病原体検出マニュアル

類鼻疽
（メリオイドーシス）

平成 23 年 8 月

目次

１．　類鼻疽/Melioidosis

２．　検査に関する注意事項
　１）　検体（臨床検体と臨床分離株）の取り扱い
　２）　検体の輸送方法

３．　検査方法
　１）病原体の分離法
　２）生化学的性状試験

４．　参考情報
　１）　届出基準
　２）　遺伝子検出法について

５．　文献

６．　執筆者

７．　連絡先

1.類鼻疽/Melioidosis[1)-3)]

類鼻疽はグラム陰性ブドウ糖非発酵短桿菌、類鼻疽菌（*Burkholderia pseudomallei*）が感染することによって起きる感染症である。*B. pseudomallei* は感染症法で特定病原体第三種に指定されている BSL3 の細菌である。このため、適切な設備を有し、承認を得た機関でしか取り扱うことができない。また、本菌は生物兵器としての使用が懸念される菌種でもあり、CDC category B に指定されている。

類鼻疽に特徴的な症状はなく、急性症状を呈することも慢性症状を呈することもある。肺炎や関節、軟組織、内臓に膿瘍を形成するが、症状が急速に進行し、敗血症に至った場合には発症から数日で死亡することもある。また、菌を完全に排除することが難しく、難治性で再発率も高い。

感染から発病までの期間は一定しておらず、数日から二十数年の幅がある。患者側の要因としては、基礎疾患として糖尿病、過度の飲酒歴、慢性腎疾患などがあげられる。

B. pseudomallei は東南アジアやオーストラリアの北緯 20 度から南緯 20 度の間の土壌中や水中に存在する。近年、北緯 20 度を超える台湾南部においても台風の後に類鼻疽の流行が報告されている [4)]。これらの地域では雨期やモンスーン、台風の時期、農耕期に流行が起きる。前述のように *B. pseudomallei* は環境中に存在することから、主な感染経路は *B. pseudomallei* に汚染された土壌、粉塵、水等の吸引や、これらによる創面の汚染である。*B. pseudomallei* はヒト以外の生物にも感染する。感染した動物からヒトへの感染、ヒトからヒトへの感染はごくまれである。

これまでに日本では、戦後約 10 例の感染報告がなされている。いずれも流行地域への渡航歴があり、現地で感染したと考えられる輸入症例である。また、これらの症例では糖尿病の基礎疾患を持つ患者が多い。日本国内では *B. pseudomallei* は環境中に存在しないとされている。このため、類鼻疽疑い患者に対しては流行地域への渡航歴を確認することが重要である。

2．検査に関する注意事項

１）臨床検体および臨床分離株の取り扱い

類鼻疽が疑われる患者臨床検体は、血液、膿、呼吸器分泌物など様々である。検体は防護手袋、マスクなどの保護器具を使用して取り扱い、作業は BSL2 実験室内の安全キャビネットで行う。

B. pseudomallei は特定病原体第三種であるため、*B. pseudomallei* であると同定されたのちは 7 日以内に届出が必要である。また、認可された施設を持たない臨床検査室などでは検査終了時まで一時的に菌株を保管することができるが、厳重に密閉した上で施錠できる場所に保管する。その際には-80℃に保管することが望ましい。また、滅菌処理を行う場合には届出日より 10 日以内に行う。類鼻疽の届出基準は４．参考情報に記載してあるので参照のこと。

２）検体の輸送

類鼻疽が疑われる臨床検体は、WHO の「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス」に基づき、国連規格の容器を用いて適切な方法で梱包する。検体はドライアイス詰めで輸送することが望ましい。感染性物質であることを明示し、ゆうパックにて輸送する。*B. pseudomallei* と疑われる臨床分離株は菌を接種した寒天培地を上記と同様に適切に梱包し常温にて輸送する。

分離された菌株が *B. pseudomallei* であると同定された場合には、この方法で輸送することができない。感染症法に基づき特定病原体第三種の輸送規定に従って、都道府県公安委員会に届出を行い運搬証明書の交付を受けた上で輸送を行う。（参考;感染症法に基づく特定病原体等の管理規制について URL; http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou17/03.html）

