

[研 究]

入院時の患者鼻腔内*M.catarrhalis*の
保菌状況に関する一考察豊科赤十字病院 検査部¹⁾信州大学医学部 保健学科²⁾赤羽 貴行¹⁾ 保坂 力¹⁾ 村山 範行¹⁾小穴こず枝²⁾ 川上 由行²⁾

Key words : *M.catarrhalis* 保菌状況、赤血球凝集反応、
NHS bactericidal assay

【はじめに】

MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) による院内感染症は1980年代頃から医療の現場で問題となっており、今日でも主要な院内感染起因菌の1種である。このMRSAを標的にした様々な院内感染対策活動が医療の現場では行われており、当院においても一部の患者を除き、MRSA院内感染を把握・防止する目的で患者入院時に、鼻腔内MRSA保菌検査を実施し、MRSA院内感染対策の一助としている。

一方、*Moraxella catarrhalis* は眼科・耳鼻咽喉科領域のみならず、菌血症や化膿性髄膜炎の症例等から起因菌種として分離される^{1,2)}が、呼吸器感染症の起因菌種としての重要性が最も高い^{3,4)}ことが指摘されている。従って、喀痰からの*M.catarrhalis*の分離が最も一般的に施行されており、鼻腔からの検出状況を示す報告例はほとんどない。しかし、入院時MRSAの鼻腔検査時に*M.catarrhalis*が優位に分離される症例に遭遇することが稀ではなく、分離された*M.catarrhalis*の病原的意味づけには検査を実施・判定する立場として苦慮する事例が多々あった。

今回、当院において患者入院時の鼻腔内MRSA検査で*M.catarrhalis*が優位に検出された症例について、カルテから得られた患者情報、各種の臨床検査データ、胸部レントゲ

ン検査、患者ペア血清抗体価、検出された*M.catarrhalis*の赤血球凝集反応とnormal human serum(NHS)bactericidal assay等を解析すると同時に、当院の呼吸器科医師の助言を参考にして、分離された*M.catarrhalis*の病原性について総合的に評価した。

【材料及び方法】

1. 抽出対象患者データ

対象とした患者データは2002年4月から2003年2月の11ヶ月の期間に当院に入院した患者のうち、以下の①から③の全ての条件を満たした患者とした。①入院時鼻腔内MRSA保菌検査を実施し*M.catarrhalis*が優位に検出された(菌量2+以上)患者、②診療科が内科系(内科・呼吸器科・循環器科・神経内科)である患者、③入院時及び入院後(10-14日間)のペア血清が得られた患者。

なお、鼻腔培養において*M.catarrhalis*以外の肺炎起因菌が優位に検出された患者検体は除外した。また、対象期間中に鼻腔培養が実施された総検体数、その中での*M.catarrhalis*検出率(菌量2+以上)、及び鼻腔培養からの*M.catarrhalis*を含む検出分離菌も調査した。

(1) 鼻腔保菌検査方法

患者鼻腔内をCulture Swab Plus (日本

バクトン・ディッキンソン)で拭い、5%羊血液寒天培地(日本バクトン・ディッキンソン)の上部1/3に塗り広げ、白金耳で最上部から塗り広げ、35℃、5%炭酸ガス孵卵器で24-48時間培養した。

検出菌量は培地全面にコロニー形成した場合を3+、培地上の2/3にコロニーを形成したものを2+とし、これら(3+・2+)を検出菌量優位の基準とした。

(2) *M.catarrhalis* 同定試験

*M.catarrhalis*が疑われるコロニーに対して、DNase(栄研化学)・IDテストHN-20ラピッド(日水製薬)を用いて同定検査を実施した。さらにP/Cアーゼ(日水製薬)を用いてβラクタマーゼ(ペニシリナーゼ・セファロスפורナーゼ)の産生性を確認した。

