

症例 2

Helicobacter cinaedi による蜂窩織炎，菌血症の 1 例

虎の門病院 臨床感染症部・臨床感染症科

荒岡 秀樹

症例：30 歳代 女性

主訴：1 カ月以上持続する下肢の発赤，疼痛

既往歴・家族歴：特記すべきことなし

現病歴：X 年 2 月下旬，交通事故で左大腿を軽度打撲したが，保存的治療で軽快した。X 年 5 月末，右下腿内側部分に発赤，熱感，疼痛が突然出現した。近医にて，丹毒の診断で抗菌薬を 1 カ月ほど処方継続された（詳細不明，医療機関を変更し計 3 種類を内服）が，明らかな改善を認めなかった。X 年 7 月 1 日，当院皮膚科を紹介受診した。

患者背景：常用薬：なし 薬剤・食物アレルギー：なし

機会飲酒 タバコ：1 日 10 本 デスクワークの仕事

正常月経 妊娠の可能性なし

身体所見：

身長 165cm 体重 50kg 体温 36.3℃ 脈拍 64/分 整 呼吸数 14/分

意識清明 眼瞼結膜貧血なし 口腔内異常なし
心雑音なし・呼吸音ラ音聴取せず 腹部異常なし
頸部・腋窩・鼠径リンパ節触知せず

右下腿外側・内側・足背に淡い境界不明瞭な紅斑あり 圧痛あり 熱感あり

左大腿外傷痕認めず 足白癬認めず

関節所見異常なし

検査所見：

血算 WBC 6300/ μ L (Neu 78%, Eos 1%, Mono 4%, Lym 17%), RBC 416×10^4 / μ L, Hb 13.4g/dL, PLT 15.9×10^4 / μ L

生化学 TP 7.6g/dL, Alb 4.1g/dL, LDH 125IU/L, AST 15IU/L, ALT 11IU/L, T-bil 0.8mg/dL, BUN 7mg/dL, Cr 0.6mg/dL, Na 142mEq/L, K 3.6mEq/L, Cl 106mEq/L, CK 56IU/L, CRP 0.3mg/dL

画像：Fig. 1

鑑別疾患：

* 感染症

蜂窩織炎（連鎖球菌 ブドウ球菌 抗酸菌などの細胞内寄生菌）

感染性心内膜炎 骨髄炎 筋膜炎 関節炎

* 自己免疫性疾患・膠原病

多形滲出性紅斑 Sweet 病

* 血管病変

深部静脈血栓症

* 腫瘍

悪性リンパ腫(T 細胞性) 骨髄異形性症候群

* その他

結節性紅斑 薬剤性

上記を鑑別疾患に考え，血液培養，皮膚生検，下肢血管エコー，心エコーを計画した。

追加問診：以下の情報を追加問診によって得た。皮疹部分の強い掻痒感はないが，むずむずする感じがする。

先行する感冒症状なし。

体温は測定していないが，発熱はなかったと思われる。

関節痛なし 下痢なし

ペット飼育しておらず

発赤は下肢以外にはみられていないが，6 月に入ってから，左大腿にも出現したことがあった。

6 月下旬には血管外科医を受診し，下肢エコーも施行されたが，異常なしと診断された。

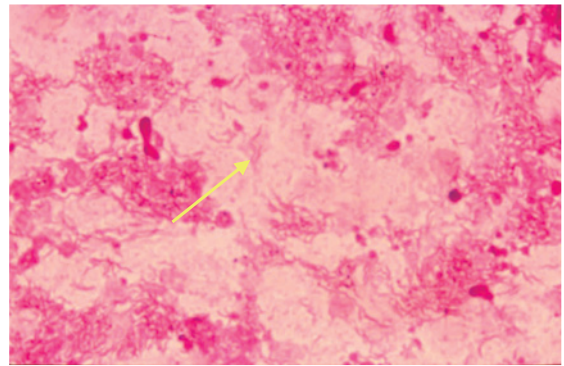
診断へのアプローチ：

診療にあたった皮膚科医は，①皮膚生検，②血液培養採取を施行し，当科へ紹介した。提出された血液培養が 4 日目に陽性となった。

Fig. 1 同一疾患 (*H. cinaedi* 蜂窩織炎, 菌血症) に罹患した別患者の下肢病変
下腿に淡い境界不明瞭の紅斑が認められた.



Fig. 2 血液培養, 培養液のグラム染色像: グラム陰性のらせん状桿菌が観察された (矢印)



血液培養のグラム染色像: Fig. 2

皮膚生検: 真皮から皮下脂肪織にかけて軽度の炎症細胞浸潤がみられる。血管・汗腺周囲にリンパ球, 形質細胞, 好酸球を認め, 通常の蜂窩織炎と比較して特記すべき特徴的な所見はみられなかった。

最終診断: グラム陰性らせん状桿菌感染症. PCRの結果と合わせて, *Helicobacter cinaedi* による菌血症, 蜂窩織炎と診断した。

その後の経過:

アモキシシリン 1回 500mg 1日3回内服で皮膚

病変は速やかに改善した。後日, 便培養からも *H. cinaedi* を検出したため, カナマイシン1回 500mg 1日4回内服を腸管滅菌目的に追加投与した。HIV抗体も含め, 検索した範囲では免疫不全は認めなかった。経過良好であり, アモキシシリンを5週投与して終了した。しかしながら, アモキシシリン内服終了2日後, 右足背に境界不明瞭な赤褐色病変があることに気づき, 外来を受診した。血液培養2セット中1セットが9日目に陽性となった。*H. cinaedi* 感染症の再燃と診断し, 2週間のアモキシシリン, その後7週間のアモキシシリン・クラブラン酸治療で治療終了, カナマイシンの腸管滅菌は計15週間施行した。その後再発を認めていない。

“本症例の疑問点” から “研究的考察” へ

疑問点

■血液培養からグラム陰性らせん状桿菌が検出されたとき、同定をどうすすめるか？

■血液培養ボトルでの検出率の違い

■*H. cinaedi* の基礎情報

■*H. cinaedi* 感染症の疫学は？

■*H. cinaedi* 感染症の臨床像は？

■再発はなぜするのか？

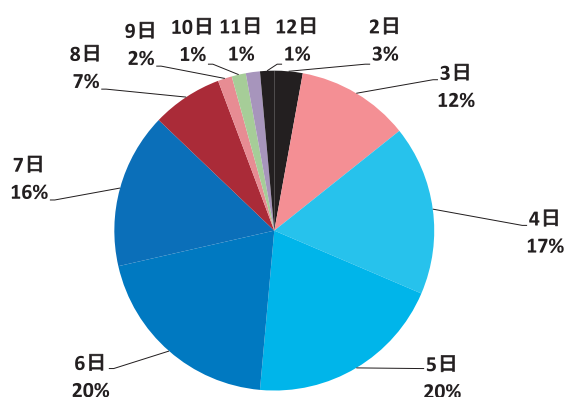
■*In vitro* での薬剤感受性・耐性は？

H. cinaedi 感染症については、まだわかっていないことも多く、これら以外にも興味深い論点がある。しかしながら、今回はこれらに絞って以下、臨床、検査、基礎のそれぞれの立場から解説していくこととする。

1. *H. cinaedi* 感染症の疫学・報告は？

H. cinaedi 感染症のほとんどは、血液培養から培養されることによって判明する。*H. cinaedi* 感染症の疫学情報は限られた報告しかない。日本における *H. cinaedi* 血流感染症の疫学としては、2003年10月から6ヶ月間、13施設で血液培養を前向きに調査した報告がなされている¹⁾。観察期間中、血液培養は16,743セット提出され、2,718セット(17.7%)が血液培養陽性、6セット(0.036%)で *H. cinaedi* が検出された。また、*H. cinaedi* が疑われた9株中3株が16S rRNA sequence analysis で *C. fetus* subsp. *fetus* と判明しており、血液培養からグラム陰性らせん状桿菌が検出されたとき、その同定が容易ではないことが示唆される。6症例は3施設から

Fig. 1 *H. cinaedi* 菌血症で血液培養ボトルが陽性となるまでの日数。39症例70株の検討では、中央値5日(範囲:2-12)であった。



分離されており、施設によってはある程度分離頻度が多いところから、全く分離されないところまで、ばらつきがあることも読み取られる。6症例は担癌患者、慢性腎不全患者など免疫不全患者であった。

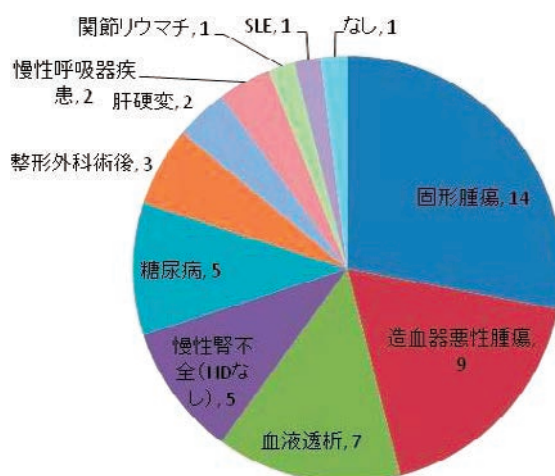
H. cinaedi 感染症の症例報告は散見されるが、まとまった報告は少ない²⁾³⁾。整形外科術後に菌血症、蜂窩織炎を同時期に発症した11症例の case series が報告されている¹⁾。この報告では2種類のクローンが院内で拡散したとしており、院内感染の原因となりうることを示唆される。

2. 虎の門病院での分離状況は？

虎の門病院において、2000年以降の血液培養データを振り返ってみると、2005年までは年間5例以下の分離であったものが2008年以降は分離数が増加しており年間10例を超えている。そこで、2009年3月から2011年11月の2年8ヶ月間の血液培養データをレトロスペクティブに検討した。研究期間内に、血液培養は32727セット提出されており、血液培養陽性例は3707セット(11.3%)、うち *H. cinaedi* が70セット(0.214%)、39症例で検出された。検出された *H. cinaedi* は *gyrB* 遺伝子で確認試験を行った³⁾。前述した多施設共同研究と比較しても、当院は *H. cinaedi* の検出頻度が高いことがわかった。

また、*H. cinaedi* 菌血症で血液培養ボトルが陽性となるまでの日数は中央値5日(範囲:2-12日)であり、通常の細菌より検出までに時間がかかること

Fig. 2 *H. cinaedi* 菌血症39症例の基礎疾患(重複あり)



が示唆された (Fig. 1). 血液培養の観察期間は通常5日~7日であるが, 特に5日で観察を終了している場合は見逃されてしまう可能性も高くなり, 少なくとも *H. cinaedi* 感染症が疑われる症例において菌の検出や同定を試みる際には, 血液培養の観察期間を延長する必要がある.

3. *H. cinaedi* 感染症の臨床像は?

