

## 症 例

第 82 回日本感染症学会総会学術講演会座長推薦論文

リアルタイム PCR を用いた *Aeromonas hydrophila*  
壊死性軟部組織感染症の迅速診断

<sup>1)</sup> 島根県立中央病院救命救急科, <sup>2)</sup> 同 皮膚科, <sup>3)</sup> 島根県保健環境科学研究所  
 小早川義貴<sup>1)</sup> 泉 陽子<sup>1)</sup> 牛田 美鈴<sup>1)</sup> 新納 教男<sup>1)</sup>  
 越崎 雅行<sup>1)</sup> 山森 祐治<sup>1)</sup> 金子 栄<sup>2)</sup> 福島 博<sup>3)</sup>

(平成 20 年 12 月 3 日受付)

(平成 21 年 8 月 14 日受理)

Key words: soft tissue infection, rapid diagnosis, *Aeromonas hydrophila*

## 序 文

壊死性軟部組織感染症 necrotizing soft tissue infections は, さまざまな名称で呼ばれていた重症軟部組織感染症の総称である. 1970 年代の文献がすでに“用語および分類の混乱は医師を混乱させる”と指摘しているが, ガス壊疽 gas gangrene や壊死性筋膜炎 necrotizing fasciitis もこの範疇に含まれる. 発症初期は軽症と同様であり, また皮膚異常所見を示す範囲以上に壊死範囲が広範であることから治療の遅れにつながりやすい<sup>1)</sup>. 特に A 群  $\beta$  溶血連鎖球菌, *Vibrio vulnificus*, *Aeromonas* 属によるものは急激な経過をとり予後が極めて不良である<sup>2)</sup>. 今回, 我々は *Aeromonas hydrophila* による壊死性軟部組織感染症の死亡症例を経験した. 血液および大腿壊死組織からの分離菌株について real-time PCR を用いた迅速診断を行ったので報告する.

## 症 例

70 歳男性. 2007 年 8 月 18 日, 一過性意識障害の主訴で A 病院救急搬送となった. 数日前より左大腿部疼痛を自覚, 左大腿腫脹および水疱紫斑形成を認め, 左下肢壊死性軟部組織感染症および敗血症性ショックと診断され当院紹介となった. 8 月 19 日午前 2 時当院到着, 意識レベル Japan Coma Scale I, 血圧 106/52 mmHg (カテコラミン投与, 大量補液), 心拍数 115 回/分, 呼吸数 24 回/分, 腋窩温 36.1°C であった. 前胸部には受傷時期不明の剥離創を認めた. 左大腿は腫脹, 紫斑, 水疱形成を認めた (Fig. 1). 筋膜切開お

Fig. 1 Bullae, purpura, and swelling of the left femur before debridement.



Fig. 2 Intra-operative view showing necrotized soft tissue and swollen muscles.



別刷請求先: (〒693-8555) 島根県出雲市姫原 4 丁目 1 番地 1  
 島根県立中央病院救命救急科 小早川義貴

平成 21 年 11 月 20 日

Table 1 Primers for detecting *V.vulnificus* and *A.hydrophila*

Species	Target gene	GenBank accession no.	PCR primers' sequence (5'-3')	product size (bp)	Reference
<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>vvh</i>	M34670	L-vvh,TTCCAACCTTCAAACCGAACTATGA R-vvh,ATTCCAGTCGATGCGAATACGTTG	205	Panicker <i>et al.</i> (2004)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>ahh1</i>	CP000462	AHH1F,GCCGAGCGCCAGAAAGGTGAGTT AHH1R,GAGCGGCTGGATGCGGTTGT	130	Wang <i>et al.</i> (2003)
	AHCYTOEN	M84709	AHCF1,GAGAAGGTGACCACCAAGAACA AHCRI,AACTGACATCGGCCTTGAACCTC	232	Kingombe <i>et al.</i> (1999)
	<i>aerA</i>	M16495	AerolA,CCAAGGGTCTGTGGCGACA AerolB,TTTCACCGGTAACAGGATTG	209	Pollard <i>et al.</i> (1990)

