

ホルマリン固定について

順天堂大学医学部附属浦安病院
病理診断科 中村 博

固定とは

- ・可能な限り速やかに組織片の自家融解を停止
- ・顕微鏡標本作製過程における薬品、熱などの影響による組織片の変質、変形をできるだけ少なくすること

組織や細胞は生体から取り出された時から組織内酵素により経時的に、組織成分である蛋白質の分解や、微生物による腐敗が起こり形態的に変化していく。固定とは可能な限り速やかに組織片の自家融解を停止させ、顕微鏡標本作製過程における薬品および熱などの影響による組織片の変質、変形をできるだけ少なくすることと定義づけられている。

ホルマリンの歴史

ホルムアルデヒドの発見
1859年 Butlerovが発見
↓
1868年 Van Hoffman
メチルアルデヒドの名で初めて記載

ホルマリンの歴史は1859年Butlerov氏により発見されたことに始まり、1868年Van Hoffman氏によってメタノールからの合成法が確立され現在に至っている。この時の合成方法は、空気とメチルアルコール蒸気を熱したコイルの上を通すことによってホルムアルデヒドを生成していた。

1886年にレーブ氏が新しい装置とポンプ、銅線網を使用したことにより、更に濃度の高いものを得ることに成功し、その後1888年には生物学の分野では病原微生物の殺菌、増殖抑制への使用に応用されていった。

ホルマリンの歴史

生物学への応用
・1888年 (LOEW, O)
緑膿菌が12時間以内に死滅し、カビ類についての実験でも死滅しないはその増殖が抑制されることを発見したのが生物学領域に応用された最初である。

固定液の歴史

1780年頃: アルコール固定の発明(フェリックス・ヴィック・ダジール)
1840年: クロム酸固定(Hannover)
1859年: ミュラー液固定法(Müller)
1865年: 四酸化オスミウム固定(Schulze)
1894年: ツェンカー固定(Zenker, K)



Ferdinand Blum (70yers old)

ホルマリンが固定液として使用されるまでの固定液の歴史は、アルコールによる固定が主流で、その後、クロム酸、ミュラー液、四酸化オスミウムといった固定液が開発されていった。

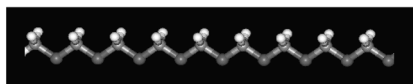
写真はホルマリン固定に関する文献でよく目にするBlum氏で、1865年10月3日生まれのフランクフルト出身、ミュンヘン、ハイデルブルクのキール大学に通い、フライブルク医学部を卒業し、精神病院や婦人科クリニックなどのいくつかの病院で働いたという経歴がある。

1893年Blum氏は、炭疽菌、腸チフス、ブドウ球菌などに対するホルマリンの殺菌作用を研究していた。そしてホルマリンによって自分の指の表皮が硬化することに気付き、さらに切開した炭疽菌感染マウスをホルマリン溶液中に入れたところ短時間でアルコールを使用した時と同様の結果を得ることを確認した。そこでホルマリン10倍希釈液(10%ホルマリン溶液)に組織片(肝、腎、胃粘膜、脳など)を入れたところアルコールで処理した臓器よりも速やかに硬化し、組織の縮みも少なく、染色性も保たれることを観察した。その後Weigert氏が、脳や脊髄についてBlum氏の研究を援助していったことが文献に残されている。1894年にはHofer, B氏、Reimer, M氏、Leber, Th氏も組織学へのホルマリンの使用について論文を発表していた。

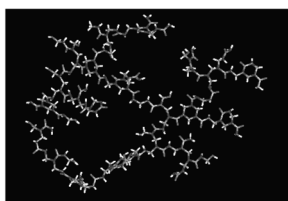
ホルマリン液の特性

ホルムアルデヒド(HCHO)は無色のガスで、非常に水に溶けやすく、ホルムアルデヒドが水に溶解したのがいわゆる“ホルマリン”で通常有効成分のホルムアルデヒド濃度が37%である。

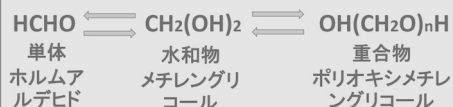
パラホルムアルデヒド



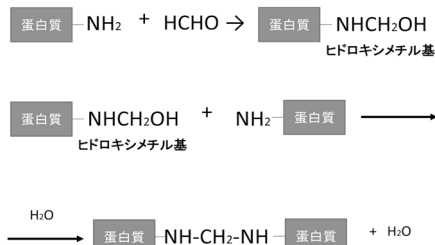
尿素樹脂



水溶液中のホルムアルデヒド



ホルマリンと蛋白質の可逆反応



＜ホルマリンの特性＞

ホルムアルデヒド(HCHO)は無色のガスで、非常に水に溶けやすく、ホルムアルデヒドが水に溶解したのがいわゆる“ホルマリン”で通常有効成分のホルムアルデヒド濃度が37%である。ホルムアルデヒドはそれ自身でつながりあう性質があり、長く鎖状になったものがパラホルムアルデヒドである。ホルムアルデヒドはそれ自身だけではなく、いろいろな分子をつないで“橋かけ”をする性質があり、例えば尿素と混ぜると両者の水分子が外れる形で互いに結合し、巨大なランダムネットワークが形成され、これが尿素樹脂と呼ばれる接着剤となる。ホルムアルデヒドは他にもフェノールやメラミンといった比較的外れやすい水素原子を持つ化合物と、自由自在に縮合し、多くの種類のプラスチックを作り上げる極めて重要な工業原料であり、国内生産高は120万トンにも昇っている。

【ホルマリンと蛋白質との可逆反応】

生体組織は約70%の水と約15%の蛋白質から構成されるが、ホルマリン固定では主に蛋白質が反応の対象となる。水溶液中のホルムアルデヒドはメチレングリコールと微量のホルムアルデヒドの形で存在している。ホルムアルデヒドが蛋白質中のアミノ基と反応しヒドロキシメチル基が生じ、反応生成物のヒドロキシメチル基がさらにアミノ基と反応し、メチレンブリッジが形成されて蛋白質が安定化する。これが一般的なホルマリンの固定原理とされている。だが、このように形成されたメチレンブリッジは不安定で、固定後の標本作製過程(特に水洗)で加水分解され、元のアミノ基に戻ることが多い。

	ホルムアルデヒド	メチレングリコール
5%ホルムアルデヒド	0.002%	82.20%
10%ホルムアルデヒド	0.005%	54.80%

気温30℃

ポリオキシメチレングリコール

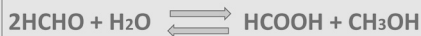
市販ホルマリンを長期間放置しておいた時に生じる沈殿物。
メチレングリコールから生成された重合体で、存在率はホルムアルデヒド濃度の上昇に伴って増加する。

メタノールの添加

ホルムアルデヒドの水溶液にメタノールを添加すると重合体の沈殿をかなり抑制することは古くから知られている。

蟻酸の生成

ホルマリンは貯蔵中に蟻酸を生成し酸性を呈する。



光により促進されるので貯蔵中は光を遮断しておく。

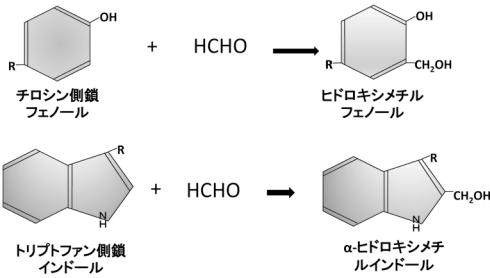
この他にホルマリンは水酸基やチオール基にも反応しメチレンブリッジを形成するが、組織蛋白中には水酸基やチオール基が少ないため、固定においては通常アミノ基が反応の対象となる。

ポリオキシメチレングリコールは市販ホルマリンを長期間放置しておいた時に生じる沈殿物である。メチレングリコールから生成された重合体で、存在率はホルムアルデヒド濃度の上昇に伴って増加していく。

ホルマリン水溶液中にメタノールを添加して沈殿を防ぐことは、ホルムアルデヒドが発見されてから間もなく行われている。メタノールが作用することで、ヘミアセタールが形成され重合を防ぐことができる。通常ホルマリンに添加されているメタノールは8-10%程度であるが、低温化で輸送、貯蔵される場合は12%程度の添加が必要とされている。

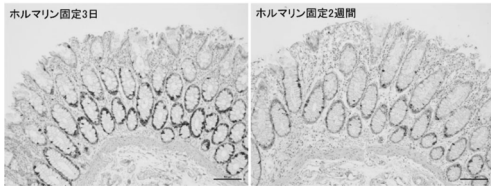
ホルマリンは貯蔵中に蟻酸を生成し酸性を呈する。このように2分子のホルムアルデヒドから1分子の蟻酸と1分子のメタノールが形成させる、いわゆるカニッツアロ反応（不同化反応）と呼ばれるもので光によって促進されるので貯蔵中は光を遮断することが推奨される。

ホルマリンと蛋白質の不可逆反応



固定時間の影響

過固定のimmunoreactivityに対する影響



同一症例における抗Ki-67抗体 (MIB-1)を用いた免疫組織化学

日本病理学会 ゲノム研究用病理組織検体取り扱い規程HPより抜粋

ホルマリン溶液pH

↓
pH4

↓
(+CH₂OH)

↓
組織タンパク質への反応 大

【ホルマリンと蛋白質との不可逆反応】

組織をホルマリンで長期間固定するとフェノールやトリプトファン側鎖のインドールなどの芳香環や複素環炭素とホルムアルデヒドとの反応が進行し、ホルムアルデヒドと蛋白質がより強く安定な共有結合で結合する。この反応は水洗等を行っても元には戻らなくなるため、長期間ホルマリン固定した組織は色素が染まりにくくなる。