研究期間に血液培養から *H. cinaedi* が検出された39症例について, 臨床像の検討をおこなった. 年齢は中央値63歳(範囲:37~88歳), 性別は男性23例, 女性16例であった. 基礎疾患は固形腫瘍が14例, 造血器腫瘍が9例, 血液透析症例が7例, 慢性腎不全(血液透析なし)が5例, 糖尿病が5例などとなっていた (Fig. 2). うち, 化学療法中の症例が17例を占め, 高度免疫不全患者に多くみられた. また, 整形外科術後の菌血症, 蜂窩織炎の症例も3例あった. なお, 今回のセミナーで取りあげた症例のように, 基礎疾患のない患者に生じた例は1例のみであり, 非常に稀なことであったことが推察される. しかし, 血液培養を採取しなければ判明しない病態であり, 健常人においても起こりうる病態である可能性もあることから, 今後症例の蓄積が期待される.

感染巣は, 蜂窩織炎16例, 腸炎3例, 嚢胞感染3例, その他2例(胆管炎疑い等)であり, 発熱のみで明らかな感染巣が判明しない症例が15例 (febrile neutropeniaを2例含む) があった. 不明熱の原因となりうる病態であることは認識しておく必要がある.

30-day case fatality rateは7.7% (3例/39例)であった.

4. 再発について

H. cinaedi 菌血症は再発が多いことが知られている⁵⁾. 当院での症例では39症例中9症例 (23%) が

抗菌薬中止後再度血液培養陽性となり再発した. 再発の機序はよくわかっておらず, 短期間の治療期間が影響している可能性や, 腸管内除菌の必要性の議論なども今後の検討課題であろう.

今回, われわれは便中における *H. cinaedi* の保菌率を調査するため, 血液培養から *H. cinaedi* が培養された症例については可能な限り便培養を実施した. 便培養は39例中25例において実施され, 12例(48%)で保菌が確認された. ほとんどの症例が, 初期治療として抗菌薬が投与されたあとの便培養であることを考え合わせると, より高率に保菌していた可能性があると推定される.

文献

- 1) Matsumoto T, Goto M, Murakami H, Tanaka T, Nishiyama H, Ono E, *et al.*: Multicenter study to evaluate bloodstream infection by *Helicobacter cinaedi* in Japan. *J Clin Microbiol.* 2007 Sep; 45 (9): 2853-7.
- 2) Murakami H, Goto M, Ono E, Sawabe E, Iwata M, Okuzumi K, *et al.*: Isolation of *Helicobacter cinaedi* from blood of an immunocompromised patient in Japan. *J Infect Chemother.* 2003 Dec; 9 (4): 344-7.
- 3) Minauchi K, Takahashi S, Sakai T, Kondo M, Shibayama K, Arakawa Y, *et al.*: The nosocomial transmission of *Helicobacter cinaedi* infections in immunocompromised patients. *Intern Med.* 2010; 49 (16): 1733-9.
- 4) Kitamura T, Kawamura Y, Ohkusu K, Masaki T, Iwashita H, Sawa T, *et al.*: *Helicobacter cinaedi* cellulitis and bacteremia in immunocompetent hosts after orthopedic surgery. *J Clin Microbiol.* 2007 Jan; 45 (1): 31-8.
- 5) Uçkay I, Garbino J, Dietrich PY, Ninet B, Rohner P, Jacomo V: Recurrent bacteremia with *Helicobacter cinaedi*: case report and review of the literature. *BMC Infect Dis.* 2006 May 23; 6: 86.

“本症例の疑問点”から“研究的考察”へ

虎の門病院臨床感染症部

馬場 勝

Helicobacter cinaedi の検査法

感染症の診断を目的とした検査では、培養検査、抗原検出、抗体測定、遺伝子検査などが利用される。*H. cinaedi* を対象とした検査の場合も、血清抗体価の測定¹⁾や遺伝子検査についての報告はあるが、それらは研究レベルの技術であり一般病院の検査室においては培養検査が最も確実な検査法である。

ここでは、*H. cinaedi* 感染症の診断と臨床研究に必要な検査法、特に培養検査の要点についてまとめる。

1. 基本となる培養条件²⁾³⁾

1) ガス濃度：通常の微好気培養条件（酸素5%、炭酸ガス10から15%、残り窒素）に5から10%の水素を加えた環境が最も発育に適しており⁴⁾、機械式のガス充填装置である Anoxomat system（セントラル科学貿易）がこれに対応している。水素を含まない簡易ガス発生袋であるアネロパック微好気（三菱ガス化学）でも十分に培養可能であるが、発育支持力に劣る。

2) 培養期間：菌の発育が遅いため、最低7日間が必要である⁵⁾。ただし、発育した菌は死滅しやすく観察の間隔は3日を超えない方が望ましい。菌株を凍結保存する場合は、発育2日以内の新鮮な株を使用すべきである。

3) 培養温度：最適な発育温度は35℃である。

4) 湿潤環境：乾燥に弱いため、培地表面の過度な乾燥は避け、湿度を保って培養する。

5) 非選択培地：羊血液寒天培地やチョコレート寒天培地に発育可能で、GAM半流動高層培地で培養した場合は、培地表面から少し下の微好気環境となった部分に薄く発育する。

6) 選択培地：*Campylobacter* 用選択培地（Skirrow, Butzler, Blaser, 等）に発育可能である。ただしCCDA培地には発育しない為、便などからの分離培養にCCDAを使うことはできない。

2. 菌の同定

グラム染色²⁾⁵⁾：培養条件によって異なるが、螺旋の数が3巻き以上の繊細で長めのグラム陰性螺旋状

桿菌として観察されることが多い。グラム染色では、後染色にサフラニンを使うハッカー変法では染色性が悪いため見逃されやすく、後染色にパイフェル液を使用するバーミー法の染色性が良い。グラム染色以外では、アクリジンオレンジ染色や生鮮標本による運動性の観察（コルクスクリー様運動）も有効とされている。

培養期間が長くなり発育環境が悪化すると、染色形態が球状化（Coccoide body）し菌は生きているが培養不可能の状態となる（Fig. 1）。

コロニー性状：透明感があり、薄くフィルム状の遊走性集落（thin spread colony）が特徴的である。ただし、使用する培地の種類や同じ培地であってもメーカーの違いにより、コロニーの厚みや外観の印象に微妙な違いがある。

また、あまりに薄く培地全面に滑らかに広がる為、一見して菌の発育に気がつかないことがあり注意が必要である。

生物学的性状²⁾³⁾：臨床検体から分離される可能性のある主要な *Campylobacter* spp. との鑑別性状を（Table 1）に示す。ただし、*H. cinaedi* の場合は42℃での発育とナリジクス酸、セファロチンに対する感受性が報告によって異なっている。

遺伝子検査：*H. cinaedi* の正確な同定を簡易同定キットなどの生物学的性状のみで行うことは困難であり、最終的な菌種の決定には遺伝子検査が必須となる。

我々の施設では、*Campylobacter* 属、*Arcobacter* 属及び *Helicobacter* 属に共通なPCR⁶⁾（23S rRNA 領域 650bp；F：TATACCGGTAAGGAGTGCTGGAG，R：ATCAATTAACCTTCGAGCACCG）及び、*H. cinaedi* に特異的なPCR⁷⁾（*gyrB* 遺伝子領域 195 bp；F：AGGGATTCCACAAAGTGAGC，R：TCTTGTCCTGTGCGTTCATC）を使い菌種の最終的な同定を行っている。

3. 血液培養

検体の採取方法において *H. cinaedi* に特有なもの

Fig. 1 バーミー法による*H. cinaedi*のグラム染色像

- a) 血液培養ボトルのグラム染色像.
- b) 血液培養ボトルの培養液を遠心集菌したもの. 菌数が少ない場合に見逃しを防ぐことが期待できる.
- c) 培養期間が長くなったコロニーからの染色像. 多くの菌が球状化 (coccoide body) している.

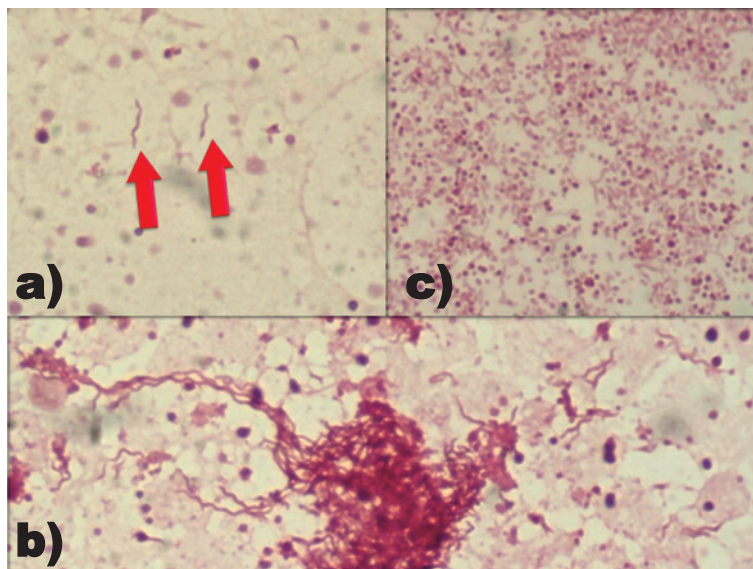


Table 1 Phenotypic of *H. cinaedi* and *Campylobacter* spp.^{2) 3)}

Organism	<i>H. cinaedi</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Growth at 25°C	-	+	-	-	-	-
42°C	- (+)	- (+)	+	+	+	+
nalidixic acid	R (S)	R	S (R)	S (R)	R	S
cephalothin	R (I)	S (R)	R	R	R	S
Hippurate hydrolysis	-	-	+ (-)	-	-	-
Indoxyl acetate hydrolysis	-	-	+	+	-	+
Catalase	+	+	+	+	+	W
Urease	-	-	-	-	V	-
Oxidase	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+
Aerobic growth	-	-	-	-	-	-

+ : positive, - : negative, W: weakly positive, R: resistant, I: Intermediate, S: susceptible, V: variable

はない。他の細菌の場合と同様に、十分量の採血を行うことが検出感度向上に有効と思われる。

*H. cinaedi*を対象とした場合の培養期間は7日間⁵⁾とされており、疑わしい検体では培養期間の延長⁷⁾(10日以上)も考慮する必要がある。当院における集計でも5日間で培養を中止した場合、約50%の症例で*H. cinaedi*偽陰性となることが確認されている。

自動機器の種類により検出感度や陽性検出までの時間に差があることは既に指摘されている。これま

での報告では、Bact/Alert (Biomérieux)では嫌気性ボトルから、Bactec (BD)では好気性ボトルから菌が検出されており、自動機器により発育可能なボトルが異なるとと思われる。

陽性となった血液培養ボトルからグラム染色を行う場合、染色性の悪い*H. cinaedi*については菌の存在を見逃してしまう可能性がある。この場合、通常のサブカルチャーでは微好気培養が必要な*H. cinaedi*は発育せず、血液培養陰性と誤判定される危険がある。当院では好気性ボトル陽性(当院では

