

腸球菌のペニシリン感受性をグラム染色所見の 「落花生サイン」で推定

¹⁾ 前橋赤十字病院感染症内科, ²⁾ 同 検査部
林 俊 誠¹⁾ 吉 田 勝 一²⁾

(平成 30 年 8 月 20 日受付)

(平成 31 年 2 月 15 日受理)

Key words: penicillin-susceptible enterococci, Gram staining, antimicrobial stewardship program

要 旨

腸球菌感染症が想定される場合、バンコマイシンが初期治療に用いられる。ペニシリン感受性と後日報告された場合でもバンコマイシンは数日間投与されるので、耐性菌の選択や不要な副作用の出現につながる。なかでも、ペニシリン感受性の *Enterococcus faecalis* 菌血症ではペニシリン系抗菌薬に比較してバンコマイシンなどのグリコペプチド系薬での治療は 30 日後総死亡率が高いことが報告されている。このような背景から、*E. faecalis* などのペニシリン感受性腸球菌を迅速に判定できる方法が必要であるが、質量分析法や遺伝子検査法による菌種同定は高額であるため導入は容易ではない。そこで我々は、グラム染色所見で「落花生サイン」の有無を観察することで、ペニシリン感受性腸球菌を推定する手法を考案し、その検査特性を検討した。

血液培養陽性検体のグラム染色標本の顕微鏡検査（以下、鏡検と略す）で、莢膜を有さない、両端が尖った楕円形で長軸方向に連鎖しているグラム陽性双球菌のうち、あたかも落花生の殻のように菌体の中央両側に連鎖軸と直行する対称性の切痕が確認できる所見を「落花生サイン」と定義し、これとペニシリン感受性試験結果を比較した。

グラム染色の鏡検所見で、ペニシリン耐性腸球菌を「落花生サイン」とする感度と特異度は、それぞれ臨床医で 78%、96%、臨床検査技師で 94%、78% であった。この推定法の普遍性を確認するために、日常的に鏡検を行っている臨床検査技師と、そうでない臨床医のグラム染色所見の一致度を見たカッパ係数は 0.62 で検者間での推定結果の一致度は「Substantial agreement」と評価できた。

「落花生サイン」なしのグラム染色所見からペニシリン感受性腸球菌を推定できるこの手法は最大の治療効果と最小の副作用リスクを両立させ、薬剤耐性対策にもつながると期待できる。

〔感染症誌 93:306-311, 2019〕

序 文

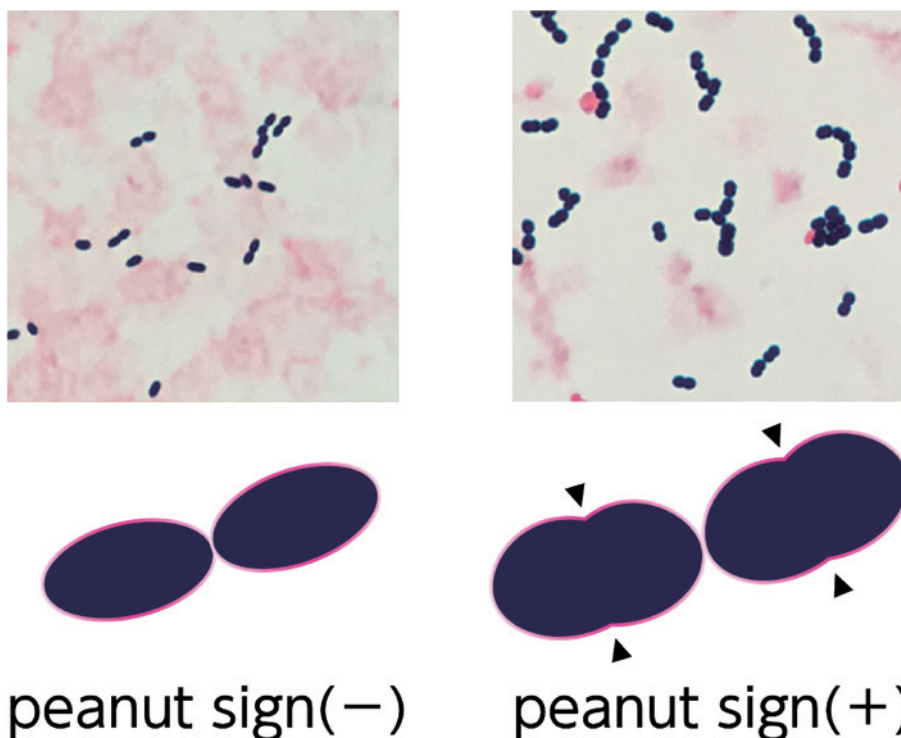
病歴、身体所見やグラム染色所見などから腸球菌による感染症が強く示唆される場合、抗菌薬感受性結果が確定するまでは推定的治療として一般にバンコマイシンが用いられる。なぜならば、バンコマイシン耐性腸球菌による感染症は全国で年間約 60 例しか報告されていないからである¹⁾。しかし、同定感受性試験結果からペニシリン感受性の腸球菌であることが判明すれば、その時点で確定的治療としてバンコマイシンからペニシリン系抗菌薬に狭域化できる。ペニシリン感