２．検査方法

１）分離培養

B. pseudomallei 同定のゴールドスタンダードは培養法である。

B. pseudomallei は鞭毛（極鞭毛）を持つグラム陰性ブドウ糖非発酵短桿菌である。培養初期では、グラム染色で両端が濃染、48 時間以上の培養で菌体が楕円形状に丸みを帯び、いわゆる「安全ピン」のように見える（図 1）。

本菌は、血液寒天培地、チョコレート寒天培地、EMB 培地、MacConkey 培地等の臨床材料に使用する培地に発育するが、SS 寒天培地には発育しない。

本菌の分離は好気培養条件下で、発育至適温度は 35～37℃、42℃でも発育可能であるが、4℃では発育できない。37℃、24 時間培養でスムーズ型のコロニーを形成するが、その後培養を続けるとムコイド状集落となり、さらに培養を続けると一週間程度で縮んだ皺のある集落へと変わる。一方で皺のないなめらかなコロニーを形成する株もあるため、注意が必要である（図 2）[5]。培養を続けたコロニーは独特の臭気（かび臭、土壌臭）を放つようになる。

B. pseudomallei は上記にあげたさまざまな培地に発育可能であるが、喀痰等の呼吸器検体、他の菌の汚染を考慮すべき検体には、*B. pseudomallei* の選択培地として Ashdown's agar、BPSA（*B. pseudomallei* selective agar）、BCA（*B. cepcia* agar）、ゲンタマイシン 5mg/L 添加 MacConkey 寒天培地が用いられている。また、*B. pseudomallei* の選択増菌培地として SB broth が報告されているが、BCA 以外は市販の培地がないため以下に示した[5]。

① Ashdown's Agar[6]

トリプチケースソイブロス（Difco）	10g
寒天（栄研）	15g
グリセロール	40ml
0.1%クリスタルバイオレット	5ml
1%ニュートラルレッド	5ml
精製水	1,000ml

121℃、15 分滅菌

添加剤*:ゲンタマイシン　5mg/L

② *Burkholderia pseudomallei* selective agar (BPSA)[7]

標準寒天培地（BBL）	23.5g
マルトース	4g
ニュートラルレッド	100mg

精製水	1,000ml

121℃、15 分滅菌

添加剤*:ゲンタマイシン　20mg/L
2%ナイルブルー**　1ml
グリセロール　10ml

③ Selective broth (SB)[8)]

トリプチケースソイブロス（Difco）	10g
グリセロール	40ml
0.1%クリスタルバイオレッド	5ml

121℃、15 分滅菌

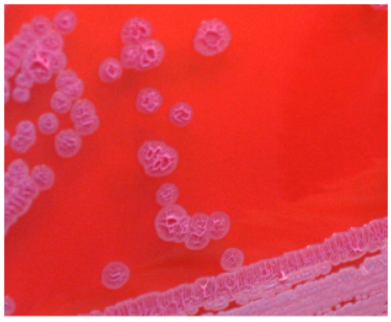
添加剤*:コリシン　15,000U/L

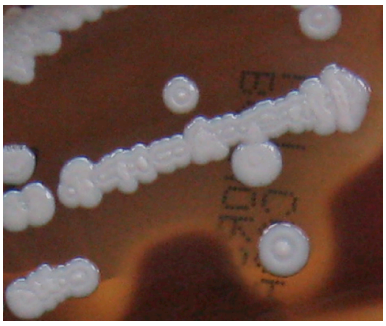
＊0.2μm メンブレンで濾過滅菌をする
＊＊1%DMSO で溶解

図 1　*B. pseudomallei* グラム染色像

特徴的な双極性（安全ピン様）のグラム染色像（平塚共済病院提供）

図 2　*B. pseudomallei* のコロニー像





左図；皺状のコロニー（BPSA 選択培地上）、右図；なめらかなコロニー（羊血

液寒天培地上）

２）生化学的性状

B. pseudomallei は　オキシダーゼ、カタラーゼ陽性、ブドウ糖をはじめとした多くの糖から酸を産生（OF テスト O）、硝酸塩から窒素ガスを産生する。

B. pseudomallei、*B. mallei* および *B. thailandensis* の生化学的性状を表１に示した。

B. thailandensis は人および動物へ感染等を起こす菌ではないが、類鼻疽発生地域の土壌、環境材料から分離されることが多く *B. pseudomallei* との鑑別が必要な菌である。また、*B. pseudomallei* と *B. mallei* は遺伝学的に 99.9%の相同性があるが、前者は通常 24 時間培養で発育するのに対し、*B. mallei* は培養に 72 時間必要であり、それ以外には 42℃における発育、運動性でわけることができる。