Bactec を採用) かつ染色で菌が確認できない場合、通常のサブカルチャーに加え微好気培養 (35℃) と GAM 半流動高層培地 (35℃) を追加しており、この方法で見逃しを防ぐことができた症例を経験している。

4. 便からの分離培養の試み

多くの常在菌が存在する便からの分離培養には、優れた選択分離培地を使用することが必要である。CCDA 培地とその変法培地を除いて³⁾、*Campylobacter* 用選択培地として市販されている培地のほとんどに *H. cinaedi* の発育が可能である。ただし、*H. cinaedi* に対する発育支持力と雑菌の抑制力は培地ごとに優劣があり、当院では変法スキロー培地 EX (日水製薬) を使用して良好な成績を得ている。培養温度は 35℃ で高湿度を保ち微好気培養を行う。経験上 4 日目以降に発育してくることが多く 2 日毎に観察し、7 日間の培養を行う。

5. 今後の課題

これまでに報告された症例には、血液検体から *H. cinaedi* が培養法で証明されたものが多い。

血液以外の検体種については、便からの分離報告が少数あるものの、その他の部位からの分離報告例は少なく、血液以外の検体での検査の意義は定まっていない。

遺伝子検査、抗体測定など培養法以外の方法も含めた検査法の評価と、検体種の適応条件については、今後検討すべき課題といえる。

文献

- 1) Iwashita H, Fujii S, Kawamura Y, Okamoto T, Sawa T, Masaki T, *et al.* : Identification of the major antigenic protein of *Helicobacter cinaedi* and its immunogenicity in humans with *H. cinaedi* infections. *Clin Vaccine Immunol.* 2008 ; 15 (3) : 513—21.
- 2) Nachamkin I : Algorithms for identification of Curved and Spiral-Shaped Gram-Negative Rods in. Fitzgerald C, Nachamkin I. *Campylobacter and Arcobacter in.* Lawson AJ. *Helicobacter in :* Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, ed. *Manual of clinical microbiology.* American Society for Microbiology, Washington DC, 2011 ; p. 881—915.
- 3) 田中孝志, 後藤美江子, 奥住捷子, 米山彰子, 松本哲哉, 山口恵三, 他 : 血液培養からの *Helicobacter cinaedi* 及びその類縁菌の分離培養と簡便同定法に関する検討. *感染症学雑誌* 2007 ; 81 : 700—6.
- 4) 平井義一, 下村裕史, 林 俊治, 横田憲治, 小熊恵二 : 腸肝ヘリコバクター感染症と疾患, *H. cinaedi*, *H. fennelliae*, *H. pullorum* の性状と病原性. *臨床と微生物* 2005 ; 32 : 175—80.
- 5) 松本哲哉, 満田年宏 (翻訳) : CUMITECH 血液培養検査ガイドライン, 医歯薬出版, 東京, 2007 ; p. 54.
- 6) Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, *et al.* : Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J Clin Microbiol.* 2002 ; 40 (12) : 4744—7
- 7) Minauchi K, Takahashi S, Sakai T, Kondo M, Shibayama K, Arakawa Y, *et al.* : The nosocomial transmission of *Helicobacter cinaedi* infections in immunocompromised patients. *Intern Med.* 2010 ; 49 (16) : 1733—9.

“本症例の疑問点”から“研究的考察”へ

愛知学院大学薬学部微生物学講座

河村 好章

1. *Helicobacter cinaedi* の基礎情報

本菌は1980年代にホモセクシャルな男性の直腸から見出されCampylobacter Like Organism (CLO-1a, -1b group)とされていた菌群に端を発する¹⁾。その後1985年に*Campylobacter cinaedi*と分類されたが、1991年に*Helicobacter*属に移籍された²⁾。*Helicobacter*属には現在33菌種が知られているが、ヒトから分離報告のあるものは7菌種のみである。Gastric *Helicobacter* species (胃在位菌種)としては*Helicobacter pylori*のみが報告されている。残りの6菌種 (*H. cinaedi*, *H. bilis*, *H. canadensis*, *H. canis*, *H. fennelliae*, *H. pullorum*)はEnterohepatic *Helicobacter* species (腸肝在位菌種)である。

何らかの基礎疾患により免疫機能が低下した患者の腸管や肝臓、血液から本菌の分離報告が散見される³⁾⁴⁾が、近年は、明らかな基礎疾患の無い患者や1つの医療施設内で免疫機能低下の有無に関わらず多くの患者で連続的に検出された事例も報告されている^{5)~7)}。

日本では、2003年に初めて分離報告がされている⁸⁾。我々の手元には2004年頃より本菌感染症疑いの分離株が集まりはじめ、現在までに我々が知り得ただけでも北海道から九州までの12都道府県37施設から200株以上を収集している。男性女性を問わず新生児から高齢者(～81歳)まで広範囲の患者から分離されている。

本菌は多くの場合、蜂窩織炎や直腸炎などの症状から血液培養を実施し、検出に至るケースが多い。この際に重要になるのが、多くの医療施設で使用されている自動血液培養システムでの本菌検出能である。現在多くの医療施設では、Bact/Alert (Biomérieux)あるいはBactec (BD)のいずれかのシステムが使われている。本菌の検出例についてはBact/Alertはごく少数であり、ほとんどの検出報告はBactecによるものである。しかし陽性検知に至るまでに5～7日、場合によっては10日間以上の培養が必要であり、5日程度で培養を中止してしまうと本菌の存在を見逃すことに繋がりがかねない。近年、第3の自動血液培養システムともいえるVersaTREK (Kojinbio)が日本の医療現場にも導入され始めた。本菌の検出時間を測定してみると、100～

10CFU程度の菌を接種した場合、Bactecで109～160時間(4.5～6.7日)、VersaTREKで53～60時間(2.2～2.5日)、で陽性検知となり、VersaTREKは迅速に本菌を検出できるシステムであると考えられる。

本菌のもう1つの特徴として“人獣共通感染症”と考えられている点が挙げられる。本菌はこれまでヒト以外にも、イヌやネコ、ハムスター、ラットなどからの分離が報告されている⁹⁾。またヒトの疾患の感染源としてペットを指摘する論文報告¹⁰⁾もあるが、患者とそのペットの両方から*H. cinaedi*が分離できたとする報告は一例もない。一方、ヒトと動物由来の*H. cinaedi*菌株はやや形質が異なるのではないかとする報告もある¹¹⁾。我々は介護施設でアニマルセラピー犬としてヒトと濃厚に接している犬から分離し*H. cinaedi*であると同定した菌株とヒト由来株を詳細に比較したところ、DNA相同試験など菌種の定義に直接関わる指標において、犬由来株はヒト由来株とは異なり、新分類群であることを見出した。全ての動物株がこの新分類群に相当するとは言えないが、単純に“人獣共通感染症である”、“感染源は動物である”と断定せず精査することが必要であると考えている。

2. 病原性と再発について

本菌の病原因子については、Cdt(cytolethal distending toxin;細胞致死性膨化毒素)が知られている¹²⁾。この毒素は真核細胞において細胞周期の停止とアポトーシスを誘導する。つまり宿主細胞に致死的に働く毒素である。本菌の病原因子については長らく本毒素しか知られていなかったが、2012年になりAhpC(alkyl hydroperoxidase reductase;アルキルヒドロペルオキシド還元酵素)という新たな因子が見いだされた¹³⁾。これは、グルタチオン代謝酵素の1つで、*H. cinaedi*はこの因子を使い、酸化ストレスから菌体を守り、宿主への定着に有利に働くと考えられている因子である。

これまでに知られている病原性に関わる因子は上述の2つしかない。これは本菌のゲノム全体の情報が明らかにされていないことが原因の1つと考えられる。そこで我々は*H. cinaedi*の全染色体DNAを

明らかにした¹⁴⁾。その結果、新たに本菌には T6SS (Type IV secretion system; 6 型分泌機構) が存在していることを見出した。T6SS は 3, 4 型分泌機構と同様にニードル構造を持ち、宿主細胞にエフェクター分子を注入して、その生理機構を攪乱することが知られている¹⁵⁾。本菌の類縁菌種である *Helicobacter hepaticus* (マウス腸管に生息) では、T6SS を使い、宿主の炎症反応を抑制して、自身が定着するのに有利に働いているというモデルが提唱されている¹⁶⁾。本菌が T6SS を使い、どのような攪乱作用を発揮しているかは未だ不明だが、*H. hepaticus* と同様に定着、さらには再発にも関与しているのではないかと推察している。

本菌感染症の疾患としては、発熱、敗血症・菌血症、蜂窩織炎などの皮膚疾患、直腸炎などの消化器疾患などが知られているが、新たな疾患の可能性として心房性不整脈およびアテローム性動脈硬化症が見出されている¹⁷⁾。

3. 薬剤感受性

本菌は遊走性が強く、多くの場合平板培地全体に一面に発育する。そのため Disk 法や E-test などの阻止円形成法では、薬剤感受性を測定できない場合が多い。また Microtiter tray 中では液体培養できないと明言した論文¹⁸⁾ などもあり、これまで本菌の薬剤感受性は寒天希釈法が常法として報告されてきた¹⁰⁾¹⁹⁾。しかし寒天希釈法は、煩雑な培地調整に加え保存性に問題があり、臨床現場で日常的に使うのは現実的でない。そこで我々は本菌の培養及び薬剤感受性に適する培地の選定を行い、微量液体希釈法を開発した。各種抗菌薬に対する MIC を測定したところ、カルバペネム、アミノグリコシド、テトラサイクリン系の薬剤は非常に低い MIC 値を示した。エリスロマイシン系については古くから耐性が知られており、クラリスロマイシンでも高 MIC 値を示した。またニューキノロンについては日本で分離された菌株は例外なく *gyrA* 遺伝子の QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) に 1~2 個の point mutation が入っており、全株耐性傾向を示した。外国の分離株は、これほど高頻度にキノロン耐性株は見つかっていないが、CDC の報告によれば、キノロン薬使用により再発を招くので使用すべきではない、との指摘がすでに 1994 年にされている。また 10 日以内の短期的な治療よりも、2~6 週間の長期的な治療が好ましいとの記述もある²⁰⁾。

何れにしても、治療戦略、MIC 測定値と臨床での相関 (Break point) などについては、まだ不明

であり、今後データの蓄積が待たれる。

4. 今後

本菌は、その分類が確定してから歴史が浅く、研究成果が十分に蓄積しているとは言えず、不明な点が多い。また検出や培養に一定の技術・経験が必要なことから、多くの医療施設では本菌を見過ごしているのではないかと危惧している。本菌による感染症には致死的な疾患は知られていないが、動脈硬化などの慢性疾患にも関連があること、再発例が多く見られること²¹⁾ などから、今後一層注視すべき病原菌であると考えている。