よびデブリードマンを行ったところ大腿軟部組織に広範な壊死を認めた (Fig. 2)。血液および壊死組織は細菌培養に提出された。集中治療管理を行ったが、意識障害発症から23時間後に死亡した。患者死亡までに血液および局所の細菌培養結果は判明しなかった。原因菌同定のため、8月21日にreal-time PCRによる推定病原菌の病原遺伝子検査を行う計画とした。当初は *V. vulnificus* 感染症を対象としたが、検査日当日に *A. hydrophila* が培養同定されたため、*A. hydrophila* 病原遺伝子を対象に追加し、real-time PCRを行った。

生活歴：ペット飼育なし、海水曝露なし、A病院受診5日前にハマチ刺身の摂取歴あり。既往歴：アルコール性肝硬変（2年前より治療中断）、食道静脈瘤

材料と方法：細菌学的検査：8月19日、患者血液はレズンボトル（BACTEC 92F 好気用レズンボトルおよび93F 嫌気用；BC, New Jersey, USA）に採取され、全自動血液培養検査装置（BACTEC9240；BC, New Jersey, USA）により培養された。同日、緊急手術にて採取された壊死軟部組織を定法に従い培養し、血液寒天培地から純培養状に分離された菌をVITEK 2自動分析装置（bioMérieux, Marcy l'Etoile, France）により培養した。Real-time PCR検査：血液培養ボトルからInstaGene Whole Blood Kit（Bio-Rad, München, Germany）を用いてDNAを抽出した。すなわち、血液を含むレズンボトルから0.5mLの溶液を採取し lysis buffer 1mlを加え、12,000rpm、1分間の条件で遠心分離を2回行った。沈渣に対してInstaGene Matrix 200μlを加え、70℃8分間、95℃4分間処理した後、12,000rpm 1分間の条件で遠心し、上清を鋳型DNAとして用いた。壊死軟部組織からの分離菌株は、血液寒天培地上コロニーの一部を採取し蒸留水に溶解後、上記と同様の方法によりDNAを抽出した。原因菌が *A. hydrophila* と判明したため、*V. vulnificus* に関しては血液のみを検体とした。Real-time PCRはSYBR Premix EX Taq（タカラバイオ、滋賀、日本）およびLightCycler（Roche Diagnostics, Basel, Switzerland）を用いて装置付属の取り扱い方法に従い実施した。Real-time PCRに用いたプライマーの一覧をTable 1

に示す。*V. vulnificus* の検出には *V. vulnificus* に特異的な cytotoxin-hemolysin である Vvh を規定する *vvh* を標的としたプライマー<sup>3)</sup>を用いた。*A. hydrophila* の検出には *A. hydrophila* の溶血毒 AHH1 を規定する *ahh1* を標的とした AHH1 プライマー<sup>4)</sup>と溶血毒 aerolysin を規定する *aerA* を標的とした Aer1 プライマー<sup>5)</sup>、AHCYTOEN (*A. hydrophila* cytolytic enterotoxin) を規定する AHCYTOEN を標的とした AHC primer<sup>6)</sup>の3種類を用いた。陽性コントロールとして *V. vulnificus* SVV1526 と *A. hydrophila* ATCC7966 を用いた。PCR増幅産物の特異性は融解曲線分析を行い、陽性コントロールのT<sub>m</sub>値と比較し確認した。