受性腸球菌とわかるまでに数日間を要した症例では、本来不要であったはずのバンコマイシンによる副作用リスクや耐性菌選択が問題となる。また、ペニシリン感受性の *Enterococcus faecalis* 菌血症をバンコマイシンで治療すると、ペニシリン系抗菌薬による治療に比して死亡率が上昇するという問題もある²⁾。

こうした問題を解決するために、腸球菌のペニシリン感受性を迅速かつ簡便な方法で推定する検査法が求められている。質量分析法や遺伝子検査法では菌名が、遺伝子検査法では耐性の有無も迅速に得られるが、導入には高価な機器が必要である。グラム染色標本の顕微鏡検査（以下、鏡検と略す）で迅速、簡便、安価に

別刷請求先：(〒371-0811) 群馬県前橋市朝倉町 389 番地 1
前橋赤十字病院 林 俊誠

Fig. 1 Microscopic images of enterococci (blood culture broth, 1,000-fold) and the illustration of the “peanut sign”



腸球菌を推定できるが、その腸球菌のペニシリン感受性まで推定できることはこれまで分かっていなかった。

本研究では、グラム染色標本の鏡検で腸球菌の特徴的所見からペニシリン感受性を推定する感度、特異度と観察結果の信頼性について、薬剤感受性試験検査結果をゴールドスタンダードとして検討した。また、グラム染色鏡検を日常的に行っている臨床検査技師と、そうではない検者として臨床医を設定して、所見の一致度を評価した。

材料と方法

1. 材料

2015年4月から2016年3月の1年間に当院で採取された全ての血液培養4,595セットのうち、腸球菌検出例を対象とした。患者情報は匿名化し、検査日と検査番号を各標本に割り当てた。

2. 血液培養

血液培養はBD バクテック FX システム（日本BD社：日本ベクトン・ディッキンソン）を使用した。培養ボトルは本システム専用の23F好気用レズンボトル、22F嫌気用レズンボトル、20F小児用レズンボトルを用いた。23F好気用レズンボトルと22F嫌気用レズンボトルは最長7日間、20F小児用レズンボトルは最長5日間、35℃で培養を行った。

3. グラム染色

令和元年5月20日

陽性サインがでた血液培養ボトルから培養液2mLを滅菌スピッツに取り出し、3,000回転/minで8min遠心分離したのちに、沈渣をスライドガラスに塗抹してグラム染色した。グラム染色は自家調製したHucker変法染色液で行った。

4. 同定と感受性試験

培養陽性ボトルの培養液を5%ヒツジ血液寒天培地に分離培養し、独立集落から懸濁液を調製してマイクロスキャン Pos Combo 3.1J パネル（ベックマン・コールター）を用いて、マイクロスキャン WalkAway Plus 微生物同定感受性分析装置（ベックマン・コールター）で同定および感受性試験を行った。腸球菌の同定は色素産生性と運動性を用手法で追加して実施した。