2. 患者血清抗体価測定

細菌学実習提要⁵⁾に準じて行った。抗原液として、各患者(番号1-14)から検出された*M.catarrhalis*の菌株を使用し、生理食塩水による自発凝集性の無いことを確認した。患者血清は入院時と入院後(10-14日)のペア血清を用い、それぞれの血清濃度は10倍希釈から始まる2倍階段希釈(倍数希釈)の方法で最終希釈を20480倍(12系列)とした。マイクロプレートU型(NUNC)に、希釈された血清と抗原液をそれぞれ25μlずつ加え、よく振とうし37℃で2時間培養後判定した。また、凝集の弱い場合は冷蔵庫に1晩入れ、翌日判定した。

判定は血清の入っていないコントロールを対照にし、判定基準として3+(著名な凝集:管底に膜状にはりついている)、2+(かなりはっきりした凝集:管底に拡がって凝集)、1+(弱い凝集:抗原が広く薄く沈殿)、±(疑わしい凝集:沈殿物がわずかにあり、対照と比較して弱い凝集が見られる)、-(凝集していない)を採用した。判定倍率の決定は1+以上の凝集を示した抗体価とした。

3. *M.catarrhalis* 赤血球凝集試験

Soto-Hernandez, J.L.ら⁶⁾が行った方法を参考にした。まず、健常人・O型Rh+のヘパリン加血球を生理食塩水で3回洗浄し、3%(vol/vol)の濃度に調整した。スライドガラス上に調整した血球浮遊液を50μl滴下し、そこに5%羊血液寒天培地で16-20時間培養した菌を1白金耳とり、ゆっくりと混合した。凝集の判定基準は4+(30秒以内に眼に見える凝集塊を示すもの)、3+(30-60秒の間に眼に見える凝集塊を示すもの)、2+(1-3分の間に眼に見える凝集塊を示すもの)、1+(3-5分の間に眼に見える凝集塊を示すもの)、-(凝集していない)とした。

4. NHS bactericidal assay

Andreoni, J.ら⁷⁾の方法やSoto-Hernandez, J.L.ら⁶⁾の方法があるが、今回はSoto-Hernandez, J.L.ら⁶⁾の方法に準じて実施した。

(1) 健常人血清(NHS)の採取方法としては、一人の健康なボランティアから血液を採取し、30分室温放置(血液凝固を確認)し遠心分離器にて3000rpm、15分、4℃の条件で血清を分離した。

(2) 菌液の調整は、37℃、5%CO₂孵卵器にて5%羊血液寒天培地で16-18時間培養した菌株を1白金耳とり、Mueller Hinton Broth(Difco)100mlに加え、37℃孵卵器にて4時間振とう培養した。

(3) assayでは、滅菌試験管(12×75mm)に(1)と(2)で得られた血清と菌液を0.1mlずつ加え、37℃孵卵器にて振とうした。コロニーカウントは、混和直後(0分)、振とう後30分、60分、90分、120分に混和した液から0.25μl採取し、5%羊血液寒天培地にコンラージ棒で拡げ、24時間培養後に行った。

(4) 成績の評価法としては、混和直後のコロニーカウント数を100%とし、以後の30分から120分のコロニーカウントにて50%以下になったものをS(susceptible)、50%以下に

ならないものをR(Resistant)とした。なお、コントロールとして不活化血清 (water bathにて56℃、30分) を用いた。

5. 臨床所見とドクターコメント

対象患者のカルテを調査し肺炎に関する臨床所見をまとめ、さらに当院呼吸器科医師の協力を頂いて、専門医から見た対象患者の肺炎に関するコメントをしていただき患者毎にまとめた。

【結 果】

1. 対象患者及び菌株

抽出対象となった患者は全部で14名（平均年齢83歳、男女比1：1）となり、その一覧を表1に示した。入院時体温では最低で35.6度、最高で39.2度となり、38度以上は3例いた。M.catarrhalisのβラクタマーゼ産生性試験では番号2と11を除きペニシリナーゼ陽性となったが、セファロスポリナーゼは全ての株が陰性となった。

対象期間に実施された鼻腔検査総数は

表3 鼻腔培養からの検出分離菌一覧
(Total 304株、上位10菌種提示)