ホルマリン固定における影響因子は固定する時間、温度、組織の大きさ、使用するホルマリン濃度、pH、緩衝液など様々な要因が関与している。

〈時間〉 現在推奨されている固定時間は最大72時間までとされている。これ以上固定すると免疫組織化学染色や遺伝子レベルでの検索に影響を及ぼすことが確認されている。

〈温度〉 通常ホルマリン固定を行う際は室温で行われる。ホルマリン固定は化学反応によるところが大きいので温度が高いと反応は早く進み、過固定の要因となりえる。遺伝子学的検査検索を行う上で固定温度は42℃が上限とされている。また、温度が低い場合は化学反応が低下し、固定不十分な結果となるためホルマリン固定を行う条件としては適切ではない。

〈固定する組織の大きさ〉 ホルマリンが組織へ浸透する速度は条件により変化するが、1時間で約1mmとされている。これはあくまでもホルマリンが組織中へ浸透する目安で、メチレン架橋が形成されているかどうかは現在でも不明である。このため容量の大きい臓器や実質臓器などは可能な限り固定前に割入れを行う必要がある。

〈ホルマリン濃度〉 ホルマリンは濃度が高いほど固定力が強く短時間で固定を行うことができる。しかし高濃度のホルマリンは組織収縮が強く、しかも過固定につながっていく。

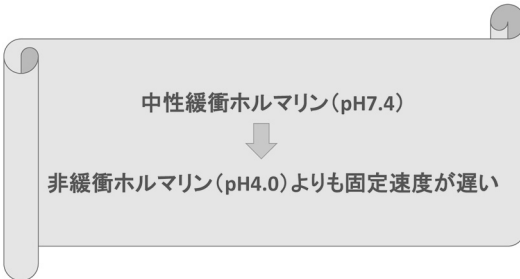
〈ホルマリン溶液pH〉 通常ホルマリンpHは蟻酸が含まれるためpH4付近となっている。このpH付近ではホルマリンの有効成分であるホルムアルデヒドのタンパク質への反応性が最も強くなる。この理由としてホルムアルデヒドは水溶液中では大部分がその水和物であるメチレングリコールとして存在するが、弱酸性付近でホルムアルデヒドの反応性

成分であるカルボニウムイオンが生じやすいため、電子の豊富な蛋白質アミノ基の窒素への攻撃・反応が強くなり組織蛋白質の固定もより強くなる。そのためpH4付近の弱酸性領域においてホルマリンの固定速度が最大となる。非緩衝ホルマリンではこのような理由から過固定の要因となりうる。

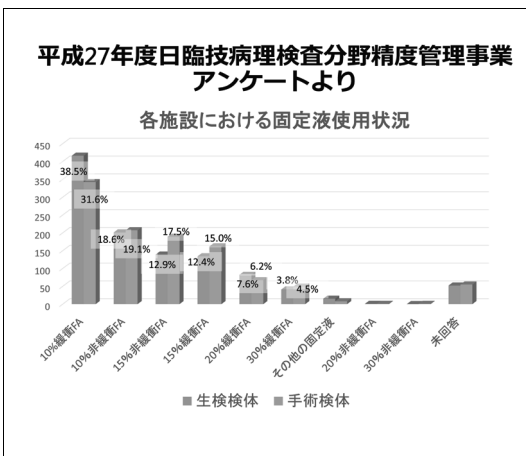
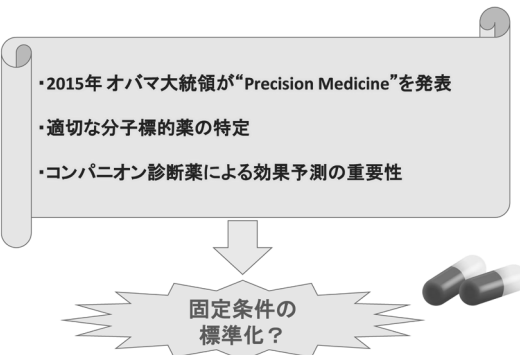
〈緩衝液〉緩衝液とは外部から酸や塩基が加わってもあまり影響を受けず、水素イオン濃度が変化しにくい溶液と定義づけられている。緩衝液が固定に与える影響は、ホルマリン濃度が一定であれば固定力は中性緩衝ホルマリンよりもホルマリン単独使用の方が高いとされている。その理由として、一つは緩衝液のイオンがホルムアルデヒドの組織蛋白質への親和と競合するため。もう一つは酸性域よりも中性域においてホルムアルデヒドの固定速度が減少するといったことによる。このため緩衝液の適切なmol濃度での使用が推奨される。

このようなホルマリンの特性を理解した上で、なぜ標準化をしなければいけないのか、どのようにすれば標準化を行うことができるかについて考える必要がある。2001年にトラスツズマブが、2002年にゲフィチニブが登場して以来、分子標的薬が飛躍的に使用され、さらに2015年にはオバマ大統領が“Precision Medicine”を発表し、以前にも増して、分子標的薬のバイオマーカーの重要性は増している。このような背景から固定に関しては推奨される固定液と固定時間、これによる施設間でのデータ乖離を低減することが求められているため固定条件の標準化は必須となっている。

標準化については、固定の領域だけでも臓器を摘出してから固定するまでの時間、固定液の濃度、固定時間などがある。摘出から固定までの時間については、直ちに固定の行えない施設にあっても、摘出臓器は冷蔵庫(4℃)に保管し、3時間以内に固定を行うことが望ましい。摘出臓器を30分以上室温で保管することは極力回避することとされている。固定液の濃度は10%の中性緩衝ホルマリンが推奨されているが、全国的に見ても約40% (H27年日臨技データより)と意外に低い普及率である。この理由の一つとして考えられるのが、緩衝液濃度が明確にされていないというのがある。特に大きい材料な



固定を取り巻く環境変化



標準化に向けて

- 固定までの時間は3時間以内
- 10%中性緩衝ホルマリンを遵守
- 固定時間は72時間以内

どを固定する際、コスト軽減のため自家製のホルマリン固定液を使用する施設は少なくない。緩衝作用の高い高濃度の緩衝液を用いることでホルマリン濃度が同一でも固定力が減衰することは先に述べた。緩衝液のmol濃度も標準化することによって10%のホルマリンでも十分に固定効果を発揮することが可能となる。

固定時間の管理は連休中や週末に提出される検体に対してどのように対処していくかが課題とされている。現時点での対応策として休日に切り出しを行いパラフィン包埋まで処理を行う、ホルマリン容器ごと冷蔵庫に入れるといった対処や、手術日を変更してもらい検体提出が週末に掛からないようにするなどが挙げられる。

固定の標準化を行うには病理医、検査技師、臨床医が一丸となって向き合っていくことが大切である。固定に関わる医師や病理検査技師に対し、どのような理由から、このような処理を行わなければならないとすることを広めていくことが病理認定技師の役割であると理解して頂きたい。

災害派遣を通して学んだコミュニケーションの大切さ

医療法人鉄蕉会 亀田総合病院
臨床検査室 太田 麻衣子

1. はじめに

コミュニケーションとは、「通信」「交流」「意志疎通」などに訳されるが、「コミュニケーション」という言葉を検索すると、インターネット上では以下のような内容が記載されている。

「人間の間で行われる知覚・感情・思考の伝達。情報の伝達だけが起きれば十分に成立したとは見なされず、人間と人間の間での《意志の疎通》《心や気持ちの通い合い》《互いに理解し合う》ことが起きて、はじめてコミュニケーションが成立したといえる」

コミュニケーションとは、ただの情報伝達ではなく、人と人の関わり合いの中で生まれるものである。ということについては多くの人が言われるまでもなく理解していることかもしれない。

今回は、災害医療に関わる中で学んだコミュニケーションの大切さについて、経験例を含めて紹介する。

2. 災害医療におけるコミュニケーション

災害対応の言葉にCSCATTTという言葉がある。

これは、災害発生時にとるべき行動の頭文字をとったものである(図1)

このうち、医療管理項目となるCSCAはそれぞれ、「C」Command&Control、「S」Safty、「C」Communication、「A」Assessmentの頭文字であり、2つ目の「C」はCommunicationである。

ここで言うCommunicationは、情報収集や、情報収集のための連絡手段の確保、収集した情報の記録、伝達等を示しており、「大規模事故、災害時対応に失敗する原因で最も多いのは情報伝達の不備である」と言われているほど、災害時にはCommunicationが非常に重要な項目である。

C : Command & Control	指揮と連携
S : Safty	安全
C : Communication	情報伝達
A : Assessment	評価

T : Triage	トリアージ
T : Treatment	治療
T : Transport	搬送

(MIMMS* Major Incident Medical Management and Support) より引用、改変)

図1 災害対応の合言葉CSCATTT

3. 災害医療に関わる組織

臨床検査技師が所属できる災害医療に関わる組織は様々あり、その派遣システムも様々だが、その一部を紹介する。

①DMAT(Disaster Medical Assistance Team : 災害派遣医療チーム)

発災後概ね48時間以内に被災地に入り活動を開始できる機動性を持ち、専門的な研修・訓練を受けた災害派遣医療チームと定義づけられ、防ぎ得た災害死を減らすために、迅速に被災地に参集して活動を開始するチームである。異なる医療機関から派遣されたDMATが、CSCATTTの原則に沿って被災地で組織的な活動をする災害医療の専門集団である。

派遣形態としては、同じ病院の医師、看護師、業務調整員という4~5名チームでの派遣であり、臨床検査技師がDMATになると、業務調整員としてチームの活動記録や連絡、チームの活動のための物資の調達などを行う。