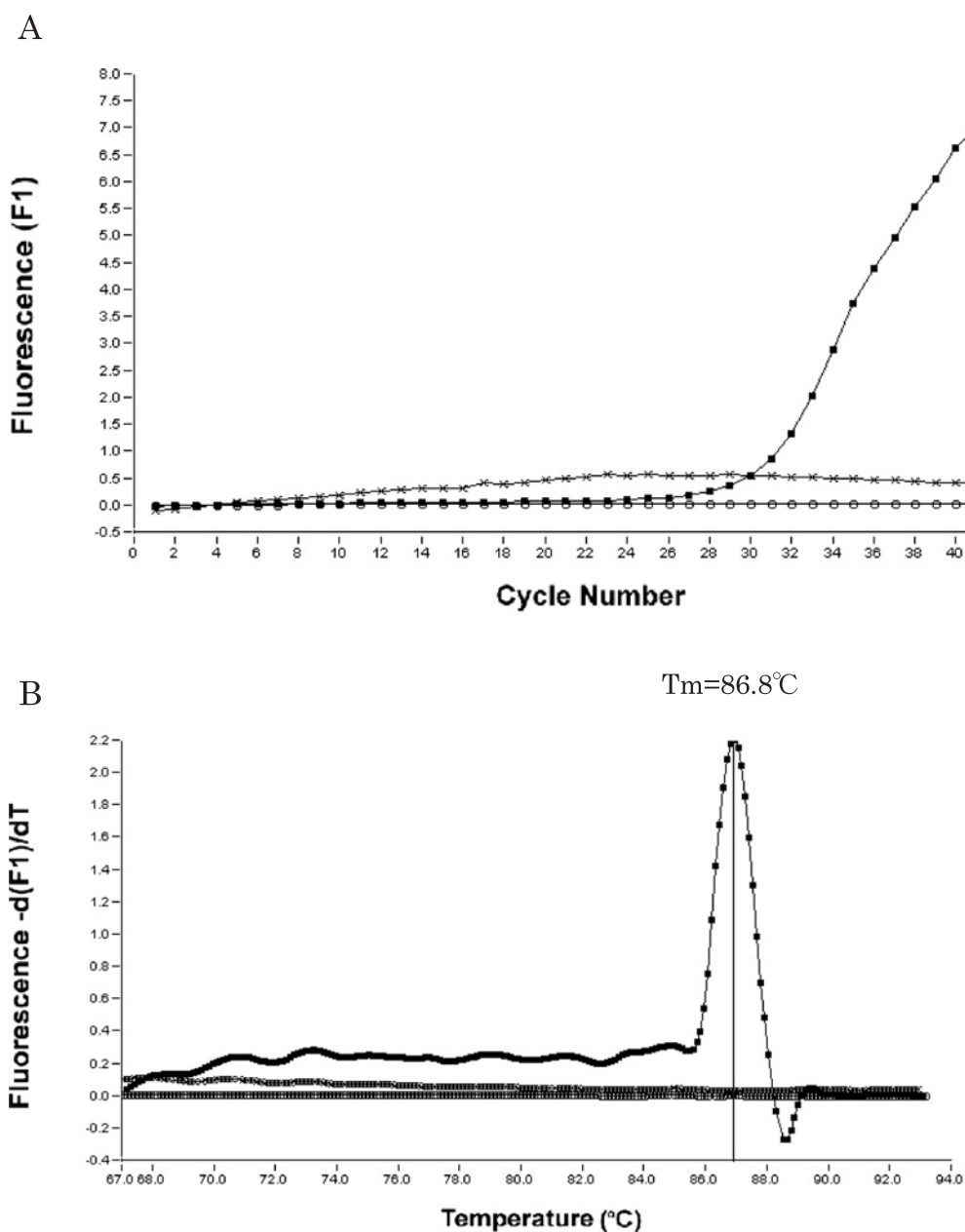
## 結 果

8月21日、自動血液培養システムにより *A. hydrophila* が同定された。Real-time PCR：*V. vulnificus* に関して、Fig. 3に示すように *vvh* は検出されなかった。*A. hydrophila* に関して、Fig. 4に示すように *ahh1* のみが検出された。DNA抽出からreal-time PCR終了に要した時間は約2時間であった。

## 考 察

*A. hydrophila* はグラム陰性無芽胞通性嫌気性桿菌であり、広く土壌、淡水、汽水域に生息する。1980年代に急性胃腸炎や下痢症などの腸管疾患の原因菌として認識され、定着因子や毒素が検討された。腸管外感染症の起炎菌としても重要であり、軟部組織感染、骨髓炎、髄膜炎、腹膜炎、敗血症などの報告がある。肝硬変や悪性疾患をもつ宿主に重症感染症を引き起こすことが多く、急速に進行する壊死性軟部組織感染症の場合、*Vibrio* 属との鑑別を要するとされる<sup>7)~10)</sup>。*V. vulnificus* 感染症は本邦にて1975年から2005年までに185例が報告され、中高年男性で肝機能障害を有するものに発症することが多く、肝機能障害を持つ症例の死亡率は69.3%（163例中113例）であった<sup>11)</sup>。*Aeromonas* 属による腸管外感染症は英国において15年間で59例<sup>12)</sup>、台湾では2年間で71例の報告<sup>8)</sup>がある。立山らの報告<sup>10)</sup>では、本邦において1973年から1999年までの26年間に75例の *Aeromonas* 属壊死性軟部組織感染症の報告があり、基礎疾患として白血病