菌種名	分離数(株)
MRSA	112
M.catarrhalis	63
Pseudomonas aeruginosa	21
Streptococcus pneumoniae (PISP)	14
Streptococcus pneumoniae (PSSP)	14
Haemophilus influenzae	13
Serratia marcescens	11
Streptococcus group G	7
Proteus mirabilis	7
Enterobacter aerogenes	7

2282検体あり、そのうちM.catarrhalisが分離されたのは63検体となり、検出率は2.76%となった(表2)。同一対象期間の鼻腔培養からの検出分離菌においては、総数304株中、MRSAに次ぐ第2位の分離数となった(表3)。

2. 対象患者の臨床データ

検討対象患者(No.1-14)の臨床検査データを表4に示した。CRPでは患者No.12を除く患者No.1-14の全てが基準値を越える異常値を示し、そのうち4名(患者No.2,4,9,11)

表1 対象患者一覧及びM.catarrhalis検出菌量

番号	氏 名	年 齢	性 別	診療科	入院時体温(℃)	M.catarrhalis検出菌量	ペニシリナーゼ	セファロスポリナーゼ
1	M・I	70	男	内科	35.6	2+	+	-
2	I・T	85	男	内科	36.8	2+	-	-
3	K・I	89	女	呼吸器科	39.2	2+	+	-
4	T・K	74	男	循環器科	39.2	2+	+	-
5	H・T	86	女	内科	37.8	3+	+	-
6	K・Y	86	女	神経内科	36.5	2+	+	-
7	A・C	81	女	循環器科	37.0	2+	+	-
8	A・D	98	男	内科	36.9	3+	+	-
9	I・T	78	女	内科	37.9	3+	+	-
10	H・N	82	男	内科	38.3	2+	+	-
11	K・A	80	女	循環器科	36.9	2+	-	-
12	M・F	90	女	内科	36.4	3+	+	-
13	H・M	86	男	呼吸器科	37.4	3+	+	-
14	N・K	77	男	循環器科	37.7	3+	+	-

表2 鼻腔培養数とM.catarrhalis検出頻度

対象期間	鼻腔培養実施数	M.catarrhalis検出数	検出頻度
2002.4-2003.2	2282	63	2.76%

は、10mg/dl以上の高値を示した。白血球数では基準値（9000/ μ l）以上となった患者は6名おり、基準値（4500/ μ l）以下も1名いたが半数の7名は測定値が基準値以内となった。しかし、好中球比率を見ると検査を実施した12名中11名が基準値以上の異常値を示した。赤沈値は参考値として2時間まで測定したがほとんどが基準値を越える測定値を示した。

3. 菌株に対する血清抗体価成績

患者血清抗体価検査では、全ての患者で抗

体価の上昇（入院後の抗体価が入院時の4管差以上）を示すデータは確認できなかった。抗体価そのものも測定下限の $<\times 20$ を示したものが多かった（表5）。

4. 菌株に対する赤血球凝集試験成績

赤血球凝集試験では全14株中6株が陽性を示し、そのうち5株は3+以上の強い凝集を示した（表5）。

5. NHS bactericidal assay成績

コントロールとした不活化血清の成績は全

表4 臨床検査データ

番号	CRP(mg/dl)	WBC(μ /l)	好中球比率(%)	赤沈値1h(mm)	赤沈値2h(mm)
1	9.7	7800	—	46	72
2	11.4	11200	—	29	60
3	1.9	7000	87.7	56	93
4	18.5	7100	78	75	119
5	4.8	15400	84.6	10	24
6	5.9	9100	77	55	91
7	2.1	4500	75.6	90	124
8	5.6	8400	86.5	35	70
9	22.3	11300	80	25	51
10	3.1	15400	70	56	90
11	31.2	25500	92.7	49	83
12	0.2	2500	79	50	79
13	0.4	5600	79	39	75
14	3.7	8000	76.8	11	28