なお、我々が知る限り、本菌による感染症患者在連続的に発生した事例では、トイレ等の改修工事を施した事例も含めて、完全な除菌に成功した例は一例も無い。

文献

- 1) Totten PA, Fennell CL, Tenover FC, Wezenberg JM, Perine PL, Stamm WE, *et al.* : *Campylobacter cinaedi* (sp. nov.) and *Campylobacter fennelliae* (sp. nov.) : two new *Campylobacter* species associated with enteric disease in homosexual men. *J Infect Dis.* 1985 ; 151 : 131—9.
- 2) Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R, *et al.* : Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy : emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1991 ; 41 : 88—103.
- 3) Burman WJ, Cohn DL, Reves RR, Wilson ML : Multifocal cellulitis and monoarticular arthritis as manifestations of *Helicobacter cinaedi* bacteremia. *Clin Infect Dis.* 1995 ; 20 : 564—70.
- 4) Simons E, Spacek LA, Lederman HM, Winkelstein JA : *Helicobacter cinaedi* bacteremia presenting as macules in an afebrile patient with X-linked agammaglobulinemia. *Infection.* 2004 ; 32 : 367—8.
- 5) Matsumoto T, Goto M, Murakami H, Tanaka T, Nishiyama H, Ono E, *et al.* : Multicenter study to evaluate bloodstream infection by *Helicobacter cinaedi* in Japan. *J Clin Microbiol.* 2007 ; 45 : 2853—7.
- 6) Kitamura T, Kawamura Y, Ohkusu K, Masaki T, Iwashita H, Sawa T, *et al.* : *Helicobacter cinaedi* cellulitis and bacteremia in immunocompetent hosts after orthopedic surgery. *J Clin Microbiol.* 2007 ; 45 : 31—8.
- 7) Minauchi K, Takahashi S, Sakai T, Kondo M, Shibayama K, Arakawa Y, *et al.* : The nosocomial transmission of *Helicobacter cinaedi* infections in immunocompromised patients. *Intern*

- Med. 2010 ; 49 : 1733—9.
- 8) Murakami H, Goto M, Ono E, Sawabe E, Iwata M, Okuzumi K, *et al.* : Isolation of *Helicobacter cinaedi* from blood of an immunocompromised patient in Japan. *J Infect Chemother.* 2003 ; 9 : 344—7.
 - 9) Fox JG : The non-*H pylori* helicobacters : their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut.* 2002 ; 50 : 273—83.
 - 10) Orlicek SL, Welch DF, Kuhls TL : Septicemia and meningitis caused by *Helicobacter cinaedi* in a neonate. *Clin Microbiol.* 1993 ; 31 : 569—71.
 - 11) Kiehlbauch JA, Brenner DJ, Cameron DN, Steigerwalt AG, Makowski JM, Baker CN, *et al.* : Genotypic and phenotypic characterization of *Helicobacter cinaedi* and *Helicobacter fennelliae* strains isolated from humans and animals. *J Clin Microbiol.* 1995 ; 33 : 2940—7.
 - 12) Taylor NS, Ge Z, Shen Z, Dewhirst FE, Fox JG : Cytolethal distending toxin : a potential virulence factor for *Helicobacter cinaedi*. *J Infect Dis.* 2003 ; 188 : 1892—7.
 - 13) Charoenlap N, Shen Z, McBee ME, Muthupalani S, Wogan GN, Fox JG, *et al.* : Alkyl hydroperoxide reductase is required for *Helicobacter cinaedi* intestinal colonization and survival under oxidative stress in BALB/c and BALB/c interleukin-10^{-/-} mice. *Infect Immun.* 2012 ; 80 : 921—8.
 - 14) Goto T, Ogura Y, Hirakawa H, Tomida J, Morita Y, Akaike T, *et al.* : Complete Genome sequence of *Helicobacter cinaedi* strain PAGU611, isolated in a case of human bacteremia. *J Bacteriol.* 2012 ; 194 : 3744—5.
 - 15) Filloux A, Hachani A, Bleves S : The bacterial type VI secretion machine : yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology.* 2008 ; 154 : 1570—83.
 - 16) Chow J, Mazmanian SK : A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. *Cell Host Microbe.* 2010 ; 7 : 265—76.
 - 17) Khan S, Okamoto T, Enomoto K, Sakashita N, Oyama K, Fujii S, *et al.* : Potential association of *Helicobacter cinaedi* with atrial arrhythmias and atherosclerosis. *Microbiol Immunol.* 2012 ; 56 : 145—54.
 - 18) Sacks LV, Labriola AM, Gill VJ, Gordin FM : Use of ciprofloxacin for successful eradication of bacteremia due to *Campylobacter cinaedi* in a human immunodeficiency virus-infected person. *Rev Infect Dis.* 1991 ; 13 : 1066—8.
 - 19) Flores BM, Fennell CL, Holmes KK, Stamm WE : In vitro susceptibilities of *Campylobacter*-like organisms to twenty antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985 ; 28 : 188—91.
 - 20) Kiehlbauch JA, Tauxe RV, Baker CN, Wachsmuth IK : *Helicobacter cinaedi*-associated bacteremia and cellulitis in immunocompromised patients. *Ann Intern Med.* 1994 ; 121 : 90—3.
 - 21) Uçkay I, Garbino J, Dietrich PY, Ninet B, Rohner P, Jacomo V : Recurrent bacteremia with *Helicobacter cinaedi* : case report and review of the literature. *BMC Infect Dis.* 2006 ; 6 : 86.

CASE REPORT

Hinako Murakami · Mieko Goto · Emi Ono
Etsuko Sawabe · Morihiro Iwata · Katsuko Okuzumi
Keizo Yamaguchi · Takashi Takahashi

Isolation of *Helicobacter cinaedi* from blood of an immunocompromised patient in Japan

Received: March 20, 2003 / Accepted: July 4, 2003

Abstract We report the isolation of *Helicobacter cinaedi* (previously called “*Campylobacter*-like organism”) from the blood of an immunosuppressed Japanese patient receiving immunosuppressive therapy after renal transplantation. The identification of *H. cinaedi* was based on the findings of microscopic examinations, biochemical properties, and *16S rRNA* gene nucleotide sequences. *H. cinaedi* bacteremia should be considered as one of the critical infectious diseases in immunocompromised patients, and the sequencing of *16S rRNA* may be a useful method to confirm the identification of this organism.

Key words *Helicobacter cinaedi* · Bacteremia · Immunocompromised patients · *16S rRNA*

M. Murakami · M. Iwata
Department of Laboratory Medicine, Omori Hospital, Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan

M. Goto · T. Takahashi
Division of Infectious Diseases, Advanced Clinical Research Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan

E. Ono
Department of Laboratory Medicine, Nakano General Hospital, Tokyo, Japan

E. Sawabe
Department of Clinical Laboratory, Tokyo Medical and Dental University Hospital, Tokyo, Japan

K. Okuzumi
Department of Central Laboratory, University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan

K. Yamaguchi
Department of Microbiology, Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan

T. Takahashi (✉)
Department of General Medicine, Kanazawa Medical University, 1-1 Daigaku, Uchinada-machi, Ishikawa 920-0293, Japan
Tel. +81-76-286-2211(ext. 3846); Fax +81-76-286-2702
e-mail: taka2si@kanazawa-med.ac.jp

Introduction

In 1984, several species of *Campylobacter*-like organisms were isolated from stool in homosexual men complaining of diarrhea.¹ The predominant organism was isolated from 8% to 11% of homosexual men with and without diarrhea, while it was not observed in stool cultures from heterosexual men and women. This pathogen was named *Campylobacter cinaedi* according to the Latin term “*cinaedi*” meaning “of a homosexual”. The bacterium was reclassified in the *Helicobacter* genus based on further epidemiological study.²

H. cinaedi is also responsible for bacteremia complicated with arthritis or cellulitis. Most cases of *H. cinaedi* bacteremia have occurred in HIV-infected homosexual men or in patients with immunosuppressed status, including those with malignancies, immunosuppressive treatment, or alcoholism; or in neonates or during pregnancy.^{3–6} In addition, *H. cinaedi* bacteremia and septic arthritis have recently been described in an immunocompetent patient.⁷

We report here the isolation, and identification, of *H. cinaedi* from the blood of an immunosuppressed Japanese patient receiving immunosuppressive therapy after renal transplantation.

Case report

A 27-year-old man receiving immunosuppressive therapy (tacrolimus, 2 mg/day; methylprednisolone, 4 mg/day; and mycophenolate, 1500 mg/day) after renal transplantation, who had high-grade fever (39°C) without gastrointestinal symptoms including diarrhea, visited a hospital as an outpatient in October 2002. Neither cellulitis nor arthritis were observed on physical examinations. Laboratory data revealed a white blood cell count of 9100 cells/mm³ and an elevated C-reactive protein (CRP) level (5.2 mg/dl). Details of his sexual partners or orientation, HIV serology, and possible contact with animals were unclear. The patient had

Fig. 1. There was a bipolar flagellum (arrows) in the specimen subcultured from the blood culture bottle. Flagellar staining, $\times 1000$

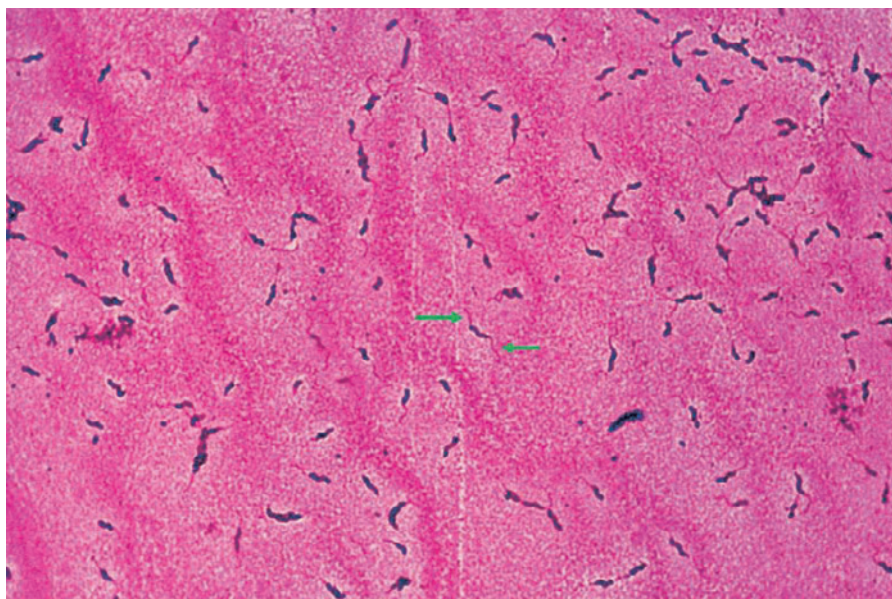


Table 1. Characteristics of clinical isolates of *Helicobacter cinaedi*, *H. pylori*, and *H. fennelliae*

	Patient isolate	<i>H. cinaedi</i>	<i>H. pylori</i>	<i>H. fennelliae</i>
Growth under microaerophilic conditions ^a				
At 25°C	Negative	Negative	Negative	Negative
At 35°C	Positive	Positive	Positive	Positive
At 42°C	Negative	Negative	Negative	Negative
Motility	Positive	Positive	Positive	Positive
Biochemical properties				
Oxidase	Positive	Positive	Positive	Positive
Catalase	Positive	Positive	Positive	Positive
Nitrate reductase	Positive	Positive	Negative	Negative
Urease	Negative	Negative	Positive	Negative
Hippurate hydrolysis	Negative	Negative	Negative	Negative

^aGrowth was examined on a blood agar plate subcultured from a blood culture bottle. The properties of *H. cinaedi*, *H. pylori*, and *H. fennelliae* were obtained from reference numbers 5, 9, and 10, respectively

already taken medication for active duodenal ulcer, in July 2001, and follow-up examinations of upper gastrointestinal endoscopy showed chronic gastritis and reflux esophagitis. Blood culture, using an automated blood culture system, the BACTEC 9120 (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, MD, USA), was immediately started, because of the suspicion of bacteremia.

