブドウ球菌の同定にコアグラゼの検査をせず、PSラテックスを必要に応じて使用しており、本菌株では同定キットのみで同定した」と報告をうけました。

最近のブドウ球菌の同定では、コアグラゼは省略してもよいのでしょうか。

また細菌を同定する上で、どの性状をもって菌名を特定したらよいのでしょうか。

A

元栄研化学株式会社 主任研究員

池戸正成

### はじめに

分離菌株の同定試験は、分離、感受性試験とあわせて微生物検査室の基本的な業務である。

日常検査の中で分離菌株の同定をどこまで行うのか、またどの試験結果をもって同定するのかは、これまでしばしば取り上げられてきた問題である。市販の同定キットが汎用されることによりこうした問題も少なくなったが、今回の質問のように *Staphylococcus aureus* のコアグラゼや *Proteus* 属菌のフェニルアラニンデアミナーゼ、*Helicobacter pylori* のウレアーゼなど特異的な性状から同定する場合も少なくない。ここでは改めて細菌同定に用いる性状試験と *S. aureus* 鑑別のためのコアグラゼ試験について解説する。

### I. 細菌同定に用いる性状試験

同定とは「今までに名を付けられた菌種と同じであると判定すること」であり<sup>1)</sup>、一般に特徴付けできる性状検査により行われるが、どの性状を以て菌名を特定するというガイドラインは少ない。食品・医薬品の検査分野では ISO6888-1<sup>2)</sup>、日本薬局方<sup>3)</sup>、食品検査指針<sup>4)</sup>、FDA の BAM (Bacterial analytical manual)<sup>5)</sup> などに検査すべき性状が記載されている。臨床分野では 1998 年の感染症法の施行に伴い、法律に基づく感染症の報告には一定の基準が必要ということから、国立感染症研究所が病原体検査マニュアル<sup>6)</sup> を公開している。それには 63 の疾患あるいは起因微生物の検査法が掲載されている。そのうち細菌検査は 22 項目あり、培養可能な細菌の鑑別に用

いる性状検査項目が記載されている。このようないわゆる公定法に沿った同定が必要な場合はガイドラインの記載に従う必要があるが、一般の臨床検査室での同定試験はそのような規制はなく、市販の同定キットや施設で作成した同定法を用いるのが一般的である。同定キットは鑑別に有用な検査性状が組み合わせられ、体外診断用医薬品として承認を得ていることから信頼性が高く、ガイドラインの同定法より優れているものもある。また、より特異性が高い遺伝子による同定法が利用できる現状では、同定の基準となる検査性状を設定するのが現実的ではなくなっているようで、日本薬局方では第十五局第一追補から特定細菌同定の具体的な試験法は割愛されている。一方、同定キットは開発された当時からメーカー間で同定可能な菌種の数を競う傾向があり、その結果公表された新種が次々と製品に反映されてきた。こうした過度な対応は分類学と臨床細菌学の歩調がそろわず、見慣れない菌名が臨床現場を混乱させることもあった。Farmer IIIら<sup>7)</sup>はこうした傾向を踏まえて、一般的な病院での腸内細菌科の分離菌種は *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* の3菌種が80～95%を占め、すべての分離菌株の99%以上はわずか23菌種である、と分離頻度も考慮する必要性を述べている。同様に琉球大学山根誠久教授が本誌でその功罪を解説している<sup>8)</sup>。市販同定キットによらない場合、用いる性状検査項目は前述のガイドラインが参考になるが、米国で標準化の文書を発行している Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のガイドライン「Abbreviated identification of bacteria and yeast ; M35-A2 (細菌と酵母の簡略同定)」<sup>9)</sup> は、対象にした38の菌種や菌群の同定に必要な最低の性状が記載され、臨床検査室の報告には95%以上対応し、十分な信頼性を有しているとされている。このドキュメントは試験に要する時間と費用の効率を優先した性状を選んでいるため、記載されている性状が必ずしも微生物学的に特徴的な項目とはいえないが、同定する上でいわゆる「決め手」となる性状選択の一助になるであろう。