②DMATロジスティックチーム

DMAT登録されている隊員の中で、インストラクターあるいはタスクとして活動している隊員が、規程の研修を受けて登録されるもので、派遣形態としては個人派遣である。異なる病院から派遣された

隊員が、現地に参集し、本部を支援する専門チームとなって活動する。

活動内容は、医療機関から派遣されるチームとしてのDMATとは異なり、医療行為は行わない。災害時に設置される本部に本部活動要員として入り、DMATが組織的に活動するための調整、関係機関との連携による資源の調達、被災地内の道路状況の把握などの業務を行う。

③災害医療コーディネーションサポートチーム

日本災害医学会が組織している災害支援チームであり、日本災害医学会に所属し、規程の研修を受けて登録されるもので、派遣形態としては個人派遣となる。

主に災害の亜急性期にかけての活動を行い、災害時に設置される医療救護本部などで、本部要員として活動し、災害医療から保険医療への移行にかかる調整などの支援を行う。

④JDR(Japan Disaster Relief:国際緊急援助隊)

JICA事業のひとつで、日本国内ではなく、海外災害に対して政府が派遣するチームである。

救助チーム、医療チーム、専門家チーム、自衛隊部隊、感染症対策チームの5つがあり、臨床検査技師が登録できるのは医療チームあるいは感染症対策チームである。

派遣先は主に、医療提供が十分ではない発展途上国であり、海外災害で、被災国が日本に医療チームの派遣を要請すると、登録されている隊員に募集がかり、応募した隊員の中から選ばれ、現地で行う医療の規模に準じて最小20名程度から多くて70名程度のチームで派遣される。

国際緊急援助隊に登録している臨床検査技師は、現在日本でたった14名と非常に少ないのが現状である。

4. 災害活動でのコミュニケーション

以下に、災害活動経験でのコミュニケーションの失敗談、コミュニケーションの難しさについて紹介する。

①現場と本部の温度差

DMATが災害活動する際には、都道府県庁や災害拠点病院などに「本部」が設置され、活動する複数のDMATを指揮する。「現場」で活動するDMATは、自施設から出動した後、必ずどこかの「本部」に所属し、活

動の指示を受ける。この「本部」で活動するDMATもまた派遣されたDMATになるのだが、この「本部」と「現場」の間には少なからず温度差が生じる。

「本部」には本部の、「現場」には現場の大変さがあり、「本部」も「現場」も、危険な災害現場から一刻も早く被災者を救出したいという気持ちは同じなのだが、やはり被災者を目の前にしている「現場」と、電話で情報を受け取っている「本部」では熱量の差が生じてしまう。

このような活動では、「本部」で活動する隊員も、「現場」で活動する隊員も、一生懸命であるがゆえに、現場が緊迫するほど、緊急を要するほど、相手への口調も厳しくなってしまうことがある。災害時だから、緊急だからしょうがないというのは言い訳に過ぎず、相手の置かれた状況を考え、言葉を発する冷静さを忘れてはいけない。

②連絡系のスキル

連絡係に求められるスキルは、相手から与えられた情報だけではなく、今後必要になるだろう情報を先読みし、可能な限り一度の連絡で情報のすべてを聞くことである。

災害時には、連絡体制の確立が困難な場合が多い。一度かかった電話が、次にかけようとした時には繋がらないということは少なくない。貴重な一度の電話の中で、必要な情報を取り忘れたばかりにミッションが進まず、何度も電話をかけ直すという無駄な時間は可能な限りなくさなくてはならない。

③被災地のストレス

外部からの支援者の活動期間は長くても1週間程度だが、被災地の住人、被災地の医療従事者は地域が復旧するまで延々に続く。被災地の医療機関は、地域のために災害時の診療継続が求められるため、災害発生直後の災害対応から多数患者受け入れなど、医療従事者は自分たちが被災していることも忘れてフル稼働することになる。

災害派遣で被災地に入る上での留意点やマナーについてはしっかりと理解しておかなければならないというのは当たり前のことだが、災害派遣チームから一変、自施設の地域で災害が発生し、被災地の医療従事者という立場になると「被災地の医療機関で勤務している職員もまた被災者である」という

ことを改めて思い知る。

院内災害対策本部に関わる立場、自部署の所属長・役職者という立場であれば、自分自身も不眠不休の災害対応で大変かもしれないが、自宅が被災しながらも地域医療のために勤務し続けている職員が抱えるストレスのケアを忘れてはいけない。

災害急性期には「職員一丸となって頑張ろう」という思いも、いつのまにか蓄積した疲労と、たまり続けた心の疲弊が爆発すると、「自分たちだけが頑張っている」といった怒りや悲しみに変化し、他部署批判や個人批判など職員同士で傷つけ合ってしまう危険性がある(図2)

被災地の医療従事者だけに限らず、災害時に活動する医療従事者も同様であり、このような状況に陥る前に、勤務している者同士、活動している者同士の思いやる気持ち、大変な状況でも少しでもコミュニケーションをとり合うことが必要である。

反応/時期	時間経過と被災者の反応		
	急性期 発災直後から数日	反応期 1～2週間	回復期 1カ月～半年
身体	心拍数の増加 呼吸が速くなる 血圧の上昇 発汗や震え めまいや失神	頭痛 腰痛 疲労の蓄積 悪夢・睡眠障害	反応期と同じだが徐々に強度が減じていく
思考	合理的思考の困難さ 思考が狭くなる 集中力の低下 記憶力の低下 判断能力の低下	自分の置かれた辛い状況がわかってくる	徐々に自立的な考えが出来るようになってくる
感情	茫然自失 恐怖感 不安感 悲しみ 怒り	悲しみと辛さ 恐怖がしばしばよみがえる 抑鬱感、喪失感 罪悪感 気分の高揚	悲しみ 淋しさ 不安
行動	いらいらする 落ち着きなくなる 確信的になる 非難がましくなる コミュニケーション能力が低下する	被災現場に戻ることを怖れる アルコール摂取量が増加する	被災現場に近づくことを避ける
主な特徴	闘争・逃走反応	抑えていた感情が湧き出してくる	日常生活や将来について考えられるようになるが災害の記憶がよみがえり辛い思いをする

(災害時の心のケア：日本赤十字社)

図2 時間経過と被災者の反応

④国際災害でのコミュニケーション

国際災害に派遣される国際緊急援助隊は、ほとんどが初対面のメンバーと2週間の活動を共にするが、多くの場合、臨床検査技師はチームに1~2名である。その中で、現地での検査の運用方法についての決定は専門資格としての自身の知識と経験が求められる。検査運用での不具合や診療エリアでの患者動線などでの不具合があった場合は、その日のうちに医師・看護師と話し合い、日々改良しながら、良い点も悪い点も評価し合って、ベストな環境を見つけていく。派遣された異国の中で、状況に応じて対応する臨機応変さと個人のコミュニケーションスキルが求められる。

また、国際緊急援助隊が派遣される地域は発展途上国がほとんどであり、英語が伝わる地域ではない。このため、現地では通訳を介して英語と現地語での会話を行う場合がほとんどである。

言葉の壁にどれほどジェスチャーが使えるかについては、住民との日常会話なら良いかもしれないが、検体採取や問診については、なかなかジェスチャーだけでは難しいと言える。特に血液採取となると針を刺す=侵襲を与えるという行為であるため、ジェスチャーのみで針を刺すというわけにはいかない。さらに、採便と採尿については、やはり国や文化が変わっても「排泄物を出す」という行為はデリケートな問題であり、通訳を介した丁寧な説明を行うべきである。

以上、①から④は災害時のコミュニケーションの一例だが、災害時のコミュニケーションでの失敗を振り返ると、緊急性の高い状況での焦り、個人の経験不足、災害時の精神的ストレスによるものなど、「災害」という「日常+α」の状況で起こっている。もしかしたら、「災害」ではなかったら、状況も違ったかもしれない。

5. さいごに

災害は非日常である。

災害時は時間と命との勝負であり、精神的に追い詰められる場面も少なくない。そのような中で、身体的、精神的疲労の蓄積で心に余裕がなくなることが多く、災害時には普段のコミュニケーション能力、普段の人間性「素」が出ると言える。

平常時にコミュニケーションが取れない人間は、災害時にはさらにコミュニケーションの取れなくなる。平常時に他人を思いやれない人間は、災害時に他人を思いやることはできない。平常時に自分本位な人間は、災害時には自分のことしか考えられなくなるだろう。

最後に伝えたいのは、普段できないことは非常時には絶対にできないということである。

コミュニケーションとは、いわば人間性を表すものであり、普段からコミュニケーションを大切にし、お互いの人間性を大切にしていくことで、非常時にも思いやり支え合える関係性が構築できるのではないかと考える。

過去10年間における小腸切除術例の病理学的検討

千葉県がんセンター 臨床病理部 病理検査科

米井 勇太 高橋 司

有田 茂実 小高 亜紀子

千葉県立佐原病院 臨床検査部 臨床検査科

青野 卓矢

【要旨】

希少がんである小腸悪性腫瘍はその病態に関する報告が少ない。小腸悪性腫瘍の実態を調査し、病理組織標本作製にどのように反映できるのか、過去10年間に当センターで施行された小腸切除術87例の病理学的特徴とそれに対する病理組織標本作製技術とを検討した。

87例のおおもとの疾患は85例が悪性腫瘍であった。切除検体で急性腸管虚血や穿孔性腹膜炎などの非腫瘍性病変は29例、腫瘍性病変は58例で悪性腫瘍53例、良性腫瘍4例、良悪性中間型腫瘍(デスマイド型線維腫症)1例であった。悪性腫瘍の内訳は転移性腫瘍23例、悪性リンパ腫17例、消化管間質腫瘍(Gastrointestinal stromal tumor; 以下GIST)6例、小腸原発悪性腫瘍1例などであった。