A positive signal from the BD BACTEC PLUS Aerobic/F blood culture bottle was seen 5 days after the start of culture, and microscopic examination with Gram staining revealed a spiral Gram-negative bacterium similar to *Campylobacter* species. Subculture from the positive blood bottle yielded growth on a blood agar plate after incubation under microaerophilic conditions at 35°C, but no growth was shown at 25°C or 42°C. The growth on the agar plate showed the same helical Gram-negative organism as the sample from the subcultured plate. An unstained fresh preparation from the subcultured specimen showed motility

of the organism, and a bipolar flagellum was confirmed by flagellar staining, as described previously⁸ (Fig. 1). Biochemical test results with the subcultured sample (Table 1) revealed the bacterium to be oxidase-positive, catalase-positive, and nitrate reductase-positive, but urease and hippurate hydrolysis were negative. These biochemical data suggested the organism to be *H. cinaedi*.^{5,9,10}

The patient received a single dose of piperacillin (2 g), followed by cefcapene pivoxil at 300 mg/day for 5 days. Then he became afebrile, and showed significant reduction of the CRP level (1.7 mg/dl). The CRP values were decreased to within normal limits (0.0–0.2 mg/dl) after completion of the subsequent administration of levofloxacin (300 mg/day) for 3 days. The sequential treatments were eventually successful, and no recurrence of bacteremia has been found as at April 2003. The clinical isolate was confirmed as *H. cinaedi* based on the data for 16S rRNA nucleotide sequence homology (see below).

Sequencing of *16S rRNA*

A sample, collected from the colonies on the blood agar plate subcultured from the blood culture bottle of the patient, was suspended in 500 µl of phosphate-buffered saline, and the pellet obtained after centrifugation at 7000 rpm for 10 min was resuspended in 180 µl of ATL-buffer. Nucleic acids were extracted according to the protocol for the isolation of genomic DNA from bacterial cultures of the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Fragments of the *16S rRNA* gene (rDNA) were amplified by polymerase chain reaction (PCR), using a set consisting of *Helicobacter* genus-specific primers (C97: sense; 5'-GCTATGACGGGTATCC-3' and C05: antisense; 5'-ACTTCACCCCAGTCGCTG-3').¹¹ The PCR reaction mixture contained template DNA, PCR buffer, 0.2 µM (each) PCR primers (C97 and C05), 0.2 mM (each) deoxynucleoside triphosphate, and 2.5 U of *Ex-Taq* DNA polymerase (Takara Shuzo, Shiga, Japan) in a total volume of 100 µl. After initial denaturation for 5 min at 94°C, 40 cycles of denaturation (94°C, 30 s), annealing (50°C, 1 min), and extension (72°C, 2 min) were performed. The reaction mixture was kept at 72°C for 8 min for the final extension. The PCR reactions were performed independently at least twice to confirm reproducibility. In order to avoid contamination in the PCR reactions, mixture preparation and template DNA addition were done in a separate room. A negative control without template DNA was always included. The PCR products were electrophoresed through a 1.2% agarose gel containing 0.5 µg/ml of ethidium bromide, and bands with the expected size (1200 base pairs) were visualized with UV light, excised, and purified with a Gel Extraction Kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. The purified PCR products were directly sequenced with an automated sequencer (ABI PRISM 377 DNA Sequencer; Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA), using a Prism Ready Reaction Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer). We sequenced both strands of the *16S rRNA* gene with a primer set of C97 (sense) and C05 (antisense)¹¹ at least twice in order to avoid sequence errors. The sequence of the *16S rRNA* gene was aligned using Genetyx-Mac version 8.0 (Software Development, Tokyo, Japan).

By comparing the *16S rRNA* sequence of the clinical isolate with that of *H. cinaedi* in the GenBank database (accession number, AF396080), homology of 99.2% for the patient isolate was obtained with the AF396080 sequence.

Discussion

H. cinaedi is an uncommon pathogen causing gastroenteritis and bacteremia in immunocompromised subjects with HIV infection or those receiving immunosuppressive therapy. The clinical features of *H. cinaedi* infection are reported to be a relatively mild, low-grade fever, with or without gastrointestinal symptoms and associated cellulitis or skin lesions.^{3,12} In our patient, neither gastrointestinal symptoms

(including diarrhea) non skin lesions were prominent features during the clinical course, and this organism was not isolated from the patient's stool.

H. cinaedi can be difficult to culture and identify. This pathogen is fastidious, and slow growing, and it needs a microaerophilic environment for optimum growth. In fact, 5 to 7 days were required to detect the organism with an automated blood culture system.³ Moreover, laboratories do not routinely employ a microaerophilic environment to incubate plates subcultured from blood culture bottles, unless *Campylobacter*-like organisms are suspected. Several reports failed to demonstrate organisms such as *H. cinaedi* and *H. fennelliae* on Gram-stained smears prepared from blood cultures.^{13,14} Some currently available biochemical tests were reported to be unable to conclusively identify or distinguish *H. cinaedi* from other fastidious *Campylobacter* species or *Helicobacter* species.⁶ Therefore, we consider that *H. cinaedi* may be misidentified by using automated blood culture systems, and that an increased awareness of this pathogen and its characteristics would lead to the adequate diagnosis of *H. cinaedi* infection in the future. The *16S rRNA* sequencing presented in our report, or a DNA-DNA hybridization method with a DNA probe derived from the *H. cinaedi* type strain, could confirm clinical isolates as this pathogen, although different standard strains, including *Campylobacter* species, *Arcobacter* species, and other *Helicobacter* species, as well as *H. cinaedi*, would need to be obtained for a DNA-DNA hybridization study.⁶

Considering the wide distribution of cases around the world,^{6,7,9} there could have been undiagnosed patients in Japan. Pena et al.¹⁵ have recently reported that the *16S rRNA* gene derived from *H. cinaedi* was detected in 2 (1.6%) of 126 human urease-negative gastric biopsy specimens. The environmental reservoirs and epidemiology of this pathogen have yet to be demonstrated. Molecular epidemiological methods using restriction fragment-length polymorphism or sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis⁶ may show the sources, the modes of transmission, and the host-parasite interactions of this organism. Epidemiological studies should also be conducted in Japan when more isolates of *H. cinaedi* are accumulated.

Acknowledgments This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

References

1. Quinn TC, Goodell SE, Fennell C, Wang SP, Schuffler MD, Holmes KK, et al. Infections with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter*-like organisms in homosexual men. *Ann Intern Med* 1984;101:187-92.
2. Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R, et al. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:88-103.
3. Burman WJ, Cohn DL, Reves RR, Wilson ML. Multifocal cellulitis and monoarticular arthritis as manifestations of *Helicobacter cinaedi* bacteremia. *Clin Infect Dis* 1995;20:564-70.

4. Kiehlbauch JA, Brenner DJ, Cameron DN, Steigerwalt AG, Makowski JM, Baker CN, et al. Genotypic and phenotypic characterization of *Helicobacter cinaedi* and *Helicobacter fennelliae* strains isolated from humans and animals. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2940-7.
5. Orlicek SL, Welch DF, Kuhls TL. Septicemia and meningitis caused by *Helicobacter cinaedi* in a neonate. *J Clin Microbiol* 1993; 31:569-71.
6. Tee W, Street AC, Spelman D, Munckhof W, Mijch A. *Helicobacter cinaedi* bacteremia: varied clinical manifestations in three homosexual males. *Scand J Infect Dis* 1996;28:199-203.
7. Lasry S, Simon J, Marais A, Pouchot J, Vinceneux P, Boussougant Y. *Helicobacter cinaedi* septic arthritis and bacteremia in an immunocompetent patient. *Clin Infect Dis* 2000;31:201-2.
8. Kodaka H, Armfield AY, Lombard GL, Dowell VR Jr. Practical procedure for demonstrating bacterial flagella. *J Clin Microbiol* 1982;16:948-52.
9. Vandamme P, Harrington C, Jalava K, On SLW. Misidentifying *Helicobacters*: the *Helicobacter cinaedi* example. *J Clin Microbiol* 2000;38:2261-6.
10. Cuccherini B, Chua K, Gill V, Weir S, Wray B, Stewart D, et al. Bacteremia and skin/bone infections in two patients with X-linked agammaglobulinemia caused by an unusual organism related to *Flexispira/Helicobacter* species. *Clin Immunol* 2000;97: 121-9.
11. Harper CMG, Xu S, Feng Y, Dunn JL, Taylor NS, Dewhirst FE, et al. Identification of novel *Helicobacter* spp. from a beluga whale. *J Clin Microbiol* 2002;68:2040-3.
12. Kiehlbauch JA, Tauxe RV, Baker CN, Wachsmuth IK. *Helicobacter cinaedi*-associated bacteremia and cellulitis in immunocompromised patients. *Ann Intern Med* 1994;121:90-3.
13. Cimolai N, Gill MJ, Jones A, Flores B, Stamm WE, Laurie W, et al. "*Campylobacter cinaedi*" bacteremia: case report and laboratory findings. *J Clin Microbiol* 1987;25:942-3.
14. Ng VL, Hadley WK, Fennell CL, Flores B, Stamm WE. Successive bacteremia with "*Campylobacter cinaedi*" and "*Campylobacter fennelliae*" in a bisexual male. *J Clin Microbiol* 1987;25:2008-9.
15. Pena JA, McNeil K, Fox JG, Versalovic J. Molecular evidence of *Helicobacter cinaedi* organisms in human gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 2002;40:1511-3.