また、日常の臨床分離菌では、*B. cepacia* との鑑別が必要である。*B. cepacia* はアルギニンジヒトラーゼ陰性、リジンデカルボキシラーゼ陽性、アラビノース分解能陽性により鑑別することができる。

同定は、市販のグラム陰性非発酵菌用の細菌同定キット（API 20NE（ｼﾒｯｸｽ・ﾋﾞｵﾒﾘｭｰ）[9-11] 等を用いて行うことが可能である。しかし、製品のプロファイルインデックスにコード No.が掲載されていない製品もあるため、使用する際には注意が必要である。参考に API 20NE の主なプロファイル No.を表２に示した。

表１　*B. pseudomallei*、*B. mallei* および *B. thailandensis* の生化学的性状

テスト	*B. pseudomallei*	*B. mallei*	*B. thailandensis*
オキシダーゼ	＋	v	＋
発育：MacConkey	＋	v	＋
42℃	＋	－	＋
硝酸塩還元	＋	＋	＋
硝酸塩からのガス産生	＋	＋	－
ｱﾙｷﾞﾆﾝ　ｼﾞﾋﾄﾞﾛﾅｰｾﾞ	＋	＋	＋
ﾘｼﾞﾝﾃﾞｶﾙﾎﾞｷｼﾗｰｾﾞ	－	－	－
ｵﾙﾆﾁﾝﾃﾞｶﾙﾎﾞｷｼﾗｰｾﾞ	－	－	－
加水分解：ウレア	v	v	v
クエン酸塩	v	－	v
ゼラチン	v	－	v
エスクリン	v	－	v
酸産生：グルコース	＋	＋	＋

キシロース	＋	v	＋
ラクトース	＋	v	＋
シュークロース	v	－	v
マルトース	＋	－	＋
マンニトール	＋	－	＋
アラビノース	－	ND	＋
運動性	＋	－	＋

＋：＞90%陽性、－：90%陰性、ｖ：不定、D:データー無

表２　API 20NE プロファイル No.

プロファイル No.（i.d. 90%以上）
1156557
1156574
1156575
1156576
1156577
1556535
1556557
1556574
1556576
1556577

参考情報
１）　届出基準

３９　類鼻疽

（１）　定義
類鼻疽菌（*Burkholderia pseudomallei*）による感染症である。

（２）　臨床的特徴
主な感染経路は土壌や地上水との接触感染であるが、粉塵の吸入や飲水などによることもある。潜伏期間は通常 3～21 日であるが、年余にわたることもあ る。皮膚病変としてはリンパ節炎をともなう小結節を形成し、発熱を伴うこともある。呼吸器系病変としては気管支炎、肺炎を発症するが、通常は高熱を伴い、 胸痛を生じ、乾性咳嗽、あるいは正常喀痰の湿性咳嗽がみられる。HIV 感染症、腎不全、糖尿病などの基礎疾患を有する場合には、敗血症性ショックを生じる ことがある。慢性感染では関節、肺、腹部臓器、リンパ節、骨などに膿瘍を形成する。

（３）　届出基準
ア　患者（確定例）
医師は、（２）の臨床的特徴を有する者を診察した結果、症状や所見から類鼻疽が疑われ、かつ、次の表の左欄に掲げる検査方法により、類鼻疽患者と診断した場合には、法第１２条第１項の規定による届出を直ちに行わなければならない。
この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。
イ　無症状病原体保有者
医師は、診察した者が（２）の臨床的特徴を呈していないが、次の表の左欄に掲げる検査方法により、類鼻疽の無症状病原体保有者と診断した場合には、法第１２条第１項の規定による届出を直ちに行わなければならない。
この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。
ウ　感染症死亡者の死体
医師は、（２）の臨床的特徴を有する死体を検案した結果、症状や所見から、類鼻疽が疑われ、かつ、次の表の左欄に掲げる検査方法に