表5 患者血清抗体価・赤血球凝集試験・NHS bactericidal assayの各成績

番号	入院時血清	入院後血清	赤血球凝集試験	NHS bactericidal assay					
				判定	0分	30分	60分	90分	120分
1	<20	<20	1+	S	100%	0%	0%	0%	0%
2	80	80	4+	R	100%	100%	80%	200%	200%
3	320	320	4+	S	100%	0%	0%	0%	0%
4	20	20	4+	S	100%	0%	0%	0%	0%
5	<20	<20	—	S	100%	0%	0%	0%	0%
6	<20	<20	—	S	100%	0%	0%	0%	0%
7	<20	<20	—	S	100%	10%	10%	0%	10%
8	<20	<20	—	R	100%	100%	200%	200%	500%
9	<20	<20	—	S	100%	0%	0%	0%	0%
10	20	20	3+	R	100%	100%	200%	200%	200%
11	40	80	4+	R	100%	100%	100%	200%	200%
12	<20	<20	—	S	100%	10%	0%	0%	0%
13	80	40	—	S	100%	10%	0%	0%	0%
14	<20	<20	—	S	100%	0%	0%	0%	0%

での菌株においてRとなった。供試各菌株の成績は表5に示した。Rと判定された菌株では、試験開始直後のコントロール菌数100%に対して一旦50%以下になった後に、再び菌数を上昇させる等の曖昧な判定に直結するデータは皆無で、SとRが明確に区分された。供試14株中、Rに判定されたのは、患者No.2,8,10,11由来の4菌株であった。

6. その他の臨床所見及びドクターコメント

カルテから調査した対象患者の肺炎に関する臨床所見とドクターコメントを表6にまとめた。臨床所見と専門医からの意見を集約すると患者No.3,7,8,10の4名が、入院時に検出された*M.catarrhalis*による肺炎の可能性が強いと判断された。

【考 察】

今回、対象期間中に鼻腔培養を実施し、その中から*M.catarrhalis*が検出された患者数（菌株数）は63名（株）であり、診療科や患者

ペア血清の確保などの条件をクリアできたのは14名であった。つまり、何らかの疾患で入院を必要とする患者の鼻腔培養からの*M.catarrhalis*検出率としては2.76%となった。一方、Kawakami,Y.,et.al⁸⁾は健康人の学生や小児の上咽頭の*M.catarrhalis*検出率を調査し、検出率2.96%と報告している。宇野⁹⁾は明らかに上咽頭疾患が認められない高齢者の上咽頭細菌叢の調査から*M.catarrhalis*検出率が2.8%と報告している。今回の検出率はいずれの報告ともほぼ類似した結果となった。

患者の*M.catarrhalis*に対する免疫反応を見るために、細菌学実習提要に準じてチフス症などで使用される血清抗体価測定を行ったが期待した抗体価の上昇データは得られなかった。これはおそらく*M.catarrhalis*の場合、一般的な凝集反応では認識しにくい抗体のため、Linonenら¹⁰⁾やGoldblattら¹¹⁾が実施したELISA法により、極めて低いIgG抗体価(Takada,R.,et al¹²⁾)を測定しなければ評価をすることはできないと考えられた。よって、