5. 鏡検

血液培養陽性検体のグラム染色鏡検所見で、莢膜を有さず両端が尖った楕円形で、長軸方向に連鎖しているグラム陽性双球菌を腸球菌と推定した。あたかも落花生の殻のように、個々の菌体の中央両側に連鎖軸と直行する対称性の切痕が確認できる所見を「落花生サイン」と定義した（Fig. 1）。

検体収集期間終了後に、腸球菌が検出された検体のグラム染色標本137枚を臨床医と臨床検査技師が顕微鏡の油浸1,000倍で観察して「落花生サイン」の有無を記載した。

6. 組み入れ基準と除外基準

Fig. 2 Inclusion and exclusion process

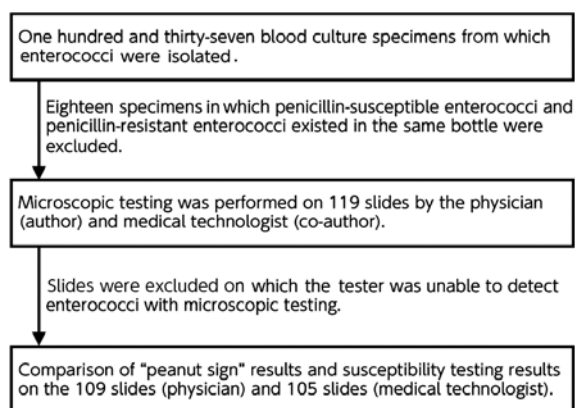


Table 1 Results for microscopic testing and penicillin-susceptibility testing of enterococci

"Peanut sign"	Penicillin-susceptibility testing results (No. of specimens)		
	Resistant	Susceptible	Total
Physician			
Positive	42	2	44
Negative	12	53	65
Total	54	55	109
Medical technologist			
Positive	51	11	62
Negative	3	40	43
Total	54	51	105

期間中に同定検査で腸球菌と確定できた137検体 (*Enterococcus faecium* 61, *E. faecalis* 57, *Enterococcus casseliflavus* 8, *Enterococcus avium* 5, *Enterococcus gallinarum* 3, *Enterococcus raffinosus* 3)のうち、ペニシリン感受性と耐性の腸球菌が同時に発育した18検体と、菌量が少ないために分離培養で腸球菌が検出されたが鏡検では腸球菌を検出できなかった検体 (臨床医が検出できなかった10検体: *E. faecalis* 6, *E. faecium* 3, *E. raffinosus* 1, 臨床検査技師が検出できなかった14検体: *E. faecalis* 8, *E. faecium* 3, *E. casseliflavus* 1, *E. avium* 1, *E. raffinosus* 1, このうち両検者がともに検出できなかったのは2検体: *E. faecium* 1, *E. raffinosus* 1)を除き、医師109検体, 検査技師105検体を解析対象とした (Fig. 2)。両検者の所見一致度をみるカップ係数は、両検者ともに腸球菌を検出できた97検体を解析対象とした。

7. 解析

「落花生サイン」の有無とペニシリン感受性試験結果に関する感度と特異度, 検者間の所見の一致度を見るためのカップ係数は, 統計的解析ソフトウェア EZR (バージョン 1.34) を使用して算出した³⁾。

Table 2 Characteristic value for gram-staining results ("peanut sign" positive) of penicillin-resistant enterococci

	Characteristic value	Statistical value (%)	95% CI (%)
Physician			
Sensitivity		78	64 - 88
Specificity		96	88 - 100
Positive predictive value		95	85 - 99
Negative predictive value		82	70 - 90
Medical technologist			
Sensitivity		94	85 - 99
Specificity		78	65 - 89
Positive predictive value		82	71 - 91
Negative predictive value		93	81 - 99

8. 倫理的配慮

病院内に設置されている倫理委員会に諮問し, 許諾を得たのちに本研究を行った。

成 績

臨床医の鏡検では, ペニシリン耐性の54検体中42検体を「落花生サイン」ありと判定した (Table 1)。ペニシリン感受性の55検体中53検体を「落花生サイン」なしと判定した。よって臨床医の鏡検における「落花生サイン」の有無は感度78% (95%信頼区間64~88%), 特異度96% (95%信頼区間88~100%), 陽性的中率95% (95%信頼区間85~99%), 陰性的中率82% (95%信頼区間70~90%)であった (Table 2)。