Fig. 3 (A) Amplification of *vvh* in SYBR Green I real-time PCR assays and (B) melting curve analysis on amplification products of *Vibrio vulnificus* (SVV1526) and blood cultured in a culture bottle. ○ : negative control (water), ■ : positive control (*V. vulnificus* SVV1526), × : Blood

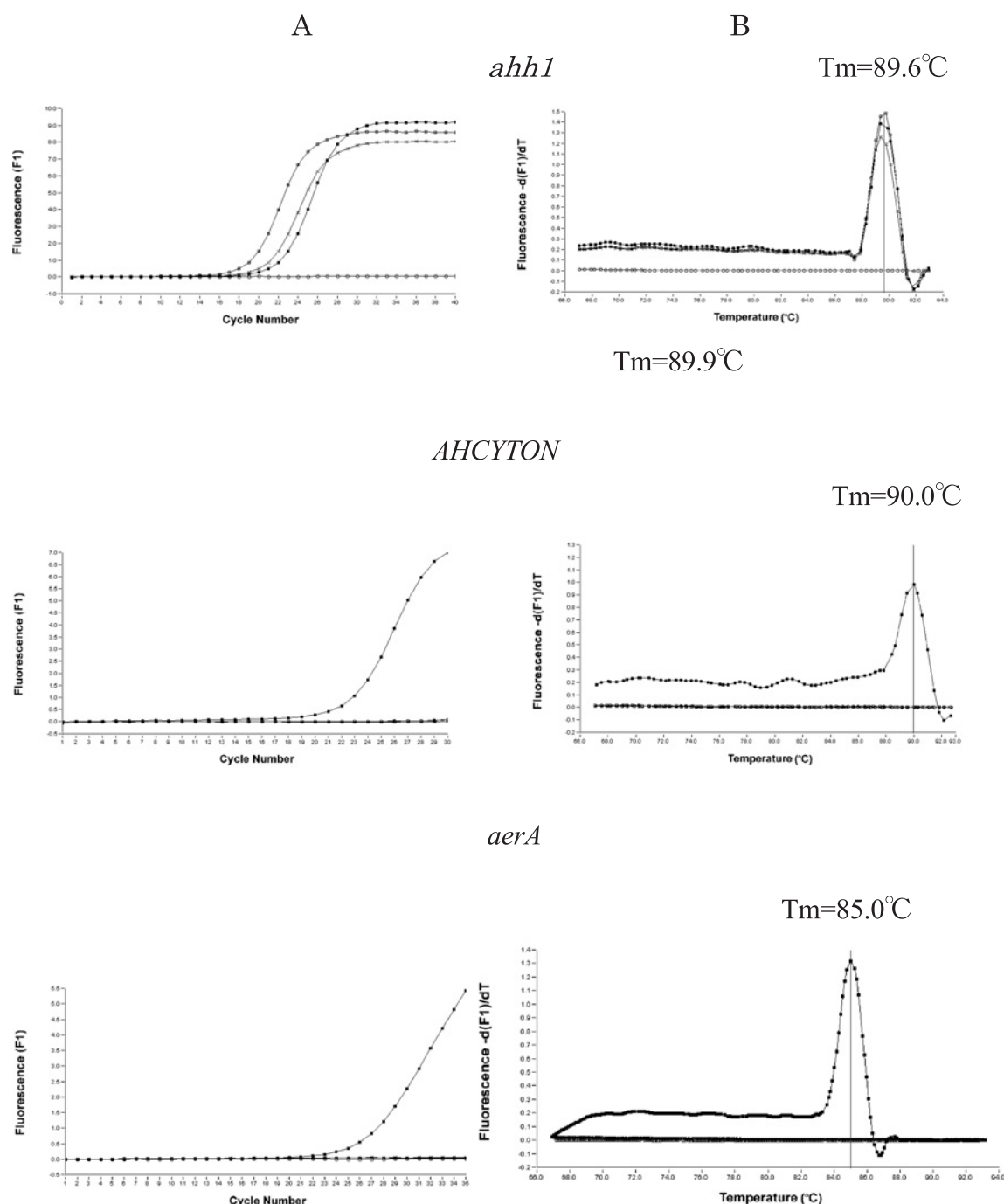


が31例(41%)、肝疾患が24例(32%)であった。肝硬変が基礎疾患にある経口感染症例15例の全例が死亡し、49例中36例(73%)が死亡した *V. vulnificus* 感染症と比べ有意に高い死亡率であったという。当院では2004年から2008年までの過去4年間に *Aeromonas* 属の検出は2例(本例含む)、*A. hydrophila* は本例のみで分離頻度は極めて低いが、壊死性軟部組織感染症の原因菌として *Aeromonas* 属はより致死的であり忘れてはならない。