より、類鼻疽により死亡したと判断した場合には、法第１２条第１項の規定による届出を直ちに行わなければならない。

この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。

エ　感染症死亡疑い者の死体

医師は、（２）の臨床的特徴を有する死体を検案した結果、症状や所見から、類鼻疽により死亡したと疑われる場合には、法第１２条第１項の規定による届出を直ちに行わなければならない。

検査方法	検査材料
分離・同定による病原体の検出	喀痰・咽頭拭い液・膿・皮膚病変組織・血液
PCR 法による病原体の遺伝子の検出	

２）遺伝子検出法について

B. pseudomallei の遺伝子検出法では PCR 法[12)]、LAMP 法[13)]、Real-time PCR[14)] 法等の報告がなされているが、定法として用いられているものはない。

現在、国立感染症研究所細菌第二部では同定時に LAMP 法を補助的に用いている。

また、シークエンシング法についても、*B. pseudomallei* を含む *Burkholderia* 属は遺伝子の相同性が非常に高いため、この方法のみで *B. pseudomallei* と同定するのは難しい。

遺伝子検出法を試みる際に陽性対照として用いる DNA が必要な場合、国立感染症研究所・細菌第二部より分与可能。7. 連絡先を参照。

５．参考文献

1) Manual of clinical Microbiology1 9th edition 749-

2) Cheng A. C. :Melioidosis: Epidemiology, Pathophysiology, and Management, Clin. Microb. Rev., Vol18, No. 2, Apr. 383-416, 2005

3) White NJ, Melioidosis. Lancet, 361:1715-22, 2003

4) Ko WC, Melioidosis outbreak after typhoon, southern Taiwan, Emerg. Infec. Diseas.

Vol13, No6, June, 896-898, 2007
5) Chantratita N.: Biological Relevance of Colony Morphology and Phenotypic Switching by Burkholderia pseudomallei, J. Clin. Microb. Vol.189, No.3, Feb, 807-817, 2007
6) Ashdown L.R 1979. An improved screening technique for melioidosis.Med J.Aust.147:364-365
7) Howard K.2003. Novel selective medium for isolation of *Burkholderia pseudomallei*.J.cClin. Microbiol.41:3312-3316
8) WuthiekanunV.1990. The use of selective media for the isolation of *Pseudomonas Pseudomallei* in clinical partice.J.Med.Microbiol.33:121-126
9) Dance D.A.,1989. Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practice:use of simple screening tests and API20NE.J.Clin.Pathol.42:645-648
10) Mindy B.G.,2005. Prelimiary Evalution of the API 20NE and RapidID NF Plus System for rapid idenfication of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*.J.Clin Microbaiol.43:478-483
11) Premjit A.,2007. Accurancy of *Burkholderia pseudomallei* identification using API 20NE system and Latex agglutination test. J.clin.Microb., .Vol.45:3774-3776
12) Haase A., Evaluation of PCR for Diagnosis of Melioidosis. J. Clin. Microb., Vol.36, No.4, 1039-1041, 1998
13) Chantratita N.: Loop-Mediated Isothermal Amplification Method Targeting the TTS1 GENE Cluster for Detection of Burkholderia pseudomallei and Diagnosis of Melioidosis, J. Clin. Microb., Vol.46, No.2, Feb., p568-573, 2008
14) Novak RT, Development and Evaluation of a Real-Time PCR Assay Targeting the Type III Secretion System of *Burkholderia pseudomallei,* J. Clin. Microb., Vol.44, No.1, 85-90, 2006

６．執筆者

東京都健康安全研究センター・微生物部病原細菌研究科
　畠山　薫

国立感染症研究所・細菌第二部
　堀野敦子

７．連絡先

　国立感染症研究所

細菌第二部
堀野敦子
〒208-0011
東京都武蔵村山市学園 4−7−1
042（561）0771
E-mail; horino@nih.go.jp