血液培養からの *Helicobacter cinaedi* 及びその類縁菌の分離培養と 簡便同定法に関する検討

¹⁾ 帝京大学医学部附属病院中央検査部, ²⁾ 東京大学医学部附属病院感染制御部, ³⁾ 獨協医科大学病院
感染総合対策部感染防止対策課, ⁴⁾ 虎の門病院臨床感染症部, ⁵⁾ 東京医科大学微生物学講座,

⁶⁾ 東邦大学医学部微生物感染症学講座, ⁷⁾ 金沢医科大学病院総合診療科

田中 孝志¹⁾ 後藤美江子²⁾ 奥住 捷子³⁾ 米山 彰子⁴⁾
松本 哲哉⁵⁾ 山口 恵三⁶⁾ 高橋 孝⁷⁾

(平成 19 年 4 月 23 日受付)

(平成 19 年 7 月 25 日受理)

Key words: *Helicobacter cinaedi*, phenotype, blood culture

要 旨

Helicobacter cinaedi は、本邦でも免疫不全患者からの分離例が報告されている。今回、専門機関の解析で *H. cinaedi* と同定された国内分離 28 株の微生物検査手順の調査と分離菌を用いて、本菌種の分離培養の特徴と日常検査で可能な簡便同定法を検討した。

分離例は全自動血液培養装置 BACTEC システムの好気ボトルで 4-9 日の培養後に陽性シグナルを示した。培養液のグラム染色所見は、3 巻以上の繊細な長めのグラム陰性螺旋菌を呈した。培養液の継代培養は陽性シグナル後、直ちに 5% 血液寒天培地などにて培養容器内を湿潤にした 35°C の微好気培養を行うことが重要であり、3-4 日後に thin spread colony の集落が見られることが特徴であった。

簡便な同定試験として、全株で硝酸塩還元試験陽性、インドキシル酢酸加水分解試験とウレアーゼ産生試験が陰性を示し、有用性が示された。アルカリフォスファターゼ産生試験、温度発育試験、1% グリシン抵抗性試験は判断上参考となる検査法であった。簡易同定キットのアピヘリコでは *H. cinaedi* 推定同定のプロファイルが得られた。

以上より、*H. cinaedi* とその類縁菌の判別推定同定として、微好気培養下で特徴的な thin spread colony を示す点や今回検討した簡便な同定試験項目結果及びアピヘリコによるプロファイルを用いることの有用性が示唆される。

[感染症誌 81 : 700~706, 2007]

序 文

Helicobacter 属は現在 23 菌種に分類されており、*Helicobacter cinaedi* とその類縁菌はハムスターなどのげっ歯類・ネコ・イヌ・ヒトなどさまざまな動物の腸管から分離され¹⁾²⁾、いわゆる 'Enterohepatic Helicobacter' に含まれる。諸外国では、HIV 感染者・肝疾患などの基礎疾患を有する免疫不全患者の血液や便などの臨床検体からの分離例が報告されており³⁾⁻⁵⁾、本邦でも近年免疫能健全な症例も含めて報告されてきている⁶⁾⁻⁸⁾。それ故、診療現場においては、*H. cinaedi* の分離同定の確立が待たれている。しかし、本菌種およ

び類縁菌の分離培養や同定検査は困難である。分離培養では菌が死滅しやすく、菌の発育には微好気環境と数日間を必要とし、特徴的な遊走性を示すため、培地上的集落の確認が困難で見逃されやすい。同定試験は日常検査で可能な検査手順がまだ確立されておらず、専門機関で菌の形態や様々な生物学的性状試験・蛋白質の電気泳動プロファイル・ガスクロマトグラフィによる脂肪酸プロファイル・16S rRNA 遺伝子の塩基配列の決定などを行い、種々の結果を総合して菌種が決定されている⁹⁾。本菌種の誤同定も報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。

今回、我々は、国内で血液培養検査から分離され専門機関の⁹⁾精査で *H. cinaedi* と同定された 28 株を対象として、菌検出陽性となった微生物検査手順の調査と

別刷請求先：(〒920-0293) 石川県河北郡内灘町大学 1-1
金沢医科大学病院総合診療科 高橋 孝

それらの分離株を用いて、わが国で使用されている微好気培養用のシステムと数種類の培地の組み合わせで本菌種の発育性および遊走性について比較検討した。同時に嫌気性用の半流動培地での保存性を検討した。また、臨床検査室において、*H. cinaedi*の推定同定と類縁菌との鑑別を目的として、有用となる従来の生物学的性状試験およびキットを用いた同定試験の検討を試みたので報告する。

対象と方法

1. 対象と使用菌株

平成12年10月から平成16年4月までの期間に都内5施設から分離され、宮崎大学農学部獣医公衆衛生学三澤尚明博士のもとで、種々の性状試験、16 S r RNA 遺伝子の塩基配列決定や電子顕微鏡学的所見にて、*H. cinaedi*と確定された28株を対象とした。この28株の微生物検査手順を調査し、本菌種の分離培養上の特徴を解析した。

各種試験用の対照菌株として標準菌株10株 (*H. cinaedi* ATCC BAA-847, *H. fennelliae* ATCC 35683, *H. pylori* ATCC 43504, *H. canadensis* ATCC 70968, *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 33560, *C. fetus* ATCC 15296, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19139, *Proteus vulgaris* ATCC 19132, *Haemophilus influenzae* ATCC 49247)を用いた。これらは、各種同定検査法において陽性および陰性対照として使用されるものである。

菌はそれぞれの菌種に適切な培養条件にて純培養し、新鮮分離培養菌を使用した。

2. 微好気性培養環境の検討

臨床分離株2株 (CL-1, CL-2)と標準菌株 *H. cinaedi* BAA-847を使用し、3種類の微好気培養システムにおける血液寒天培地 (トリプチケースイ II5% ヒツジ血液寒天培地: 日本ベクトンディッキンソン以下BD) とチョコレート寒天培地 (チョコレート II 寒天培地: BD) での発育性をみた。分離株 CL-1 及び CL-2 は、最も発育が旺盛で菌の収量が多い株として選択された。

微好気培養システムは、次の3種類の培養システム、即ち、①ガスパックプラス水素/炭酸ガス発生袋 (BD) のカタリストを除いたものと嫌気ジャー (BD) の組み合わせ (以下ガスパック) ・②パウチと一体型のキャンピパウチ (BD) を使用したもの (以下キャンピパウチ) ・③アネロパック微好気ジャー用 (三菱ガス化学) と角型標準ジャー (三菱ガス化学) を使用した組み合わせ (以下アネロパック微好気) を利用した。各条件下で、3日後・6日後に発育性遊走性の目安として集落の直径を測定した。

3. 嫌気性用半流動培地での保存性の検討

脱気操作した GAM 半流動培地に接種して、35℃ で継代培養した15日後・30日後の各々の菌株の保存性を確認した。

4. 同定試験項目

文献1)を参照して、インドキシル酢酸加水分解・硝酸塩還元試験・アルカリフォスファターゼ・ウレアーゼ産生・1% グリシン添加培地での発育・CCDA 培地での発育・25℃ および 42℃ における発育・アピヘリコを実施した。血液寒天培地で48時間から72時間湿潤状態で微好気培養を行った新鮮培養菌を被検菌として検査に用いた。

1) 硝酸塩還元試験

被検菌を0.1%硝酸カリウム加ハートインフュージョンブイヨンにマックファーランド (MCF) No. 4の濃度に浮遊させ、35℃温浴中で4時間加温後、硝酸塩還元試験試薬を加えて判定した。

2) インドキシル酢酸加水分解試験

20%Indoxyl acetate 加アセトン液を直径6mmの濾紙 (抗生物質検定用濾紙: 東洋濾紙) に25μL ずつ浸み込ませて乾燥させ、1白金耳の被検菌を試験紙に塗りつけて、滅菌蒸留水を1滴滴下後、30分以内で濃い青から青緑色を呈したものを陽性、無色の場合は陰性と判定した。

3) Charcoal cefoperazone deoxycholate agar (CCDA) 培地での発育

被検菌をMCF No. 1に調整し、CCDA 寒天培地 (関東化学) に5μL 接種して、35℃ 湿潤条件下の微好気培養3日後に判定した。

4) 温度発育試験

トリプチケースイブロス (BD) に被検菌をMCF No. 1に調整した後、血液寒天培地に5μL 接種し、25℃、35℃、42℃の各温度で湿潤条件下の微好気培養3日後に判定した。発育不良の場合には7日目に判定した。

5) 1% グリシン添加培地での発育

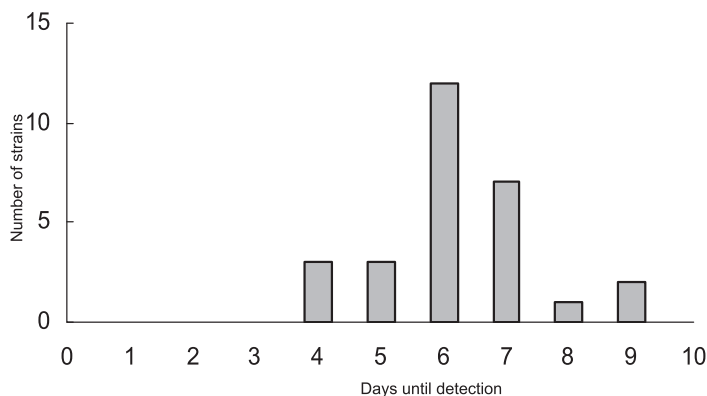
1% グリシン加5% ヒツジ血液添加寒天培地を作成し、MCF No. 4に調整した被検菌液を10μL 接種した。湿潤条件下の微好気培養3日後および7日後に発育の有無を判定した。

6) ウレアーゼテスト

尿素培地 (栄研化学) 1 mL に、被検菌をMCF No.4に浮遊させ、35℃、湿潤条件下の微好気培養3日後判定した。ピンク色を陽性、無変化を陰性と判定した。

7) アルカリフォスファターゼ加水分解試験

被検菌を0.3 mLの生理食塩液にMCF No. 4に調整して等量の自家製基質液に加え混和後、35℃で6時間通常大気にて反応させた。明らかな黄色を呈したも

Fig. 1 Period until detection by a blood cultivation device^a (BACTEC)

a: Bactec (BD)

のを陽性と判定した。

8) 簡易同定キット「アピヘリコ」による同定

被検菌を添付の生理食塩液に MCF No.6 に調整して、納書の操作法に従って接種した。24 時間培養後に、性状試験および同化試験をアピラボソフト（ピオメリユー）により判定し、菌種同定率を算出した。発育不良の場合、同化試験は 48 時間後まで培養を延長して判定した。

結 果

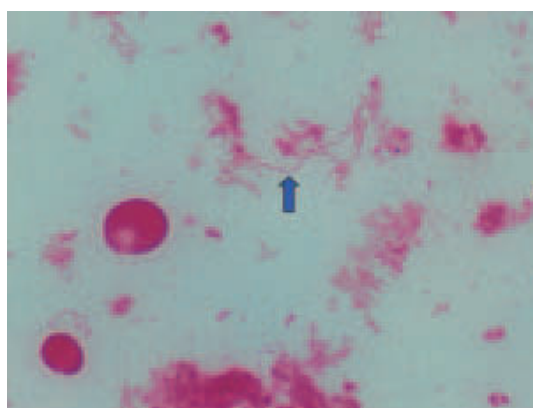
1. 臨床検査室の血液培養検査で *H. cinaedi* が検出された時の状況