*A. hydrophila* 検出のための適切なプライマーは明らかではないが、いくつかの病原遺伝子が候補となる。

aerolysin は *A. hydrophila* の産生する細胞外溶血毒であり *aerA* に規定される。同様に溶血毒である AHH1 は *ahh1* に規定され、aerolysin との相同性は約10%である<sup>4)5)9)</sup>。AHCYTOEN は細胞障害性エンテロトキシンであり、マウスに対して致死性、溶血、細胞障害性、腸管病原性などの作用をもった毒素で、*A. hydrophila* の病原性の一因をなすと考えられている<sup>6)</sup> *A. hydrophila* による腸管感染症と毒素遺伝子の関連についてはいくつかの検討がある。Wang *et al.*によれば、腸炎から分離された121株の *Aeromonas* 属のうち、87株が *A. hydrophila* であり、これらは全例 *ahh1* が陽性、

Fig. 4 (A) Amplification of *ahh1*, *AHCYTON* and *aerA* in SYBR Green I real-time PCR assays and (B) melting curve analysis on amplification products of *Aeromonas hydrophila* (ATCC7966), sample isolated from necrotized soft tissue and blood cultured in a culture bottle. ○ : negative control (water), ■ : positive control (*Aeromonas hydrophila* ATCC7966), □ : soft tissue, × : Blood



*aerA* は 48 名 (55%) で陽性であったと報告している<sup>4)</sup>。沖津らも下痢患者 348 名のうち 14 名から分離された *A. hydrophila* 7 株の検討で同様の結果を得ており、*ahh1* および *aerA* が全例で共に陽性であったと報告している<sup>13)</sup>。一方、*A. hydrophila* による腸管外感染についての検討は極めて少ない。Wu *et al.* は 35 株の腸管外感染由来 *A. hydrophila* 分離株を検討し、*ahh1* と同義である *hlyA* は 28 株 (80%)、*aerA* は 7 株 (49%)、

*AHCYTOEN* は 25 株 (72%) でそれぞれ陽性であったが、統計学的にこれらの遺伝子の有無と腸管外感染および菌血症の進展との間には関連がなかったと報告している<sup>8)</sup>。以上より、腸管外感染症である *A. hydrophila* 壊死性軟部組織感染症では *ahh1* が標的遺伝子として有用な可能性が高い。

本例の感染経路については経腸管的に侵入した *A. hydrophila* が血行性に大腿に到達した可能性が推測さ

れる。右前胸部の剥離創は、感染徴候なく意識消失時に受傷した可能性が高い。本例では *ahh1* 陽性であり、*aerA* および *AHCYTOEN* は陰性であったが、これらの遺伝子保有状況と発症部位および感染経路の関係は不明である。前出の Wu *et al.*<sup>8)</sup> が遺伝子保有の種類は腸管外感染症の発症に影響しないと報告しているように、遺伝子保有だけではなく、(1)毒素の相乗作用(例えば、*aerA* と *hlyA* の欠失実験では両遺伝子を欠いたときのみ毒性低下がみられる<sup>14)</sup>)、(2)侵入門戸の違い(皮膚局所からの侵入か、腸管からの侵入か)、(3)宿主の免疫状態、などが感染症発生部位に影響を及ぼすと考えられる。

集中治療分野では壊死性軟部組織感染症を含めた劇症型感染症に対峙することが多く、病原微生物の早期同定は適切な治療選択のため重要である。血液からのDNA抽出とreal-time PCR法による本法は2時間で終了し、*A. hydrophila* と *V. vulnificus* との鑑別が行え、集中治療分野において有用な迅速診断システムであると考えられた。