小腸腫瘍は悪性リンパ腫やGISTなど免疫染色さらには遺伝学的検査が必要となる疾患が多いことが分かった。これらの現状をふまえ腫瘍の肉眼型や臨床所見よりプレアナリシス段階から種々の検索を念頭に置いて病理組織標本作製することが必要である。

【Key word】

小腸腫瘍 転移性小腸悪性腫瘍 悪性リンパ腫 GIST

【はじめに】

小腸悪性腫瘍は全消化管悪性腫瘍のなかで1~2%ほどで¹⁾、希少がんである。小腸はほかの消化管と比較して検査が難しい臓器であるが、近年小腸カプ

セル内視鏡やダブルバルーン小腸内視鏡検査の普及とともに検索が進み、小腸腫瘍の実態がより明らかになることが予想される。

こうした背景から病理検査に従事する臨床検査技師として病理診断における適切な病理組織標本作製および病理技術の向上と小腸切除術の病態把握の一助として当検討を実施した。

なお十二指腸は後腹膜臓器であり解剖学的構造が空腸・回腸とは異なり、十二指腸型濾胞性リンパ腫では通常の濾胞性リンパ腫とは異なる性質を持ち^{2) 4)}、緩徐な経過を示す^{2) 3) 4)}ことが報告されている。解剖学的に他の小腸と異なる点と腫瘍の病態が他の消化管腫瘍と比較して特異な性質をもつ点から十二指腸は本検討から除外した。

【対象】

2008年1月から2018年10月までの約10年間に施行された小腸切除術のうち、十二指腸を除く87例を対象とした。今回、腹膜播種から形成された病変や、他臓器悪性腫瘍の直接浸潤病巣も含めた。

【結果】

切除術例87例について、おおもとの疾患(原疾患)の内訳(Fig. 1)は上部消化管癌が23例(26%)、悪性リンパ腫17例(20%)、下部消化管癌14例(16%)、婦人科領域癌5例(6%)、GIST4例(5%)、呼吸器領域癌4例(5%)、泌尿器領域癌3例(3%)、軟部肉腫2例(2%)、Peutz-Jeghers症候群2例(2%)、その他13例(15%)であった。上部消化管では胃癌や膵癌、下部消化管においては

直腸癌などの事例が多く、小腸は種々の臓器からの転移や原疾患の影響を受け、切除されていた。

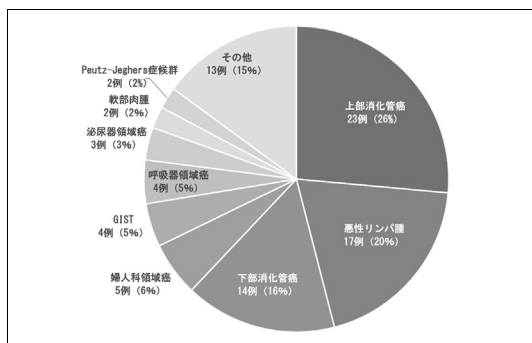


Fig. 1 切除術例の原疾患

Table1に切除術例87例の病理組織診断の内訳を示す。切除術例87例の性差は男性が61例、女性26例で男性が2倍ほど多かった。平均年齢は62.4歳、中央値は66歳(34-82歳)であった。年齢分布別に見ると60歳代が27人と最も多く、次いで70歳代26人、50歳代16人、80歳代8人、40歳代7人、30歳代3人の順で60~80歳代が全体の約5割を占めていた。

Table 1 切除術例87例の病理組織診断の内訳

項目	例数 (%)
非腫瘍性病変	
腸閉塞	6 (7)
急性腸管虚血	5 (6)
腸管虚血	2 (2)
過誤腫性ポリープ	2 (2)
その他	14 (16)
腫瘍性病変	
悪性腫瘍	53 (61)
良性腫瘍	4 (5)
良悪性中間型腫瘍	1 (1)

切除術例87例の病理組織診断の内訳について切除検体中に腫瘍細胞を認めず急性腸管虚血や穿孔、腸閉塞などと診断された非腫瘍性病変が29例(33%)、腫瘍性病変58例(67%)であった。非腫瘍性病変29例の内訳は腸閉塞が6例と最も多く、次いで急性腸管虚血5例、腸管壊死2例などの順であった。腫瘍性病変58例の内訳は悪性腫瘍と診断されたものが53例(61%)、良性腫瘍が4例(5%) (脂肪腫2例、平滑筋腫1例、リンパ管腫1例)、良悪性中間型腫瘍(デスマイド型

線維腫症)1例(1%)であった。

Table2に悪性腫瘍53例の内訳を示す。転移性腺癌23例(43%)、悪性リンパ腫17例(32%)、GIST6例(11%)で転移性腺癌、悪性リンパ腫やGISTが全体の75%を占めていた。少数例では脱分化型脂肪肉腫や悪性線維性組織球腫(現:未分化多形肉腫)などがみられた。また原発性小腸癌(組織型:Adenocarcinoma)を1例(2%)認めた。悪性リンパ腫17例の内訳はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫(diffuse large B-cell lymphoma; 以下DLBCL)9例(53%)、濾胞性リンパ腫(follicular lymphoma; 以下FL)4例(24%)、B細胞性リンパ腫2例、T細胞性リンパ腫2例であった。

切除術に至った経緯については87例中、腸閉塞30例(34%)、穿孔性腹膜炎15例(17%)、腫瘍切除10例(11%)、化学療法による穿孔を防ぐための予防的切除や残胃癌などによる合併切除が32例(34%)であった。

患者予後に影響を与える腸管合併症(腸閉塞や穿

Table 2 悪性腫瘍53例の内訳

項目	例数 (%)
上皮性悪性腫瘍	
転移性腺癌	23 (43)
原発性小腸癌	1 (2)
その他	3 (6)
非上皮性悪性腫瘍	
悪性リンパ腫	17 (32)
DLBCL	9 (17)
FL	4 (8)
その他	4 (8)
GIST	6 (11)
その他	3 (6)

孔性腹膜炎など)のうち穿孔性腹膜炎を併発した15例の内訳をTable3に示す。非腫瘍性病変(化学療法後や術後合併症によるもの)が7例(47%)、悪性腫瘍との併発が8例(53%)であった。

悪性腫瘍8例のうち上皮性悪性腫瘍は6例(40%)で転移性腺癌5例、転移または原発性腺癌1例であった。非上皮性悪性腫瘍は2例(13%)で悪性リンパ腫(DLBCLとMALTリンパ腫が各1例ずつ)であった。上皮性悪性腫瘍に腸管合併症を併発した症例は卵巣癌や大腸癌、肺癌などの転移などによって引き起こされたものであり、全8例が急速な転帰をたどった。

Table3 穿孔性腹膜炎を合併した15症例の内訳と転帰

項目	例数(%)	生存者数(%)	死亡者数(%)
非腫瘍性病変	7(47)	2(13)	5(33)
腸管穿孔	5(33)	1(7)	4(27)
潰瘍	1(7)	0	1(7)
虚血性腸管壊死	1(7)	1(7)	0
腫瘍性病変	8(53)	0	8(53)
上皮性悪性腫瘍	6(40)	0	6(40)
転移性腺癌	5(33)	0	5(33)
転移または原発性腺癌	1(7)	0	1(7)
非上皮性悪性腫瘍	2(13)	0	2(13)
DLBCL	1(7)	0	1(7)
MALTリンパ腫	1(7)	0	1(7)

【考察】

今回、我々は過去約10年間における小腸切除術87例について病理学的特徴の解析をおこなった。悪性腫瘍53例中、転移性腺癌が最も多く、次いで悪性リンパ腫、GISTの順であった。原発性小腸癌は1例であった。組織型別にみると腺癌では高分化なものや中分化なものなどがあり、悪性リンパ腫ではDLBCLが最も多かった。八尾ら⁵⁾の5年間(1995~1999年)における小腸腫瘍の本邦報告例の集計によると原発性小腸悪性腫瘍481例中の組織型頻度は癌(腺癌)157例(33%)が最も多く、ついで悪性リンパ腫146例(30%)、平滑筋肉腫140例(29%)の順であった。一方

Mitsuiら⁶⁾による報告によれば144例の小腸悪性腫瘍のうち悪性リンパ腫が31例(22%)、ついでGIST 27例(19%)、小腸癌14例(10%)、小腸への転移あるいは浸潤13例(9%)であった。悪性リンパ腫やGISTが多い点はMitsuiらの報告と類似した結果であった(Table4)。悪性リンパ腫の組織型別に見るとMitsuiらの報告ではFL 11例(8%)が最多で、ついでDLBCL 6例(4%)と続くのに対し、当センターではDLBCLが最も多い9例(10%)、ついでFL 4例(9%)であった。これは味岡ら⁷⁾による外科切除小腸腫瘍146例中DLBCL 24例(16%)が最多でついで、FL 2例(1%)と続く報告に類似していた。以上小括すると① 悪性リンパ腫、GIST(平滑筋肉腫を含む)、腺癌が小腸腫瘍では多いこと。② 悪性リンパ腫ではDLBCLやFLが多いことが分かった。

切除術に至った経緯では腸閉塞が最も多かった。穿孔性腹膜炎(化学療法後や術後合併症によるものを含む)を合併し切除が施行された例では15例中13例(87%)が、腸閉塞を合併した例では30例中18例(60%)が死亡し、予後不良の転帰をたどっていた。腸管合併症によって死亡した症例では原発巣からの転移もしくは浸潤により腸管合併症を発症しており、すでに原疾患の病期が進行した症例でみられた。