臨床検査技師の鏡検では, ペニシリン耐性の54検体中51検体を「落花生サイン」ありと判定した (Table 1)。ペニシリン感受性の51検体のうち40検体を「落花生サイン」なしと判定した。よって臨床検査技師の鏡検における「落花生サイン」の有無は感度94% (95%信頼区間85~99%), 特異度78% (95%信頼区間65~89%), 陽性的中率82% (95%信頼区間71~91%), 陰性的中率93% (95%信頼区間81~99%)であった (Table 2)。

E. faecalis および *E. faecium* 以外の菌種で臨床材料からの検出が稀な腸球菌を「その他の腸球菌」として, 「落花生サイン」の有無とペニシリン感受性試験結果を腸球菌の菌種別に分けて比較した (Table 3)。ペニシリン感受性の *E. faecalis* を「落花生サイン」なしと判定した率は, 臨床医で100% (43/43), 臨床検査技師で85% (35/41)であった。ペニシリン感受性の *E. faecium* 2検体を臨床医と臨床検査技師は, いずれも「落花生サイン」ありと判定した。ペニシリン耐性の *E. faecium* を「落花生サイン」なしと判定した率は, 臨床医で25% (12/48), 臨床検査技師で2% (1/48)であった。ペニシリン感受性の「その他の腸球菌」を「落花生サイン」なしと判定した率は臨床医で100%

Table 3 Results for penicillin-susceptibility testing and microscopic testing (“peanut sign”) of enterococci

Enterococci	“Peanut sign”	Penicillin-susceptibility testing results (No. of specimens)		
		Resistant	Susceptible	Total
Physician				
<i>Enterococcus faecalis</i>	Positive	0	0	0
	Negative	0	43	43
<i>Enterococcus faecium</i>	Positive	36	2	38
	Negative	12	0	12
Other enterococci	Positive	6	0	6
	Negative	0	10	10
Medical technologist				
<i>Enterococcus faecalis</i>	Positive	0	6	6
	Negative	0	35	35
<i>Enterococcus faecium</i>	Positive	47	2	49
	Negative	1	0	1
Other enterococci	Positive	4	3	7
	Negative	2	5	7

Table 4 Inter-rater agreement regarding the presence of the “peanut sign” in gram-staining findings

Rater	“Peanut sign”	No. of specimens		
		Medical technologist		
		Positive	Negative	Total
Physician	Positive	41	2	43
	Negative	17	37	52
	Total	58	39	97

(10/10)であったが、臨床検査技師は63% (5/8)であった。ペニシリン耐性の「その他の腸球菌」を「落花生サイン」なしと判定した率は臨床医で0% (0/6)、臨床検査技師で33% (2/6)であった。

臨床医と臨床検査技師のいずれもが腸球菌を鏡検で検出した97検体で、検者間のグラム染色所見での「落花生サイン」有無の一致をみた (Table 4)。検者間の所見の一致度を見たカッパ係数は0.62 (95%信頼区間0.46~0.77)であった。

考 察

腸球菌のペニシリン感受性をグラム染色所見の「落花生サイン」で検者が異なっても78~96%の感度と特異度で推定でき (Table 2)、2検者の「落花生サイン」判定の一致度はカッパ係数から「Substantial agreement」⁴⁾と評価できることが分かった。この方法は、検者のグラム染色観察経験の長短に関わらずに信頼できる結果が得られることを統計学的に確認できた点でも意義がある。特殊な技能や習熟を必要とするこ