今回の 28 株は、全て血液培養検査全自動血液培養装置 BACTEC システム (BD) の好気用ボトル (92F レズンボトル: BD) から分離された。ボトルを装着した後、全自動血液培養装置を制御しているコンピューター画面上にて陽性シグナルが確認された日数は 4 日～9 日で中央値は 6 日目であった (Fig. 1)。培養液のグラム染色所見 (Fig. 2) は、3 巻き以上の繊細な長めのグラム陰性螺旋菌が観察された。培養液の継代培養は、陽性シグナルが得られた後、直ちに 5% 血液寒天培地等にて培養容器内を湿潤にした 35°C の微好気培養が行われ、3.4 日後に thin spread colony の集落が認められることが特徴的であった。

2. 微好気培養用のシステムと培地の組み合わせによる発育性および遊走性についての比較

使用システム別の発育結果を Fig. 3 に示す。血液寒天培地・チョコレート寒天培地ともに最も発育が良好だったのはガスパックで、コロニーの直径に加えて厚みにおいてもその相違が明確であった (Fig. 4)。臨床分離株 CL-2 において、チョコレート寒天培地では 3 日後にアネロパック微好気で発育が認められたが、キャンピパウチでは発育が見られなかった。

3. 嫌気性用の GAM 半流動培地での保存性の検討

Fig. 2 Gram staining of clinically isolated *C. cinaedi* strain

A long spiral gram-negative microorganism (arrow) was found in the specimen from the blood culture bottle. ×1,000

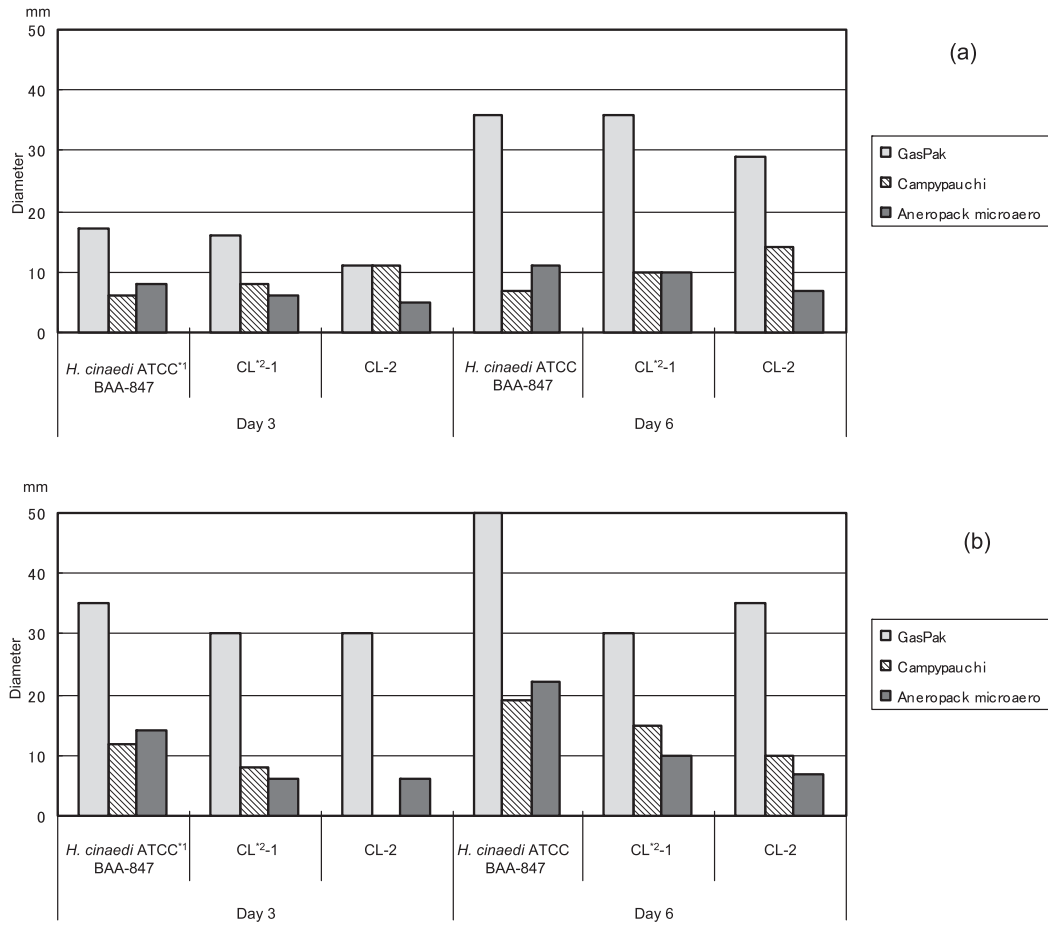
GAM 半流動培地に接種した培養 15 日後・30 日後のサブカルチャーにおいてともに菌の発育が確認され、良好な保存性を示した。(Table 1)

4. 同定試験成績

各種同定試験項目の結果を Table 2 に示す。インドキシル酢酸加水分解試験は臨床分離株 28 株全て陰性であった。硝酸塩還元試験は 28 株全て陽性、アルカリフォスファターゼおよびウレアーゼ産生試験は 28 株全て陰性を示した。CCDA 培地上での発育は全株陰性で、25°C および 42°C での発育も 28 株全て発育しなかった。1% グリシン添加培地上での発育は、16 株で発育が認められた。

アピヘリコによる菌種の同定率を Table 3 に提示する。臨床分離株 28 株中 15 株 (53.6%) と標準菌株 *H. cinaedi* BAA-847 はプロファイル番号「2000004」であり、*H. cinaedi* としての同定率は 68.5% を示した。他の分離株 13 株 (46.4%) はプロファイル番号「2410004」

Fig. 3 Growth comparison in three cultivation systems



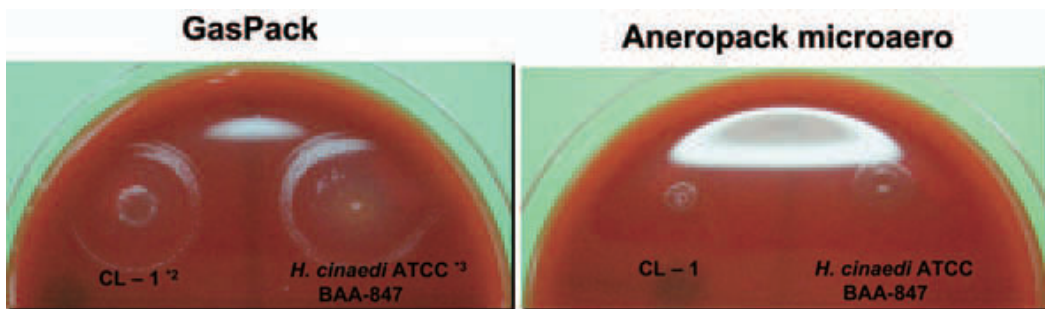
(a) : Growth on 5% sheep blood trypticase soy agar (BD)

(b) : Growth on chocolate ggar (BD)

*1: ATCC: American type culture collection

*2: CL: Clinically isolated strains

Fig. 4 Comparison of the colony*1 on the blood agar of GasPak Plus without catalyst and Aneropack microaero



*1: after cultivation for six days

*2: CL: Clinically isolated strains

*3: ATCC: American type culture collection

Table 1 Preservation in the GAM*¹ semi solid medium

Days cultured	<i>H.cinaedi</i> ATCC* ² BAA-847	<i>H.fennelliae</i> ATCC 35683	<i>H.pylori</i> ATCC43504	<i>C.jejuni</i> ATCC33560	CL* ³ 1	CL 2	CL 3
15	+* ⁴	-* ⁵	+	+	+	+	+
30	+	-	+	+	+	+	+

*¹: GAM: Gifu anerobic medium *²: ATCC: American type culture collection *³: CL: Clinically isolated strains*⁴: + : Subculture positive *⁵: - : Subculture negativeTable 2 Phenotypic features of *H.cinaedi* of clinically isolated strains

Culture test	Nitrate reduction		Urease		Indoxyl acetate hydrolysis		Alkali phosphatase hydrolysis		Growth* ³ with 1% glycine		Growth on CCDA medium		Growth at °C					
	+* ¹	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>H.cinaedi</i> of clinically isolated strains (n = 28)	28* ²	0	0	28	0	28	0	28	16	12	0	28	0	28	28	0	0	28

*¹: + Positive reaction; - Negative reaction.*²: Number of strains*³: Cultured in microaerophilic atmosphere

Table 3 Identification results with API Campy

Organism		Profile No.	% of identification
Clinically isolated strain	15/28 (63.6%)	2000004	<i>H. cinaedi</i> 68.5 / <i>C. lari</i> 25.3 / <i>C. upsaliensis</i> 3.4
	13/28 (46.4%)	2401000	<i>C. lari</i> 49.6 / <i>H. cinaedi</i> 19.5 / <i>C. upsaliensis</i> 16.4 / <i>C. fetus</i> 67 / <i>C. lari</i> ssp 5.2
<i>Helicobacter cinaedi</i>	ATCC* ¹ BAA-847	2000004	<i>H. cinaedi</i> 68.5 / <i>C. lari</i> 25.3 / <i>C. upsaliensis</i> 3.4
<i>Helicobacter fennelliae</i>	ATCC 35683	4421104	<i>H. fennelliae</i> 74.9 / <i>C. coli</i> 17.1 / <i>C. fetus fetus</i> 2.3
<i>Helicobacter pylori</i>	ATCC 43504	1201104	<i>H. pylori</i> 99.9 / <i>A. cryaerophilis</i> 0.1
<i>Helicobacter canadensis</i>	ATCC 70968	4000004	<i>H. fennelliae</i> 60.9 / <i>H. cinaedi</i> 24.9 / <i>C. lari</i> 7.5
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560	2501544	<i>C. jejuni jejuni</i> 1 99.5 / <i>C. jejuni jejuni</i> 2 0.5

*¹: ATCC: American Type Culture Collection

であり、*H. cinaedi*の同定率は19.5%であった。

考 察

本研究において、血液培養検査全自動血液培養装置 BACTEC システムにて *H. cinaedi*の陽性シグナルが得られるまでの日数は、6日が最も多く、その後に検出されたものもあった。臨床検査室の運用上、血液培養を5日程度で打ち切る施設も多いが、本菌種の検出のためには少なくとも7日間培養しないと *H. cinaedi*を検出できない可能性が示唆された。

*H. cinaedi*のグラム染色性の確認に関して、後染色にサフランインを使用した場合、難染性で見落とされる可能性が示唆され、バイフェル液を後染色に使用することで改善できることが判明した。また、アクリジンオレンジ染色や暗視野顕微鏡も有用とされている¹⁾。