穿孔症例が予後不良な原因として、悪性リンパ腫では特異的症状に乏しく病期が進行した状態で発見されることが多いことや、免疫能低下によって易感染性をきたし、これによって穿孔時にエンドトキシンショックに移行しやすいことなどが考えられている⁸⁾。したがって標本作製にあたって腸管合併症を併発した患者については速やかに標本作製を行い、診断する必要があることを念頭におかなければ

Table4 小腸悪性腫瘍についての報告と当センターとの比較 (%)

	悪性腫瘍の報告数	転移性腫瘍	悪性リンパ腫	GIST (平滑筋肉腫を含む)	原発性小腸癌	その他
八尾	481	—	146(30)	140(29)	157(33)	38(8)
Mitsui	89	13(15)	31(35)	27(30)	14(16)	4(4)
味岡	114	27(14)	29(25)	33(29)	22(19)	3(3)
当センター	53	23(43)	17(32)	6(11)	1(2)	6(11)

(GISTの概念が確立される以前に平滑筋肉腫と診断された症例も含む。)

ばならない。

原発性小腸癌については消化管悪性腫瘍の1~2%であるが、原岡ら⁹⁾によると全身の悪性腫瘍の消化管への転移率は小腸8.53%、結腸・直腸・虫垂6.56%、胃5.86%とある。我々の検討においても切除術例87例中23例(26%)が転移性腫瘍であり、決して無視できる数ではないと思われる。そのため、小腸悪性腫瘍に関して転移性腫瘍の存在を留意しておくことが重要と考えられる。肉眼型と組織型との関連について原発性上皮性腫瘍では分葉・結節状・乳頭状などの粘膜形態が多く、転移性腫瘍や悪性リンパ腫では潰瘍形成が主体病変であることが報告されている⁷⁾。隆起性発育や潰瘍形成をきたす腫瘍のような細胞密度が増加する組織では、細胞同士の重なりが少ない薄い薄切切片を作製する過程においてチャター(刃線に平行に生じる横波。Fig. 2)のよう

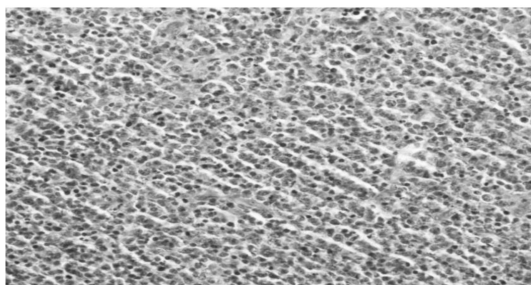


Fig. 2 薄切時に生じたチャターの一例

なアーティファクトの出現率が高くなることが予想される。また悪性リンパ腫では腫瘍細胞が全層性に浸潤し間質反応としての線維性結合組織に乏しく腫瘍自体が脆弱とされる^{10) 11)}。腫瘍細胞の拡がりを連続的に捉えるため切り出しを始め、固定・包埋作業において固定不良・過固定に注意し、薄切面の凹凸や組織が損傷することがないように包埋する必要と考えられる。原発性腺癌か転移性腺癌の鑑別、GISTや平滑筋系および神経原性腫瘍など紡錘形細胞腫瘍の鑑別、悪性リンパ腫の組織型分類などに際して各種免疫染色の必要が生じてくることを念頭に置いた標本作製が必要である。

【まとめ】

小腸腫瘍は87例中53例(61%)と大半が悪性腫瘍であり、そのうち転移性腺癌、悪性リンパ腫やGISTが

75%を占める。希少がんである原発性小腸癌は1例(1%)のみであった。免疫染色や遺伝学的検査の必要を踏まえ、標本の肉眼型や臨床所見などに注意を払いプレアナリシス段階から検体の品質を担保しながら適切な標本作製すること¹²⁾は迅速な病理診断へと結びつく。このことは速やかな治療方針の決定や治療の開始につながり、ひいては臨床検査技師として医療の質向上に寄与できるものとする。

【参考文献】

- 1) GOOD CA: Tumors of the small intestine. AJR, 89:695-705, 1963
- 2) 中村栄男, 他: リンパ腫アトラス, 濾胞性リンパ腫: 123-128, 文光堂, 2018
- 3) 小椋 美知則: 小腸原発悪性リンパ腫の治療. 胃と腸, 48:1474-1480, 2013
- 4) 日本リンパ網内系学会(編): リンパ腫セミナー 基本から学べる WHO分類改訂第4版(2017年), 低悪性度B細胞性リンパ腫, マントル細胞リンパ腫: 52-58, 南江堂, 2018
- 5) 八尾恒由, 他: 小腸腫瘍—最近5年間(1995~1999)の本邦報告例の集計. 胃と腸, 33:871-881, 2001
- 6) Mitsui K, et al: Role of double-balloon endoscopy in the diagnosis of small-bowel tumors: the first Japanese multicenter study. Gastrointest Endosc, 70:498-504, 2009
- 7) 味岡洋一, 他: 小腸腫瘍性疾患の病理学的鑑別診断. 胃と腸, 43:499-512, 2008
- 8) 尾崎行男, 他: 悪性リンパ腫による小腸穿孔の臨床的検討. 外科, 42:1615-1619, 1980
- 9) 原岡誠司, 他: 病理から見た消化管転移性腫瘍. 胃と腸, 38:1755-1771, 2003
- 10) Herrmann R, et al: Gastrointestinal involvement in non-Hodgkin's lymphoma. Cancer, 46: 215-222, 1980
- 11) Azzopardi JG, et al: Primary malignant lymphoma of the alimentary tract. Br J Surg, 47: 358-366, 1960
- 12) 日本病理学会(編): ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程, ホルマリン固定パラフィン包埋組織・細胞検体の適切な取扱い: 3-7, 2018

*Clostridioides difficile*検査におけるToxigenic cultureの有用性

千葉大学医学部附属病院 検査部

山下 晃司 村田 正太 齊藤 知子
宮部 安規子 瀬川 俊介 堀田 恵海
鈴木 眞 川崎 健治 松下 一之

【要旨】

*Clostridioides difficile*感染症の検査は、糞便を検体としたイムノクロマト (IC) 法、遺伝子検査 (NAAT) 法、分離された菌株からIC法を用いて毒素を検出する分離培養 (toxigenic culture ; TC) 法が利用されている。IC法は簡便で迅速性に優れているが、毒素の検出感度が低いことが知られている。日本臨床微生物学会の*Clostridium difficile*毒素遺伝子検査を踏まえた検査アルゴリズムでは、グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) 陽性・毒素陰性の場合にはNAAT法を実施することを推奨しているがNAAT法を実施できる施設は限定される。今回、我々は多くの施設で実施可能なTC法の有用性を検討した。IC法でGDH陽性・毒素陰性であった17件のTC法とNAAT法の結果は、毒素陽性5件、毒素陰性12件で両法の結果は一致した。TC法は、迅速性に劣るがNAAT法と同等に毒素を検出することが可能であり有用であると考えた。

【keywords】

Clostridioides difficile , Glutamate dehydrogenase , Immunochromatography , Toxigenic culture , Nucleic acid amplification test

【はじめに】

*Clostridioides difficile*は、抗菌薬関連下痢症 (antibiotic-associated diarrhea ; AAD) の最も重要な原因菌である。本菌はAAD症例の15~25%、発熱や末梢血白血球数増加を伴う腸炎に進展した例では50~70%に関与する¹⁾。*C. difficile*感染症

(*C. difficile* infection ; CDI)には本菌が産生する毒素が関与しており、Toxin A, Toxin BおよびBinary toxinが存在する。しかし、毒素非産生株のみならず毒素産生株が健常者に定着することが確認されておりCDIによる下痢なのか菌が定着しているだけなのかを判断するのは簡単ではない²⁾。また、近年では欧米などで強毒株と呼ばれBinary toxinを産生するBI/NAP1/027型株のアウトブレイク³⁾が発生している。本邦においてはToxin B産生株のアウトブレイク⁴⁾が発生しており、CDIの検査、治療、感染制御に対する関心が高まっている。しかし、感染症法や厚生労働省の院内感染対策サーベイランス (JANIS) にもCDIは対象疾患として含まれていないため、本邦の実情についてはよくわからない。

CDIの検査は、迅速検査として糞便検体から菌体抗原であるグルタミン酸脱水素酵素 (glutamate dehydrogenase ; GDH) およびToxin A, Toxin Bを直接検出するイムノクロマト (immunochromatography ; IC) 法や、最近ではリアルタイムPCR法を用いて糞便中の毒素遺伝子を検出する遺伝子検査 (nucleic acid amplification test ; NAAT) 法がある。また、分離された菌株からIC法を用いて毒素を検出する分離培養 (toxigenic culture ; TC) 法があり、本邦においては簡便で迅速性に優れているIC法が汎用されている。しかし、糞便を検体としたIC法は毒素検出感度が低いことから、日本臨床微生物学会の*Clostridium difficile*毒素遺伝子検査を踏まえた検査アルゴリズム⁵⁾では、IC法でGDH陽性・毒素陰性となった場合、NAAT法を追加する二段階アルゴリズムを推奨している (Figure 1)。NAAT法は、2019年4月に保険収載されたが現状では実施できる施設は限

定される。今回、我々はCDIにおける各種検査法を比較し、多くの施設で実施可能なTC法の有用性を検討したので報告する。

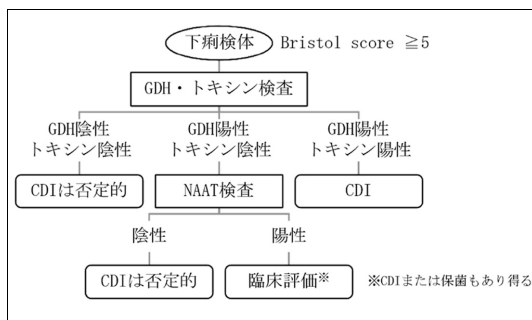


Figure 1. 通常診療における*C. difficile*検査の考え方(文献5より引用)