となく、「落花生サイン」の有無を見分ける簡便さが、検者間での結果の差異を少なくしていると思われる。

質量分析法、遺伝子検査法、フローサイトメトリー法などを用いてペニシリン感受性を迅速に判定できる方法が研究されてきた⁵⁾。しかし、特殊な機器を用いずにグラム染色所見から迅速、簡便、安価に腸球菌であることと、そのペニシリン感受性を推定できることの臨床的意義は大きい。近年実用化された質量分析法と古典的検査法であるグラム染色鏡検は、どちらも抗菌薬感受性試験結果が得られる数日前に結果がわかる迅速性に優れている点で共通しているが、菌名同定の精度においては差異がある。質量分析法はごく一部の例外を除いてグラム染色鏡検よりも正確に菌名を同定できるメリットがあるが、極めて高価で操作に習熟を要し、複数の菌種が同時に検出された検体では純培養を行ってからでないと菌名を確定できない。グラム染色鏡検は、菌名同定の正確性が質量分析法に比べて劣るものの、極めて安価に導入できること、複数の菌種が存在する検体でも純培養を待つことなく、それぞれの菌名を推定できること、適用検体が血液培養陽性ボトルや純培養検体に限られていないことなどから質量分析法で代替できないメリットがある。予算や人手の問題で院内に高価な検査機器の導入が困難な施設や細菌検査を外部委託している施設においても、グラム染色鏡検で感受性を迅速かつ安価に推定できる本手法は質量分析法にないメリットを見出した革新的な知見である。

患者の臨床状態が許せば、同定感受性試験結果を待つことなく、「落花生サイン」なしであればペニシリン系抗菌薬、「落花生サイン」ありならバンコマイシンを初期から投与できる。バンコマイシン投与後に「落花生サイン」なしの情報が見られた場合は、その時点でペニシリン系抗菌薬への狭域化を行えるので、本来不必要であった広域抗菌薬の投与期間を短縮できるため、生体内でバンコマイシン耐性菌を選択するリスクが低下する。このようにグラム染色鏡検での「落花生サイン」情報は既存の診断・治療法のさらなる最適化を迅速に行えるので、最大の治療効果と最小の副作用リスクの両立はもちろん、薬剤耐性対策にも寄与できる。

E. faecalis では、2名の検者が「落花生サイン」なしと判断した全ての検体でペニシリン感受性であったことは、「落花生サイン」を *E. faecalis* 感染症における抗菌薬選択の判断に使えることを意味している。初期治療薬としてペニシリンを使用すれば死亡率を下げることができる *E. faecalis* 菌血症の抗菌薬選択において、この手法を用いる意義が示された。

一方、ペニシリン耐性であるにもかかわらず、「落花生サイン」なしと判定された検体は *E. faecium* と「その他の腸球菌」で確認された。このことは臨床効果が期待できないペニシリン系抗菌薬の使用につながる重大な誤りに導くことになる。しかし、これらのペニシリン耐性菌を「落花生サイン」なしと判定した率は *E. faecium* で臨床医は 25% (12/48)、臨床検査技師で 2% (1/48)、「その他の腸球菌」で臨床医は 0% (0/6)、臨床検査技師は 33% (2/6) であり、結果は検者間で大きな偏りが見られたので、これらの標本を両検者が一緒に再度鏡検して判定基準の標準化ができれば、本法の正確度がさらに向上する可能性が残されている。

なぜペニシリン耐性腸球菌に「落花生サイン」が見られるのかについて、文献を検索したが確信は得られなかった。本研究で、2検体しかなかったペニシリン感受性 *E. faecium* を両検者ともに「落花生サイン」ありと判定していたことから、「落花生サイン」が示しているのは単に *E. faecalis* と *E. faecium* の菌種の違いである可能性が考えられる。しかし、ペニシリン耐性の「その他の腸球菌」を「落花生サイン」ありと判定した率が臨床医で 100% (6/6)、臨床検査技師で 67% (4/6) であったこと、ペニシリン耐性 *E. faecium* はペニシリンとの親和性が低い penicillin-binding protein (PBP) 5 の産生量が多いこと⁶⁾、本邦では *E. faecium* の約 9 割の株がペニシリン耐性であること⁷⁾ から、「落

花生サイン」は *E. faecium* に特異的に見られる現象ではなく、むしろ腸球菌の PBP 5 や PBP 7⁸⁾ の産生量が菌の形態に影響している可能性も考えられる。