## Ⅱ. コアグララーゼ試験

微生物による血漿の凝固作用の記載は100年以上

前に見られ、1903年にLoeb<sup>10)</sup>が *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *Salmonella Typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *C. xerosis*, *Mycobacterium tuberculosis* (現菌名で表記) によるガチョウ血漿の凝固性を報告している。この報告では凝固作用が腹膜炎や胸膜炎の病原因子となる可能性について述べられているが、上記の菌種の中では、*S. aureus* が最もその作用が強く4～6時間で凝固反応が見られ、*P. aeruginosa*, *B. anthracis*, *E. coli* にも弱いながら陽性反応が見られている。この試験法は、磁器のプレート上、あるいは試験管内で血漿と菌体を混合して凝固反応を観察するいわゆる試験管法であり、*S. aureus* の反応の特異性は述べられているが鑑別性状としてのコアグララーゼ試験については言及していない。1908年にMuch<sup>11)</sup>が試験に用いる血液の動物種やクエン酸塩など抗凝固剤などの影響を報告しているが、そこではコアグララーゼ試験は *S. aureus* の鑑別法として位置づけられている。あわせて血漿中にコアグララーゼ陽性株を懸濁すると菌体が凝集する現象も記載している。この現象はその後 Candness-Gravesら<sup>12)</sup>により血漿凝固のコアグララーゼ試験結果と高い相関があることが確認され、短時間で結果が得られる方法(スライド法)として報告されている。一般にいわれるコアグララーゼ試験はこの試験管法あるいはスライド法で実施される。その後 Essersら<sup>13)</sup>はヒトの血漿を感作したラテックス凝集試験で clumping factor と protein A を同時検出することによる迅速な *S. aureus* の同定法を報告している。このラテックス凝集法は、簡便、短時間で結果が得られ、加えてコアグララーゼ試験との相関も極めて高いことから、コアグララーゼ試験に代わる試験法として汎用されるようになってきた<sup>4-6, 9, 14)</sup>。しかし MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*) の中には clumping factor や protein A の産生量や活性が低い株があるため、偽陰性となる場合があり<sup>15-17)</sup>、その対応として *S. aureus* に対する特異抗体を用いるなど試薬の改良がなされてきた<sup>18)</sup>。それでも市販の試薬によっては MSSA (methicillin-sensitive *S. aureus*) に比べ MRSA では従来のコアグララーゼ試験との相関が低くなる場合がある<sup>9, 14, 18, 19)</sup>。

### Ⅲ. *S. aureus* 同定にコアグラージェ試験は必要か

前項のように、コアグラージェ試験は1世紀以上前からブドウ球菌属の鑑別に用いられてきていることから、前述のガイドライン<sup>2-6)</sup>では、*S. aureus*を疑う集落についてコアグラージェ試験を行うよう記載されている。従ってそうしたいわゆる公定法に沿った衛生管理の実施には本試験は省略できない。臨床微生物の分野ではManual of clinical microbiology<sup>14)</sup>などの教科書的な書籍にも同様の掲載がみられ、前出のCLSI M35-A2<sup>9)</sup>の*S. aureus*の同定では血液寒天平板上のコロニー形状、グラム染色性とその形態に加えて、カタラーゼとコアグラージェが陽性と記載されている。また同CLSIの感受性試験のガイドライン<sup>20)</sup>には、*S. aureus*とcoagulase-negative staphylococciのようにコアグラージェの有無でカテゴリーが区別されているなど、*S. aureus*の同定には重要な性状である。一方、現在国内で入手できるグラム陽性球菌の同定キットでは、基本性状の中にコアグラージェ試験を用いているものはない。それは他の生化学的性状試験と反応時間や供試菌量が異なり、同じパネル内での試験の実施や機器による判定が困難なことがあげられる。特に検査センターのように多検体を取り扱う施設では、平板培地の集落を釣菌して菌懸濁液を調製することから同定・感受性試験を行う場合が多く、コアグラージェ試験やラテックス凝集試験が検査の一連の流れにのりにくいという点もあげられる。*S. aureus*の同定試験にコアグラージェ試験は必須とはいえないが、前述のようなブドウ球菌とコアグラージェ試験との関連から、同定キットのみで*S. aureus*と同定した菌株については、できる限りコアグラージェの確認をする配慮は必要ではないだろうか。

### おわりに

*S. aureus*はグラム陽性球菌の中でも最も分離頻度が高い菌種であり、最も一般的な感染症の起因菌のひとつである<sup>21-23)</sup>。今回の質問は、外注先の血液培養で*S. intermedius*が分離されたという結果が発端となっている。*S. intermedius*は獣医分野では一般的な感染症の起因菌であるが、ヒトから分離

されることは稀なことが知られている<sup>9, 13, 14, 21, 23)</sup>。Farmer IIIら<sup>7)</sup>は前出の論文で「When you hear hoofbeats, think horses, not zebras. (ひづめの音を聞いたら、シマウマでなくウマだと思え)」と述べているが、質問者はそうした現実に照らし合わせ、検査センターから返ってきた同定結果に疑問を持ったと思われる。臨床検査室や検査センターの細菌担当者は起因菌を同定しその結果を臨床に反映させるエキスパートであるべきで<sup>9)</sup>、同定キットの結果で稀な菌名を得たときにはそのまま依頼者に返すことは避け、再確認をするかその菌の特性、例えば「獣医分野では一般的な菌であるがヒトの起因菌としては稀である」などのコメントを付けるなどの配慮が必要と思われる<sup>7, 9)</sup>。