*H. cinaedi*並びに *H. fennelliae*は特徴的なフィルム状の遊走性集落 (thin spread colony) を示す。文献によっては、*H. canadensis* や *H. pullorum* についてもフィルム状の発育が見られると記載されている¹²⁾。しかし、文献1)において、後者は thick mucoido film similar

to *Campylobacter*s と記載されており、判別可能であると考えられた。今回使用した標準株 *H. canadensis* ATCC 70968 に関しても *H. cinaedi*のようなフィルム状の遊走発育は見られなかった。

Campylobacter 属の一部や *H. cinaedi* および *H. fennelliae* においては、通常の微好気培養環境 (酸素5%、炭酸ガス10から15%、残り窒素) よりも高濃度の水素の存在下で発育が促進される²⁾。ガスバックシステムは水素ガスを発生するのに対し、他の二種の微好気培養システムでは水素ガスを生じないために、本研究結果が得られたものと考察された。それ故、発育の悪い初代分離培養時や大量の菌の発育を必要とする場合、ガスバックシステムの使用が有用と考えられる。

抗酸菌の硝酸塩還元試験や同定キットの中には数時間後には判定可能なものがあることから、発育に時間のかかる本菌種の同定時間を短縮するには有用であると推測し、反応条件を模索しながら試みたところ、良好な結果が得られた。即ち、硝酸塩還元試験は、生化学的性状に乏しい *H. cinaedi* においても陽性を示し、特

に同様のコロニーを示す *H. fennelliae* との鑑別に有用と考えられる。また、十分な菌量があれば、30分で判定可能なインドキシル酢酸加水分解試験も、6時間判定のアルカリフォスファターゼ加水分解試験の結果も組み合わせることで推定同定の迅速化に利用可能である。ただし、被検菌が新鮮でない場合は、前培養に使用する培地によっては陰性化することも予想され、注意が必要である。

CCDA 培地での発育は、臨床分離株と標準株の *Helicobacter* 属の菌種は全て発育陰性であった。Engberg からも CCDA 培地で *H. cinaedi* の発育は見られなかったとしている¹³⁾。臨床材料から分離される頻度の高い *C. jejuni*・*C. coli*・*C. fetus* などとの鑑別に有用であると思われる。

温度発育試験に関して、文献1)では、*H. cinaedi* や *H. fennelliae* は 42°C の温度では発育しないとされている。本研究の臨床分離株および標準菌の *H. cinaedi* においても発育は陰性であったが、*H. fennelliae* は発育が観察された。Kiehlbauch らは、使用した *H. cinaedi* や *H. fennelliae* の菌株全てにおいて、42°C での発育が陽性であったと報告している¹⁴⁾。このように、温度発育試験の見解は一定していないため、同定に関しては他の項目と総合的に判定する必要がある。

アルカリフォスファターゼ試験は、On & Holmes によれば、時間の経過とともに、本来、陰性菌でも発色が観察されるとしている¹⁵⁾。本研究においても、判定時間を過ぎるに従って、わずかに発色する菌株も見られ、その評価には注意が必要である。

アピヘリコに関して、今回、標準菌株 *H. cinaedi* BAA-847 と臨床分離株の *H. cinaedi* 同定率は共に必ずしも高いものではなく、臨床分離株においても若干判定に迷う項目もあったが、2つのプロファイル番号に限定されていた。このプロファイルに記載されている *H. cinaedi* 以外の菌種として、*C. upsaliensis* と *C. lari* が存在する。*C. upsaliensis* と分離株との相違点は、インドキシル酢酸加水分解試験において、*C. upsaliensis* は陽性を示し¹⁶⁾、分離株は全株陰性を提示した点である。また、分離株は全て 42°C での発育は観察されなかったが、*C. upsaliensis* では 42°C での発育が見られることがある¹⁶⁾。一方、*H. cinaedi* は特徴的な遊走性を示すコロニー所見⁹⁾を示すという点において、*C. lari* との相違点が見出せると考える。それ故、この2つのプロファイル番号に判定され、スウォーミングコロニーの発育状態や他の同定試験の項目と併せて考慮すれば、有用であるかもしれない。

培地上で特有な集落 (thin spread colony) が認められ、グラム染色所見でも *H. cinaedi* が疑われる場合には、純培養した後に今回検討した生物学的性状試験

の項目、そして、アピヘリコによる簡易同定の結果を併用することによって、一般的な検査施設においても本菌種の推定同定が可能であると考察される。

終りに本研究において、*H. cinaedi* の同定を賜りました宮崎大学農学部獣医公衆衛生学三澤尚明博士、ならびに、御協力を頂きました中野総合病院中央検査科小野恵美技師・東邦大学附属大森病院臨床検査部村上日奈子技師・東京医歯大学附属病院検査部沢辺悦子技師・駿河台日本大学病院臨床検査部西山宏幸技師・虎の門病院臨床感染症部岡田千香子技師の諸氏に対しまして深謝致します。本研究は、第17回日本臨床微生物学会総会(横浜, 2006年)において報告した。

文 献

- 1) Versalovic J, Fox JG : Helicobacter. In : Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White
- 2) 平井義一, 下村裕史, 林 俊治, 横田憲治, 小 熊恵二 : 腸肝ヘリコバクター感染症と疾患. *H. cinaedi*, *H. fennelliae*, *H. pullorum* の性状と病原性. *臨床と微生物* 2005 ; 32 : 175—80.
- 3) NG VL, Hadley WK, Fennell CL, Flores BM, Stamm WE : Successive bacteremias with “*Campylobacter cinaedi*” and “*Campylobacter fennelliae*” in a bisexual male. *J Clin Microbiol* 1987 ; 25 : 2008—9.
- 4) Orlicek SL, Welch DF, Kuhls TL : Septicemia and meningitis caused by *Helicobacter cinaedi* in a neonate. *J Clin Microbiol* 1993 ; 31 : 569—71.
- 5) Weir SC, Gibert CL, Gordin FM, Fischer SH, Gill VJ : An uncommon *Helicobacter* isolate from blood : evidence of a group of *Helicobacter* spp. pathogenic in AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1999 ; 37 : 2729—33.
- 6) Murakami H, Goto M, Ono E, Sawabe E, Iwata M, Okuzumi K, et al. : Isolation of *Helicobacter cinaedi* from blood of an immunocompromised patient in Japan. *J Infect Chemother* 2003 ; 9 : 344—7.
- 7) Kitamura T, Kawamura Y, Ohkusu K, Masaki T, Iwashita H, Sawa T, et al. : Helicobacter cinaedi cellulitis and bacteremia in immunocompetent hosts after orthopedic surgery. *J Clin Microbiol* 2007 ; 45 : 31—8.
- 8) Nishine H, Kasai S, Yoshikawa M, Otsuka Y, Tokuda H : A case of recurrent Helicobacter cinaedi-associated bacteremia in a small cell lung cancer patient during chemotherapy. *Nihon Kogyoku Gakkai Zasshi* 2007 ; 45 : 26—30.
- 9) Misawa N, Kawashima K, Kondo F, Kushima E, Kushima K, Vandamme P : Isolation and characterization of Campylobacter, Helicobacter, and Anaerobiospirillum strains from a puppy with bloody diarrhea. *Vet Microbiol* 2002 ; 87 : 353—

- 64.
- 10) Vandamme P, Harrington CS, Jalava K, On SLW : Misidentifying Helicobacters : the *Helicobacter cinaedi* example. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 2261—6.
 - 11) Kuhnert P, Burnens AP : Misidentifying *Helicobacter cinaedi*. J Clin Microbiol 2001 ; 39 : 2751—2.
 - 12) Fox JG, Chien CC, Dewhirst FE, Paster BJ, Shen Z, Melito PL, *et al.* : *Helicobacter canadensis* sp. nov. isolated from humans with diarrhea as an example of an emerging pathogen. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 2546—9.
 - 13) Engberg J, On SLW, Harrington CS, Smidt PE : Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for Campylobacters. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 286—91.
 - 14) Kiehlbauch JA, Brenner DJ, Cameron DN, Steigerwalt AG, Makowski JM, Baker CN, *et al.* : Genotypic and phenotypic characterization of *Helicobacter cinaedi* and *Helicobacter fennelliae* strains isolated from humans and animals. J Clin Microbiol 1995 ; 33 : 2940—7.
 - 15) On SLW, Holmes B : Assessment of enzyme detection test useful in identification of Campylobacteria. J Clin Microbiol 1992 ; 30 : 746—9.
 - 16) Goossens H, Pot B, Vlaes L, Van den Borre C, Van den Abbeele R, Van Naelten C, *et al.* : Characterization and description of "*Campylobacter upsaliensis*" isolated from human feces. J Clin Microbiol 1990 ; 28 : 1039—46.

Isolation and Identification of *Helicobacter cinaedi* and *H. cinaedi*-like Organisms Isolated from Blood Culture in Practical Laboratory Procedures

Takashi TANAKA¹⁾, Mieko GOTO²⁾, Katsuko OKUZUMI³⁾, Akiko YONEYAMA⁴⁾,
Tetsuya MATSUMOTO⁵⁾, Keizo YAMAGUCHI⁶⁾ & Takashi TAKAHASHI⁷⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Teikyo University School of Medicine, ²⁾Department of Infection Control and Prevention, The University of Tokyo Hospital, ³⁾Division of Infection Control, Dokkyo Medical University Hospital, ⁴⁾Department of Infectious Diseases, Toranomon Hospital, ⁵⁾Department of Microbiology, Tokyo Medical University, ⁶⁾Department of Microbiology and Infectious Diseases, Toho University School of Medicine, ⁷⁾Department of General Medicine, Kanazawa Medical University

A spiral Gram-negative bacterium, *Helicobacter cinaedi*, has been isolated from clinical specimens of immunodeficient patients in Japan. We determined the isolation procedure and features using practical phenotypic tests for *H. cinaedi* isolated from blood culture. We applied 28 clinically isolated strains from 5 different metropolitan institutions, whose species was reconfirmed in technical support at another expert veterinary medicine institute in identifying *H. cinaedi*. We also used 6 strains of type and reference.

Positive signals from aerobic bottles in automated blood culture systems, BACTEC, were observed 4-9 days after culture was started. A thin spread colony was found 3-4 days after the start of subcultures consisting of growth on 5% sheep blood agar plates with immediate incubation under wet and microaerophilic conditions at 35°C.

In phenotypic tests, all specimens of *H. cinaedi* were shown to be positive in nitrate reduction and to be negative in both indoxyl acetate hydrolysis and urease activity, underlining the usefulness of these 3 phenotypes. Tests of alkaline phosphatase hydrolysis, growth at different temperatures, and growth with 1% glycin provided additional information when referencing standard results of identification. We took speculative profiling data of *H. cinaedi* identification with a simple phenotypic kit, Api campy, indicating its usefulness in testing.

These observations suggest combined methods of previously available tests (nitrate reduction, indoxyl acetate hydrolysis, and urease activity) with Api campy may be useful in differentiating *H. cinaedi* from *H. cinaedi*-like microorganisms when observing the characteristic thin spread colony within subcultures under microaerophilic conditions.