本研究は単施設で行った血液培養検体のみの結果であるが、今後、多施設で「落花生サイン」の有無に関する評価が確立すれば、患者の治療効果の向上だけでなく、副作用リスクの低下、ひいては広域抗菌薬の投与期間短縮から薬剤耐性対策にも資する新規の手法として期待できる。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課, 国立感染症研究所感染症疫学センター感染症発生動向調査事業年報 2016 年 (平成 28 年) 確定報告データ <https://www.niid.go.jp/niid/ja/allarticles/surveillance/2270-idwr/nenpou/7779-idwr-nenpo2016.html> (2018 年 1 月 19 日付).
- 2) Foo H, Chater M, Maley M, van Hal SJ : Glycopeptide use is associated with increased mortality in *Enterococcus faecalis* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 2014 ; 69 : 2252—7.
- 3) Kanda Y : Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013 ; 48 : 452—8.
- 4) Landis JR, Koch GG : The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977 ; 33 : 159—74.
- 5) Jarzembowski T, Wisniewska K, Jozwik A, Bryl E, Witkowski J : Flow cytometry as a rapid test for detection of penicillin resistance directly in bacterial cells in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol* 2008 ; 57 : 167—9.
- 6) Montealegre MC, Roh JH, Rae M, Davlieva MG, Singh KV, Shamoo Y, *et al.* : Differential Penicillin-Binding Protein 5 (PBP5) Levels in the *Enterococcus faecium* Clades with Different Levels of Ampicillin Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2017 ; 61.
- 7) 厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業：検査部門 2017 年年報 (全体). https://janis.mhlw.go.jp/report/open_report/2017/3/1/ken_Open_Report_201700.pdf.
- 8) Grayson ML, Eliopoulos GM, Wennersten CB, Ruoff KL, Klimm K, Sapico FL, *et al.* : Comparison of *Enterococcus raffinosus* with *Enterococcus avium* on the basis of penicillin susceptibility, penicillin-binding protein analysis, and high-level aminoglycoside resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1991 ; 35 : 1408—12.

The Peanuts Sign : A Novel Clue to the Rapid Discrimination of Penicillin-susceptible Enterococci Based on Gram Staining Findings

Toshimasa HAYASHI¹⁾ & Masakazu YOSHIDA²⁾

¹⁾Division of Infectious Diseases and ²⁾Division of Clinical Laboratory, Maebashi Red Cross Hospital

When an enterococcal infection is strongly suspected, intravenous vancomycin is generally selected for the initial treatment. Vancomycin is administered for a few days, at which time susceptibility testing often indicates penicillin-susceptible enterococci, leading to unnecessary adverse reactions and the development of antibiotic-resistant bacteria. In cases of penicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* bacteremia, where treatment has been performed with vancomycin, a higher mortality rate has resulted than in cases treated with penicillin.

To solve these problems, a method capable of rapidly identifying a penicillin susceptible strain is desired; however, mass spectrometry or genetic testing is expensive and requires proficiency, and many hospitals comprise different subjects. Therefore, we devised a method to rapidly identify the penicillin susceptibility of enterococci by observing what we refer to as the “peanut sign”, based on Gram staining.

Microscopic testing was performed on blood culture-positive gram-stained specimens. Gram-positive diplococci without a capsule with pointed elliptical ends were presumed to be enterococci. The enterococci with a peanut shell-like symmetrical notch present in the center of the bacterial cell on both sides were defined as having the “peanut sign”. We evaluated the results for microscopic testing and penicillin-susceptibility testing of enterococci between a medical technologist, who performs microscopic testing on a daily basis and a physician, who does not.

In the microscopic examination by the physician, the “peanut sign” returned a sensitivity of 78% and specificity of 96% to penicillin-resistant enterococci. In the microscopic examination by the medical technologist, the sensitivity was 94% and specificity was 78%. The kappa coefficient was 0.62, indicating “substantial agreement” between the findings of the physician and medical technologist.

Penicillin-susceptible enterococci can be rapidly identified by Gram staining results, with a substantial agreement noted for inter-rater reliability.

If a patient’s condition is not urgent, then optimal antibiotics can be selected in real-time, either penicillin or vancomycin depending on positive or negative presence of the “peanut sign”. This may assist with appropriate administration of antimicrobials, maximizing therapeutic efficacy, minimizing the risk of unnecessary adverse reactions and preventing the development of antibiotic-resistant bacteria.