表6 臨床所見とドクターコメント

患者番号	入院時症状・基礎疾患	胸部X線写真状況	抗生剤使用状況	ドクターコメント
1	呼吸困難	明かな陰影なし	MINO-4日間、AZM-4日間	慢性肺気腫の急性増悪、肺炎の可能性低い
2	農薬中毒・肺炎	左下部不明瞭形跡	AMPC/CVA-9日間	誤嚥性肺炎の可能性あり
3	咳・痰	中葉に陰影あり	AMPC/CVA-11日間	抗生剤投与後、胸部X線写真・臨床検査データの改善、 <i>M.catarrhalis</i> による肺炎の可能性あり
4	C型肝炎・糖尿病・非定型抗酸菌症	古い陰影有り	PAPM-11日間、AZM-4日間	元々肺に影有り、古い影のため <i>M.catarrhalis</i> による肺炎の可能性は低い
5	呼吸困難・誤嚥性肺炎	明かな陰影なし、気管支炎の影有り	CZOP-10日間	気管支炎の可能性あり
6	糖尿病悪化・意識障害・脳梗塞	明かな陰影なし、胸水貯留あり	なし	肺炎の可能性は低い
7	肺炎・心不全・呼吸困難・食欲低下	右肺に陰影有り	AMPC/CVA-7日間	抗生剤投与後、胸部X線写真・臨床検査データの改善、 <i>M.catarrhalis</i> による肺炎の可能性あり
8	貧血・肺炎・心不全・消化管出血	左中葉に湿潤影あり	AMPC/CVA-11日間	抗生剤投与後、胸部X線写真・臨床検査データの改善、 <i>M.catarrhalis</i> による肺炎の可能性あり
9	腹痛・急性胆嚢炎・出血性胃炎	実施せず	なし	外科に転科し、緊急手術、脾炎による炎症反応あり
10	呼吸困難・肺炎・うっ血性心不全	肺水腫の所見と肺炎の所見有り	GFLX-3日間	抗生剤投与後、胸部X線写真・臨床検査データの改善、 <i>M.catarrhalis</i> による肺炎の可能性あり
11	脱水・食欲不振・脳出血・痴呆	明かな陰影なし	CTM-7日間、LVFX-4日間	肺炎の可能性は低い
12	嘔吐・脳梗塞・意識障害	明かな陰影なし	LVFX-6日間	肺炎の可能性はなし、尿路感染症に抗生剤投与有り
13	呼吸困難・呼吸不全・肺炎・肺気腫	心不全の所見有り	AMPC/CVA-6日間	肺炎の可能性はなし、肺気腫の可能性有り
14	嘔吐・腹痛・急性胃腸炎	明かな陰影なし	LVFX-5日間	肺炎の可能性はなし、腹部CTで大腸にガス有り

一般的な市中病院の検査室におけるルーチン検査で活用可能な器具による血清抗体価の測定は容易には出来ないことになる。

カルテからの臨床所見、ドクターからのコメントで *M. catarrhalis* による肺炎を否定した中には、尿路感染症、腹痛、外科的疾患を呈する患者もいたが、肺炎に近い呼吸器疾患（肺気腫、誤嚥性肺炎、気管支炎）の患者も多く、患者の臨床所見を調査せずに、内科受診患者かつ呼吸器材料からの *M. catarrhalis* 検出ということのみで起因菌と安易に断定してはいけないと思われる。

患者の臨床検査データ、カルテからの臨床所見、ドクターからのコメントを総合的に考えると、患者No.3,7,8,10が *M. catarrhalis* による肺炎の可能性があったと思われる。これらは全て臨床検査データで著しくはないものの、明かな炎症所見が見られ、入院時の臨床所見（咳・痰・呼吸困難・発熱等）からも肺炎が強く疑われていた。血清抗体価では、供試菌株のいずれにも上昇は観察できなかったが患者No.3では入院時の抗体価が他の13人に比べ高い抗体価を示していたことは気になる。

一方、Soto-Hernandez, J.L. ら⁶⁾ は *M. catarrhalis* による肺炎例や気管支炎例や定着例に対して、赤血球凝集反応とNHS bactericidal assayを組み合わせた生物型別法の有用性を指摘している。今回、*M. catarrhalis* 肺炎の可能性があったとした4株では、そのうち2株が赤血球凝集反応で4+、3+となり、NHS bactericidal assayの成績でも2株がRと判定された（4株中1株は3+とR）。肺炎の可能性が低いと判定した10株では赤血球凝集反応陰性が6株、NHS bactericidal assayのSが8株となり、*M. catarrhalis* 肺炎可能性例よりもそれぞれの占める割合が高かった。病原性の確認できた菌株を対象にデータをさらに集積すれば、今回よりはっきりとした差が生じたかもしれ

ない。Soto-Hernandez, J.L. ら⁶⁾ が示している赤血球凝集反応やNHS bactericidal assayは、相互に独立した成績を与え、且つ安定した再現性のある検査法であることに加えて、特殊な設備がない一般的な検査室でも実施可能であるため、疫学的調査の面でも有用な方法であると思われる。