【対象および方法】

1. 対象

2018年7月から12月までの期間に、千葉大学医学部附属病院検査部へ*C. difficile*の検査を目的に提出されたBristol stool scale 5以上の糞便検体のうち、IC法およびTC法を同時に実施した197件を対象とした。なお、NAAT法はIC法でGDH陽性・毒素陰性となった17件で実施した。

2. 方法

1) 糞便中GDHおよび毒素の検出(IC法)

酵素免疫測定法(enzyme immunoassay ; EIA)を測定原理としたIC法による糞便中のGDHおよび毒素(Toxin A, Toxin B)の検出試薬である*C. DIFF* QUIK CHEK コンプリート(アボット ジャパン)を使用し、添付文書に記載されている方法に従い実施した。

2) *C. difficile*分離培養および毒素検出(TC法)

TC法は、糞便検体を直接CCMA培地EX(日水製薬)に接種し、テーパー式・アナエロ・ボックスANX-5型(ヒラサワ)を用い、混合ガス(N₂ 80%、CO₂ 10%、H₂ 10%)で置換後、35°C、48時間嫌気培養した。TC法は時間を要するため24時間培養時に特有の臭気を発するR型でマンニト分解のコロニーを認めた場合、MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) で同定し*C. difficile*の発育を臨床へ中間報告した。毒素検査

は、48時間培養後のコロニーからIC法を使用して確認した。方法は、発育したコロニーを複数かき取り、希釈液750 μLにMcFarland No. 4以上の濃度となるように懸濁し、以降は添付文書に記載されている方法に従い実施した。

3) 糞便中毒素遺伝子の検出 (NAAT法)

NAAT法は、核酸抽出・PCR増幅・検出までを完全統合した自動遺伝子解析装置GeneXpertシステムGX-II (ベックマン・コールター)を使用した。試薬は、糞便中に含まれるToxin Bおよび海外で強毒性が問題になっている027型株関連遺伝子(Binary toxinおよび変異型*tcdC*)のDNAを検出できるXpert *C. difficile*「セフィエド」(ベックマン・コールター)を使用し、添付文書に記載されている方法に従い実施した。

【結果】

1. TC法の培養結果とIC法の検査結果の比較

TC法の培養結果とIC法の検査結果を比較した(Table 1)。全検体197件中、IC法で毒素陽性となったのは5件(2.5%)、TC法では11件(5.6%)であった。IC法でGDHと毒素の結果が一致した場合(GDH陽性・毒素陽性、GDH陰性・毒素陰性)のTC法との結果を比較した。IC法でGDH陽性・毒素陽性の場合(n=5)は5件全てで培養陽性・毒素陽性、IC法でGDH陰性・毒素陰性の場合(n=175)は169件で培養陰性となり、IC法とTC法の一致率はそれぞれ100% (5/5)、96.6% (169/175)であった。

Table 1. TC法の培養結果とIC法の検査結果の比較(n=197)

		TC法			合計
		培養陽性		培養陰性	
		毒素陽性	毒素陰性		
IC法	GDH陽性	5	0	0	5
	毒素陽性	5	12	0	17
法	GDH陰性	1	5	169	175
	毒素陰性	1	5	169	175
合計		11	17	169	197

2. TC法の培養結果とIC法のGDH検査結果の比較

TC法の培養結果とIC法のGDH検査結果を比較した (Table 2)。TC法を対照としたGDHの感度、特異度、陽性的中率、および陰性的中率は、それぞれ78.6% (22/28)、100% (169/169)、100% (22/22)、96.6% (169/175)であった。

3. TC法の培養結果とIC法の毒素検査結果の比較

TC法の培養結果とIC法の毒素検査結果を比較した (Table 3)。TC法を対照とした毒素の感度、特異度、陽性的中率、および陰性的中率は、それぞれ45.5% (5/11)、100% (186/186)、100% (5/5)、96.9%

(186/192)であった。

4. IC法GDH陽性・毒素陰性例の検査結果

IC法でGDH陽性・毒素陰性であった17件の検査結果を示す (Table 4)。TC法は、17件全てで培養陽性となり菌量は 10^3 ~ 10^6 CFU/mL、うち5件 (29.4%)で毒素陽性であった。また、TC法で毒素陽性となった5件はいずれもNAAT法で毒素陽性となりTC法とNAAT法の一致率は100%であった。今回NAAT法を実施した17件では、027型株関連遺伝子であるBinary Toxinや変異型tcdCのDNAは検出されなかった。

Table 2. TC法を対照としたIC法のGDH検査成績 (n=197)

	TC法			感度 (%)	特異度 (%)	陽性的中率 (%)	陰性的中率 (%)
	培養陽性	培養陰性	合計				
IC法	GDH陽性	22	0	78.6	100	100	96.6
	GDH陰性	6	169				
	合計	28	175				

Table 3. TC法を対照としたIC法の毒素検査成績 (n=197)

	TC法			感度 (%)	特異度 (%)	陽性的中率 (%)	陰性的中率 (%)
	毒素陽性	毒素陰性	合計				
IC法	毒素陽性	5	0	45.5	100	100	96.9
	毒素陰性	6	186				
	合計	11	192				

Table 4. IC法GDH陽性・毒素陰性例の検査結果 (n=17)

No.	IC法		TC法	NAAT法	
	GDH	毒素	CFU/mL	毒素	毒素
1	+	-	10^3	+	+
2	+	-	10^3	+	+
3	+	-	10^3	+	+
4	+	-	10^4	+	+
5	+	-	10^4	+	+
6	+	-	10^3	-	-
7	+	-	10^3	-	-
8	+	-	10^3	-	-
9	+	-	10^4	-	-
10	+	-	10^4	-	-
11	+	-	10^4	-	-
12	+	-	10^4	-	-
13	+	-	10^4	-	-
14	+	-	10^4	-	-
15	+	-	10^4	-	-
16	+	-	10^5	-	-
17	+	-	10^6	-	-

【考察】

CDIの検査は、IC法の毒素検出感度が低いことから日本臨床微生物学会の*Clostridium difficile*毒素遺伝子検査を踏まえた検査アルゴリズム⁵⁾では、IC法でGDH陽性・毒素陰性となった場合、NAAT法を追加する二段階アルゴリズムを推奨している(Figure 1)。しかし、NAAT法を実施できる施設は限定されることから多くの施設で実施可能なTC法の有用性を検討した。

今回、我々が検討したIC法の毒素検出感度は45.5%であり過去に報告されている毒素検出感度と同等の成績であった⁶⁾⁷⁾。この検出感度は十分高いとはいえず、本検討においてもIC法のみでは2.5%であった毒素検出率がTC法またはNAAT法を追加することで5.6%と約2倍に増加した。このことから、IC法のみではCDIを見逃す可能性が示唆された。

GDH検出結果は、感度78.6%、特異度100%であった。また、IC法でGDHと毒素の結果が一致した場合(GDH陽性・毒素陽性、GDH陰性・毒素陰性)のTC法との一致率は、それぞれ100%、96.6%と良好な成績であった。よってIC法でGDHと毒素の結果が一致した場合は、追加検査は不要であると考えられた。しかし、腸管洗浄剤の主成分であるポリエチレングリコール4000溶液でIC法GDHおよび毒素が偽陽性になるという報告⁸⁾もある。本検討で対象とした197件では腸管洗浄剤を含む検体は確認できなかったが、腸管洗浄剤を含む検体でIC法を実施する場合は偽陽性の可能性にも留意して検査を実施しなければならない。場合によっては、追加検査を実施するなどしてIC法の偽陽性でないことを確認する必要があると思われる。

以上から、IC法でGDHと毒素の結果が一致した場合は基本的には追加検査は不要であり、IC法の結果を最終報告として良いことが示唆された。しかし、GDHの感度は100%ではないため、菌量が少なく検出感度以下の場合は偽陰性となる可能性があることや、腸管洗浄剤による偽陽性の可能性もある。そのため、臨床側がCDIを強く疑っている場合や腸管洗浄剤を含んだ検体で検査を実施する場合は追加検査を実施するなどの対応も必要であると考えた。

一方、IC法でGDH陽性・毒素陰性となった場合、TC

法において29.4%で毒素陽性となった。IC法の毒素検出感度が低いことから、GDH陽性・毒素陰性となった場合は追加検査が必要であると考えられる。本検討では、追加検査としてTC法とNAAT法を実施し、両法の一致率は100%であった。2017年に発表された日本臨床微生物学会の*Clostridium difficile*毒素遺伝子検査を踏まえた検査アルゴリズム⁵⁾ではGDH陽性・毒素陰性となった場合の追加検査はNAAT法を推奨している。しかし、2018年に発表された日本化学療法学会・日本感染症学会の*Clostridioides (Clostridium) difficile*感染症診療ガイドライン⁹⁾では、「NAAT法が施行できない施設では、GDH陽性・トキシン陰性の場合に菌株の分離培養を行い、トキシン産生性を評価する二段階法を行うことができる」との記載がある。そのため、GDH陽性・毒素陰性となった場合の追加検査としてNAAT法を実施できない場合は、NAAT法と同等であったTC法で代用可能であると考えた。