### 文 献

- 1) 藪内英子：ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌，医学書院，東京，1977。
- 2) International Organization for Standardization : ISO6888-1 : 1999 Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Technique using Baird-Parker agar medium, ISO, 1999.
- 3) 厚生労働省：第十五局改正日本薬局方(厚生労働省告示第285号)，2006。
- 4) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 微生物編，日本食品衛生協会，東京，2004。
- 5) Food and Drug Administration : Bacteriological Analytical Manual 8th ed. Rev. A, FDA, 1998.
- 6) 国立感染症研究所：病原体検査マニュアル，国立感染症研究所，1998。
- 7) Farmer III, J. J., R. Davis, F. W. Hickman-Brenner, A. McWhorter, G. P. Huntley-Carter, M. A. Asbury, C. Riddle, H. G. Wathen-Grady, C. Elias, and G. R. Fanning : Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens, *J. Clin. Microbiol.*, **21** : 46-76, 1985.
- 8) 山根誠久：医学検査の歩み-10 自動機器による腸内細菌科同定の今昔，*モダンメディア*，**54** : 125-129, 2008。
- 9) Clinical and Laboratory Standards Institute : Abbreviated identification of bacteria and yeast ; Approved guideline - 2nd ed., CLSI, Wayne, PA., 2008.
- 10) Loeb, L. : The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood, *J. Med. Res.*, **10** : 407-419, 1903.
- 11) Much, H. : Über eine Vorstufe des Fibrinferment in Kulturen von *Staphylokokkus aureus*, *Biochem.*, **Z 14** : 143-155, 1908.
- 12) Cadness-Graves, B., R. Williams, G. J. Harper, and A. A. Milies : Slide-test for coagulase-positive staphylococci,

- Lancet, **241** : 736-738, 1943.
- 13) Essers, L. and K. Radebold : Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* by a latex agglutination test, J. Clin. Microbiol., **12** : 641-643, 1980.
  - 14) Bannerman T. L. and S. J. Peacock : *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci, p.390-411, In Murray, P. R., E. J. Baron, M. L. Landry, J. H. Jorgensen, and M. A. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology 9th ed., American Society for Microbiology, Washington DC, 2007.
  - 15) Aldridge, K. E., C. Kogos, C. V. Sanders, and R. L. Marier : Comparison of rapid identification assays for *Staphylococcus aureus*, J. Clin. Microbiol., **19** : 703-704, 1984.
  - 16) Berke, A. and R. C. Tilton : Evaluation of rapid coagulase methods for the identification of *Staphylococcus aureus*, J. Clin. Microbiol., **23** : 916-919, 1986.
  - 17) Ruane, P. J., M. A. Morgan, D. M. Citron, and M. E. Mulligan : Failure of rapid agglutination methods to detect oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*, J. Clin. Microbiol., **24** : 490-492, 1986.
  - 18) Fournier, J. M., A. Bouvet, D. Mathieu, F. Nato, A. Boutonnier, R. Gerbal, P. Brunengo, C. Saulnier, N. Sagot, and B. Slizewicz : New latex reagent using monoclonal antibodies to capsular polysaccharide for reliable identification of both oxacillin-susceptible and oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*, J. Clin. Microbiol., **31** : 1342-1344, 1993.
  - 19) van Griethuysen, A., M. Bes, J. Etienne, R. Zbinden, and J. Kluytmans : International multicenter evaluation of latex agglutination tests for identification of *Staphylococcus aureus*, J. Clin. Microbiol., **39** : 86-89, 2001.
  - 20) Clinical and Laboratory Standards Institute : Performance standards for antimicrobial susceptibility testing ; 21st informational supplement M100-S21, CLSI, Wayne, PA., 2011.
  - 21) Mahoudeau, I., X. Delabranche, G. Prevost, H. Monteil, and Y. Piemont : Frequency of isolation of *Staphylococcus intermedius* from humans, J. Clin. Microbiol., **35** : 2153-2154, 1997.
  - 22) Archer, G. L. : *Staphylococcus aureus* : a well-armed pathogen, Clin. Infect. Dis., **26** : 1179-81, 1998.
  - 23) 河村好章 : 医学的に重要な細菌についての分類学 1 ブドウ球菌と連鎖球菌の分類・この10年間の変遷, モダンメディア, **51** : 313-327, 2005.