今回対象とした14株中、4株（28.6%）が *M. catarrhalis* 肺炎の可能性を有する症例と仮定するならば、*M. catarrhalis* が検出された63株では、18株が相当する。対象期間中の鼻腔培養実施2282検体の0.8%に *M. catarrhalis* 肺炎の可能性を有する症例が存在し、入院患者の約1%に該当する事になる。仮に、*M. catarrhalis* 肺炎患者の喀痰培養が未実施の場合や、入院後直ちに投薬が開始された場合の喀痰培養では、その時点での細菌検査による起因菌検出は難しくなるが、入院時の鼻腔培養で *M. catarrhalis* が優位に検出された場合では、その約1/3で起因菌の検出が可能であることにもなる。

また、今回調査対象とした中には肺炎症例は少なかったが、臨床所見・各種臨床検査にて推定した *M. catarrhalis* による肺炎例の型別法の1つとして、今回検討・実施した赤血球凝集反応やNHS bactericidal assayが、症例数を集積することによって、これらの性状を組み合わせた生物型別と病原性との間に何らかの関連性が見いだされれば、と考える。

【結 語】

入院時の鼻腔培養で *M. catarrhalis* が優位に検出された場合、臨床所見、各種臨床検査にて強く疑われる *M. catarrhalis* 肺炎例を中心に、赤血球凝集反応やNHS bactericidal assay等の試験を実施した。症例数の蓄積が必要であることは当然のことであるが、これらの試験が *M. catarrhalis* の生物型別法の試験項目として有用性を有するか

否かを評価する糸口に関する知見を得ることができた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、各患者の臨床所見のコメント及び胸部レントゲン読影をしていただきました豊科赤十字病院、山口伸二呼吸器科部長に深謝致します。

本論文の要旨は、第15回日本赤十字社医学検査学会（2005年9月・釧路市）にて発表した。

参 考 文 献

1. Kawakami,Y.,et al.:A case of acute catarrhal conjunctivitis due to *Branhamella catarrhalis*.Microbiol. Immunol.1983;27:641-643.
2. Kawakami,Y.,et al.:Restriction fragment length polymorphism(RFLP) of genomic DNA of *Moraxella(Branhamella) catarrhalis* isolates in a hospital.Microbiol. Immunol.1994;38:891-895.
3. 松本慶蔵：特集ブランハメラ・カタラーリス－総論－，化学療法の領域，1991;7:15-17.
4. 日本感染症学会／日本化学療法学会（編）：抗菌薬使用の手引き「3.呼吸器感染症」、協和企画;2001:56-75.
5. 東京大学医科学研究所友会：細菌学実習提要、丸善;1980:228-236.
6. Soto-Hernandez,J.L.,et al.:Phenotypic characteristics of *Branhamella catarrhalis* strains. J.Clin.Microbiol.1989;27:903-908.
7. Andreoni,J.,et al.:Vaccination and the role of capsular polysaccharide antibody in prevention of recurrent meningococcal disease in late complement component-deficient individuals. J. Infect. Dis. 1993;168:227-231.
8. Kawakami,Y.,et al.:Incidence of asaccharolytic *Neisseria* species in pharyngeal flora of healthy Japanese individuals.Med.Sci.Res.1989;17:853-854.
9. 宇野芳史：高齢者における上咽頭細菌叢の検討，感染症学雑誌，2002;76:89-95.
10. Linonen,M.,et al:Preliminary serologic evidence for a pathogenic role of *Branhamella catarrhalis*.J.Infect.Dis. 1981;144:570-574.
11. Goldblatt,D.,et al.: *Branhamella catarrhalis*:Antigenic determinants and the development of the IgG subclass response in childhood. J. Infect.Dis.1990;162:1128-1135.
12. Takada,R.,et al.Antibodies specific to outer membrane antigens of *Moraxella catarrhalis* in sera and middle ear effusions from children with otitis media with effusion. Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.1998;46:185-195.