NAAT法は、本検討においてはIC法のGDH陽性・毒素陰性例のみの実施であること、検討数が17件と少ないことなどの前提条件はあるが、TC法との一致率は100%と良好な結果であった。NAAT法には感度、特異度が良好であることや迅速性があるというメリットがある。また、迅速性があることから感染制御にも貢献できると考える。一方で、過剰診断などのデメリットもある。NAAT法が陽性を示してもIC法で毒素陰性となった症例では、非CDI症例と変わらない臨床経過を示し、NAAT法のみでの検出は過剰診断となる可能性があるという報告¹⁰⁾や、IC法とNAAT法の毒素検出感度には約1000倍の差があるという報告¹¹⁾もある。NAAT法は検出感度が高いことからIC法の検出感度以下であっても検出できる反面、無症候性キャリアでも陽性となる可能性がある。そのため、実施においては、臨床所見を含めた総合的な判断が必要となる。本邦においては、現状ではNAAT法は普及しておらず疫学データも少ないことから、2019年4月に保険収載されたことでNAAT法がさらに普及し疫学データが蓄積されることが期待される。

【結語】

IC法でGDH陽性・毒素陰性となった場合、毒素検

出感度が低いことからTC法あるいはNAAT法を実施することが望まれる。感度、特異度とも良好で迅速性のあるNAAT法は有用であり今後普及することが予想されるが、現状では実施できる施設は限定される。一方、TC法は迅速性こそ劣るものの多くの施設で実施でき、NAAT法と同等に毒素を検出することが可能であり有用であると考えた。

【文献】

- 1) 加藤はる, 他: *Clostridium difficile* 感染症と細菌学的検査, 日臨微生物誌, 12(3):115-122, 2002
- 2) 中村敦: CDIの検査・診断・予防・治療—対象患者の考え方と新規薬剤による今後の展望, 感染対策ICTジャーナル, 14(1):44-50, ヴェン メディカル, 2019
- 3) He M et al: Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*, Nat Genet, 45(1):109-113, 2013
- 4) 佐藤洋子, 他: がんセンターにおけるtoxin A陰性toxin B陽性*Clostridium difficile*による下痢症の院内集団発生, 感染症誌, 78(4):312-319, 2004
- 5) 賀来満夫, 他: *Clostridium difficile* 毒素遺伝子検査を踏まえた検査アルゴリズム, 日臨微生物誌, 27(4):222-226, 2017
- 6) 鈴木広道, 他: 糞便検体に対する*Clostridioides difficile* 特異抗原・毒素検出試薬の多施設臨床性能試験, 日臨微生物誌, 28(4):261-268, 2018
- 7) 西尾美津留, 他: *Clostridium difficile* ToxinおよびGDH抗原同時検出試薬の検出性能に関する比較検討, 医学検査, 67(4):469-474, 2018
- 8) 和泉彬彦, 他: 経口腸管洗浄剤が*Clostridium difficile* Toxin検出キットに与える影響, 医学検査, 63(3):288-293, 2014
- 9) 日本化学療法学会・日本感染症学会 CDI診療ガイドライン作成委員会: *Clostridioides (Clostridium) difficile* 感染症診療ガイドライン, 2018
- 10) Polage CR et al: Overdiagnosis of *Clostridium difficile* Infection in the Molecular Test Era, JAMA Intern Med, 175(11):1792-1801,

2015

- 11) 松浦成美, 他: C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE[®]にてクロストリジウム・ディフィシル抗原(グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH))陽性・トキシン陰性を示した検体におけるBDマックスCDIFF[®]を用いた遺伝子検査の有用性, 医学検査, 67(4):451-455, 2018

*Veillonella parvula*による椎体炎から菌血症を起こした症例

国保直営総合病院 君津中央病院

医療技術局 臨床検査科 微生物検査室

永井美香子 足達由佳里 加地 大樹

中村 大輝 小坂 駿介 岩間 暁子

【要旨】

40歳代男性。発熱、鼠径部痛、腰痛を主訴に当院総合診療科を受診。発熱が2週間近く続いており、血液培養2セット採取し、外来での経過観察となった。培養2日目に外来受診時の血液培養嫌気ボトル1本が陽性となり*Veillonella parvula*が検出された。症状が改善しなかったため、化膿性椎体炎の可能性を考慮し、入院加療となった。造影CTを実施後、L5椎体、椎間板の組織の培養、血液培養2セットを提出し、すべての検体より*V. parvula*が検出され、化膿性椎体炎の起因菌とされた。ブルセラHK寒天培地に発育した微小集落はMALDI Biotyperおよび16S rRNA遺伝子の塩基配列の解析により*V. parvula*と同定された。*V. parvula*は偏性嫌気性グラム陰性球菌でヒトや動物の口腔および腸管から分離され、稀に心内膜炎や髄膜炎および椎間板炎の患者から検出される。*V. parvula*による感染症例は稀であり、本症例は血液培養と椎体から*V. parvula*が検出された貴重な症例であった。

Keyword *Veillonella parvula* 化膿性椎体炎
菌血症

【序文】

*V. parvula*は偏性嫌気性グラム陰性球菌でヒトや動物の口腔および腸管から分離される。運動性のない小球菌であり、短い連鎖状、双球菌状または塊状になることもある。口腔内で最も多い菌種であり、歯垢、舌、唾液中に多いとされる。他の細菌と凝集し、歯垢の成熟化に関与している¹⁾。また、*V. parvula*は糖を分解できず、他の細菌が糖を分解して産生する乳酸、ピルビン酸、リンゴ酸、フマル酸などの

中間代謝産物を利用して生息する。そして最終代謝産物として酢酸、プロピオン酸、炭酸ガスや水素を産生する¹⁾。病原性は低いとされているが、稀に心内膜炎、髄膜炎や椎間板炎の患者検体から分離されることがある。今回、化膿性椎体炎患者より*V. parvula*が検出され菌血症となり、貴重な症例となったため症例報告する。

【症例】

患者：40歳代 男性

主訴：発熱、鼠径部痛、腰痛

現病歴：20XX年10月に腰痛を発症し、体動困難にて出張先で救急搬送、他院入院となる。1ヶ月後、10日間続く39℃近くの発熱、腰痛で近医整形外科を受診し、当院整形外科を紹介で受診。外来初診時に肝機能障害を認めたが帰宅。6日後2週間近く続く発熱、両鼠径部痛増悪のため当院総合診療科を受診し、血液培養2セット採取し、コロナール、ロキソプロフェンNa、レバミピドが処方され外来での経過観察となった。外来受診時に採取した血液培養のうち嫌気ボトル1本が43.5時間で陽性となり、グラム陰性球菌を認めた(図1)。

翌日発育したコロニーをMALDI Biotyper (ブルカー・ダルトニクス株式会社：ブルカー)で同定した結果*V. parvula*となった。臨床医に報告し、コンタミネーションの可能性も否定できなかったが、症状が改善しなかったため3日後に再診となった。2度目の外来受診時CTでは所見がなかったが、血液培養の結果および腰痛と発熱から化膿性椎体炎の可能性を考慮し、整形外科へコンサルトして入院加療となった。造影CTを実施後、L5椎体、椎間板の組織の

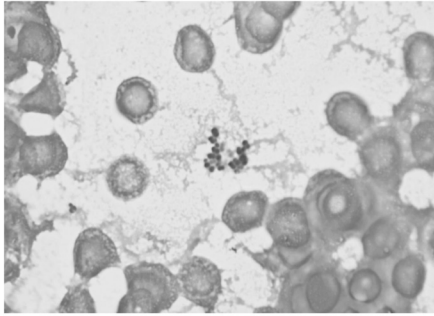


図1 血液培養ボトル内容液のグラム染色所見
グラム陰性球菌(x1000)

一般細菌・抗酸菌培養、血液培養2セットが提出された。Cefazolin (CEZ) 2g/8h静注が開始された。

既往歴：急性腰痛症

入院時内服薬：カロナール、ロキソプロフェンNa、レバミピド

入院時現症：175cm、体重66.0kg、血圧144/100mmHg、脈拍107回/分、体温36.9℃、全身状態は良好、咽頭発赤なし、扁桃腫大なし、白苔なし、頸部リンパ節腫脹なし、甲状腺腫大なし、

胸部：no rale, no murmur

腹部：平坦、軟、圧痛なし、BS→鼠径部圧痛なし、両鼠径部～側腹部にかけて自動時痛あり、他動時痛なし

腰部骨盤：自動時痛あり、他動時痛なし

背部：両側CVA叩打痛なし、椎弓叩打痛なし

感染症検査：HIV陰性 HBV、HCV陰性

入院時検査所見：血液検査ではWBC $9.1 \times 10^3/\mu\text{L}$ 、



図2 入院時造影CT結果

L4/5レベルで比較的強く、周囲に軟部濃度がみられる。上下の椎体の硬化変化もみられるようであり、脊椎炎の可能性はあるが、腫瘍形成は明らかではない

NEUTRO 73.4%と好中球の上昇、CRP 8.22 (mg/dL)と高値を認める。また、ALP 448 (IU/L)、 γ -GTP 173 (IU/L)と肝機能障害を認めた (表1)。

画像所見：造影CTにて変形性腰椎症が見られる。L4/5レベルで比較的強く、周囲に軟部濃度がみられる。上下の椎体の硬化変化もみられるようであり、脊椎炎の可能性はあるが、腫瘍形成は明らかではない (図2)。

入院後経過：血液培養の結果および腰痛、発熱の症状から化膿性椎体炎の可能性を考慮して造影CTを実施。造影CTから化膿性脊椎炎疑いで針生検を行い、L5、椎間板の組織培養、組織診を提出。穿刺後に血液培養2セットを提出。すべての検体から *V. parvula* が発育した。臨床経過 (体温、CRP、WBC 抗菌薬使用経過) (図3)。CEZ 2g/8h静注を開始し、第4病日からClindamycin (CLDM) 600mg/6hとCeftriaxone (CTRX) 2g/24hに変更した。第27病日に胸焼け、薬