#### 文 献

- 1) Rosenberg PH, Shuck JM, Tempest BD, Reed WP : Diagnosis and therapy of necrotizing soft tissue infections of the perineum. *Ann Surg* 1978 ; 187 : 430—4.
- 2) 嶋津岳士, 鵜飼 勲, 角 由佳, 井上貴昭, 池側 均, 杉本 壽 : 壊死性軟部組織感染症. *外科治療* 2004 ; 91 : 707—19.
- 3) Panicker G, Myers ML, Bej AK : Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 2004 ; 70 : 498—507.
- 4) Wang G, Clark CG, Liu C, Pucknell C, Munro CK, Kruk TM, *et al.* : Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2003 ; 41 : 1048—54.
- 5) Pollard DR, Johnson WM, Lior H, Tyler SD, Rozee KR : Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990 ; 28 : 2477—81.
- 6) Kingombe CI, Huys G, Tonolla M, Albert MJ, Swings J, Peduzzi R, *et al.* : PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. *Appl Environ Microbiol* 1999 ; 65 : 5293—302.
- 7) James PS, Carlos DR : Chapter 234 Other Gram-Negative and Gram-Variable Bacilli, In Mandell, Douglas, and Bennett's PRINCIPLES and PRACTICE of INFECTIOUS DISEASES Sixth edition. Churchill Livingstone, Edinburgh, U.K., 2005 ; p. 2751—68.
- 8) Wu CJ, Wu JJ, Yan JJ, Lee HC, Lee NY, Chang CM, *et al.* : Clinical significance and distribution of putative virulence markers of 116 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in southern Taiwan. *J Infect* 2007 ; 54 : 151—8.
- 9) 山本耕一郎 : 46. エロモナス属菌, 細菌学. 朝倉書店, 東京, 2002 ; p. 424—8.
- 10) 立山 直, 緒方克己, 出盛允啓, 井上勝平, 桑田 剛, 成尾浩明, 他 : *Aeromonas* 壊死性軟部組織感染症—本症重篤化機序についての一考察—. *日皮会誌* 2000 ; 110 : 815—29.
- 11) 大石浩隆, 浦由紀子, 三溝慎次, 中島幹夫 : わが国における *Vibrio vulnificus* 感染症患者誌上調査. *感染症誌* 2006 ; 80 : 680—9.
- 12) Murphy OM, Gray J, Pedler SJ : Non-enteritic aeromonas infections in hospitalized patients. *J Hosp Infect* 1995 ; 31 : 55—60.
- 13) 沖津忠行, 鈴木理恵子, 佐多 辰, 島田俊雄, 山井志朗 : 散発下痢症における *Aeromonas* 分離状況および *Aeromonas hydrophila* 分離株の性状. *感染症誌* 2000 ; 74 : 155—61.
- 14) Wong CY, Heuzenroeder MW, Flower RL : Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. *Microbiology* 1998 ; 144 : 291—8.

Real-time PCR in Rapid Diagnosis of *Aeromonas hydrophila* Necrotizing Soft Tissue Infections

Yoshitaka KOHAYAGAWA<sup>1)</sup>, Yoko IZUMI<sup>1)</sup>, Misuzu USHITA<sup>1)</sup>, Norio NIINO<sup>1)</sup>, Masayuki KOSHIZAKI<sup>1)</sup>,  
Yuji YAMAMORI<sup>1)</sup>, Sakae KANEKO<sup>2)</sup> & Hiroshi FUKUSHIMA<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Emergency and Critical Care Medicine and <sup>2)</sup>Department of Dermatology,  
Shimane Prefectural Central Hospital, <sup>3)</sup>Shimane Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science

We report a case of rapidly progressive necrotizing soft tissue infection and sepsis followed by a patient's death. We suspected *Vibrio vulnificus* infection because the patient's underlying disease was cirrhosis and the course extremely rapid. No microbe had been detected at death. We extracted DNA from a blood culture bottle. SYBR green I real-time PCR was conducted but could not detect *V. vulnificus* *vvh* in the DNA sample. *Aeromonas hydrophila* was cultured and identified in blood and necrotized tissue samples. Real-time PCR was conducted to detect *A. hydrophila* *ahh1*, *AHCYTOEN* and *aerA* in the DNA sample extracted from the blood culture bottle and an isolated necrotized tissue strain, but only *ahh1* was positive. High-mortality in necrotizing soft tissue infections makes it is crucial to quickly detect *V. vulnificus* and *A. hydrophila*. We found real-time PCR for *vvh*, *ahh1*, *AHCYTOEN*, and *aerA* useful in detecting *V. vulnificus* and *A. hydrophila* in necrotizing soft tissue infections.

[J.J.A. Inf. D. 83 : 673~678, 2009]