表1 入院時検査所見

測定項目	測定値	測定項目	測定値
ALB	7.6 g/dL	WBC	9.1 $\times 10^3/\mu\text{L}$
AST	24 IU/L	RBC	4.50 $\times 10^6/\mu\text{L}$
ALT	40 IU/L	HGB	13.7 g/dL
LDH	160 IU/L	HCT	42.8 %
ALP	448 IU/L	MCV	95.0 fL
γ -GTP	173 IU/L	MCH	30.5 pg
T-Bil	0.6 mg/dL	MCHC	32.1 g/dL
D-Bil	0.1 mg/dL	RDW	12.9 %
Na	142 mEq/L	PLT	591 $\times 10^3/\mu\text{L}$
K	4.6 mEq/L	NEUTRO	73.4 %
CL	102 mEq/L	LYMPH	15.4 %
BUN	15 mg/dL	MONO	8.0 %
Cre	0.88 mg/dL	EOSINO	2.2 %
CK	61 IU/L	BASO	0.7 %
CRP	8.22 mg/dL	PCT	0.27 ng/mL
GLU	91 mg/dL	GFR	74 mL/min/1.73m ²
HBA1cNGSP	6.2 %		

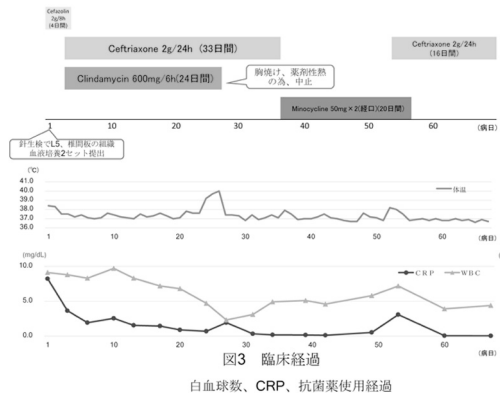


図3 臨床経過
白血球数、CRP、抗菌薬使用経過



図4 第13病日CT結果

入院時造影CT所見より第4腰椎椎体骨溶解像が進行

剤性熱によりCLDMの投与を中止した。第37病日からCLDMからMinocycline (MINO)へ経口投与に変更。変更後にCRPが上昇した為MINOの使用を中止し、第54病日からCTRXに変更。第13病日に行ったCTでは第4腰椎椎体骨溶解像が進行していた(図4)。第30病日よりダーメリンコルセットを装着。リハビリも並行して行い、第69病日に軽快退院となった。

病理検査：針生検で提出した腰椎では、組織学的には髄腔内に線維化と慢性炎症細胞浸潤を認め、骨髄炎としては矛盾しない像であり、悪性像は認めない。

微生物検査：外来受診時に採取した血液培養1セットの嫌気ボトルが培養43.5時間で陽性となり、グラム陰性球菌を認めた。TSA5%羊血液寒天培地(日本ベクトンデッキンソン：BD)、チョコレート寒天培地(BD)、BTB寒天培地(極東製薬工業株式会社：極東)、ブルセラHK寒天培地(RS)(極東)に分離し、血液寒天培地、チョコレート寒天培地は5%CO₂環境下で35℃培養、BTB寒天培地を35℃好気培養、ブルセラHK寒天培地(極東)をANAEROBOX(HIRASAWA)にて35℃嫌気培養を実施した。翌日、ブルセラHK寒天培地(極東)に微小な白色集落を形成していた(図5)。同定検査ではカタラーゼ(-)、ES加HK半流動(極東)：エスクリン/H₂S(-/+), Bile加HK半流動(極東)：(+), CV加HK半流動(極東)：(+)。コロニーよりMALDI Biotyper (ブルカー)ソフトウェアバージョン：MTB Compass 4.1、ライブラリバージョン：MTB Compass Library Ver. 7.0.0.0、ギ酸オンプレート法にて*V. parvula* (SCORE 2.35)と同定された。BBL CRYSTAL

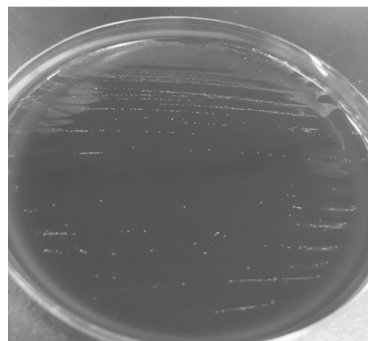


図5 ブルセラHK (RS)に発育した*V. parvula*

35℃嫌気培養下で24時間培養した集落
微小な白色コロニーを形成

表2 薬剤感受性結果

薬剤名	MIC値(μg/dL)	判定
Ampicillin/Sulbactam	≦0.5	S
Tazobactam/Piperacillin	≦2	S
Cefmetazole	≦2	*
Cefotaxime	≦4	*
Ceftriaxone	≦8	*
Cefoperazone/Sulbactam	≦1	*
Flomoxef	≦1	*
Faropenem	≦0.25	*
Imipenem/Cilastatin	≦0.25	*
Meropenem	≦0.25	S
Clarithromycin	≧32	*
Aztreonam	2	*
Clindamycin	≦0.5	S
Minocycline	≦2	*
Moxifloxacin	≦1	S
Levofloxacin	≦0.5	*
Metronidazole	2	S

CLSI M07-A10によって判定⁵⁾

*判定基準なし

(BD)での同定結果は*Veillonella* spp. (0002000000)となり、ラピッドID 32 A(ピオメリュー・ジャパン株式会社：ピオメリュー)では*Veillonella* spp. (2000104000)と同定された。BBL CRYSTAL (BD)、ラピッドID 32 A(ピオメリュー)では、*Veillonella* spp. までの同定が可能である。コロニーからRAISUS S4(日水製薬株式会社：日水)にてRSMA1パネルで感受性試験を実施した。感受性結果を示す(表2)。

さらに、入院時に提出された血液培養2セットのうち、1セットが59時間で陽性になり*V. parvula*と同定された。化膿性脊椎炎疑いで行った針生検からL5椎体、椎間板1, 2が提出され、一般細菌検査、抗酸菌検査を実施した。提出されたすべての検体から*V. parvula*が検出された。コロニーからRAISUS S4(日

水)にてRSM1パネルで感受性試験を実施し、血液培養から検出した*V. parvula*と同様の感受性結果を得た。後日菌株を山梨大学医学部附属病院検査部に依頼し、16S rRNA遺伝子塩基配列のシークエンスを実施し、得られた塩基配列をBLASTのデータベースと照合したところ、*V. parvula* ATCC 17745と99.6% (1,486/1,492 bp)と一致した。以上のことより*V. parvula*と同定された。

考察

*Veillonella*属は健康なヒトの口腔内の唾液、歯垢および歯肉溝や動物の呼吸気道、および腸管などに生息している。ヒトの口腔内では、歯垢、舌苔及び唾液などが主な常在場所であるが、唾液においては通性嫌気性連鎖球菌と同数あるいはそれ以上に検出される。ヒトの口腔内から分離されるのは*V. parvula*、*V. atypica*、*V. disper*、*V. denticariosi*、*V. rogosae*の5菌種である¹⁾。

また、*Veillonella*属はシステインなどの含硫黄化合物を還元して硫化水素を産生することから口臭の原因菌とされ、日和見感染などにも深くかかわっているとの報告も多数ある。本症例の*V. parvula*も硫化水素を産生している。稀に心内膜炎、髄膜炎および椎間板炎の患者の検体から分離された報告がある²⁾。*Veillonella*属は一般的にペニシリン系抗菌薬、セファロスポリン系抗菌薬、クロラムフェニコール、クリンダマイシン、メトロニダゾールには感受性を示すといわれており、テトラサイクリン系抗菌薬、バンコマイシン、アミノグリコシド系抗菌薬、シプロキサシンに耐性があるといわれている³⁾。本症例から分離された*V. parvula*はペニシリン系抗菌薬、セファロスポリン系抗菌薬に感受性を示している。*Veillonella*属による感染の報告例では感染の原因が不明とされている症例もある²⁾。化膿性脊椎炎の発生頻度は2.4/100000で男性が約2倍とされる。起因菌は*S. aureus* (48%)、*E. coli* (11%)、*Streptococcus* spp. (9.4%)、Coagulase negative staphylococci [CNS] (2.7%)、*Pseudomonas* spp. (2.0%)とされている。病変部位は腰椎が58%、胸椎が30%、頸椎が11%となり、感染源が特定されるのは51%とされ、一番多いとされているのは

血行性、次に外傷や整形外科手術による直接浸潤、近くの軟部組織からの感染とされる⁴⁾。本症例も男性で、病変部位で一番多い腰椎の感染であり、そこから菌血症となっている。*Veillonella*属による感染症例では1/3が感染の要因不明となっている。要因として挙げられているのは虫歯、直腸生検、食道破裂、免疫不全などである³⁾。本症例も感染の要因は不明だが、血液培養と椎体から*V. parvula*が検出され、貴重な症例であった。

参考文献

- 1) 眞島いづみ, 他: 口腔*Veillonella*属の重要性
北海道医療大学歯学雑誌, 30, 1, 87-87 2011.
- 2) H. Gouze et al : *Veillonella parvula* spondylodiscitis, *Medicine et Maladies Infectieuses* Volume49, lessue 1, , 54-58 2019.
- 3) MA Bhatti ; *Veillonella parvula* Meningitis Case Report and Review of *Veillonella* Infections 31(3) 839-840 2000.
- 4) Werner Zimmerli, M. D : Clinical practice. Vertebral osteomyelitis. *N Engl J Med*; 362(11) 1022-1029 2010.
- 5) CLSI. Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document M39-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2014.