

[症例報告]

血液培養から CO₂ 要求性 *Escherichia coli* が分離された 1 症例

高見沢将¹⁾・松本竹久²⁾・中村宏信³⁾・三橋達郎³⁾・高松勇貴¹⁾・加藤亮介¹⁾

野竹加津子¹⁾・上原雅江¹⁾・大森麻希¹⁾・矢ヶ崎絵美¹⁾・井出京子¹⁾

¹⁾ JA 長野厚生連佐久総合病院臨床検査科

²⁾ 信州大学医学部附属病院臨床検査部

³⁾ JA 長野厚生連佐久総合病院総合診療科

(平成 25 年 9 月 19 日受付, 平成 25 年 11 月 28 日受理)

CO₂ 要求性 *Escherichia coli* による敗血症を経験した。症例は 79 歳 男性。総胆管結石性胆管炎による敗血症を発症し、血液培養よりグラム染色にてグラム陰性桿菌を認めた。好気培養では発育せず、CO₂ ガス環境下での培養にて発育するグラム陰性桿菌が検出された。MicroScan WalkAway 96SI (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス) を用いた NBP6.23J パネルによる同定・薬剤感受性検査では、菌の発育が観察されず結果を得ることが出来なかったため、5%CO₂ ガス環境下での生化学的性状検査や、質量分析装置 MALDI-Biotyper (ブルカードルトニクス), 16S rRNA 遺伝子配列による同定検査を行った結果、*E. coli* と同定された。また、薬剤感受性試験についても 5%CO₂ ガス環境下にて実施したところ、各種抗菌薬に対する感受性試験判定が可能となった。

グラム染色にて菌は観察されるが、好気培養にて菌が発育してこない場合には CO₂ 要求性 small-colony variants による感染の可能性を念頭において検査を実施する必要がある。

Key words: Small-colony variants, CO₂ 要求性, CO₂ 培養, *Escherichia coli*, 敗血症

序 文

Small-colony variants (SCVs) とは、何らかの原因で代謝が不活性な状態になり、発育の遅延や、コロニーの極小化といった変異を生じた株の総称である。SCVs はその非典型的なコロニー性状や、発育の低活性による典型的生化学的性状の消失等により、見落とされたり、誤同定される可能性が指摘されている。SCVs には通常のコロニー性状を示さない特徴以外にも、ヘミン要求性 *Staphylococcus aureus*¹⁾ やチミジン依存性 *S. aureus*²⁾ や Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*³⁾ などの栄養要求性の変異株、カタラーゼ陰性 *Citrobacter freundii*⁴⁾ や *Escherichia coli*⁵⁾ などの生化学的性状の変異株、発育に CO₂ を要求する

MRSA⁶⁾ や *Klebsiella ozaenae*⁷⁾, *Proteus mirabilis*⁸⁾ などの様々な変異株が報告されている。

E. coli に関する SCVs の報告は、尿路感染症由来による報告が最も多く^{9)~11)}、糞便¹²⁾、慢性人工股関節感染症¹³⁾ や血液由来⁹⁾ 等からも報告されている。SCVs の発現原因には、抗菌薬持続投与の影響等が考えられているが、SCVs の報告例は少なく、詳細な代謝経路異常については未だ解明されていないものが多い。また、現在の臨床検査における細菌同定試験は生化学的性状試験によるものが主流のため、SCVs が誤同定される可能性を否定できない。

今回、筆者らは血液培養より CO₂ 要求性の *E. coli* を分離した症例を経験したので報告する。

症 例

患者：79 歳、男性

主訴：発熱、呼吸苦、血圧低下

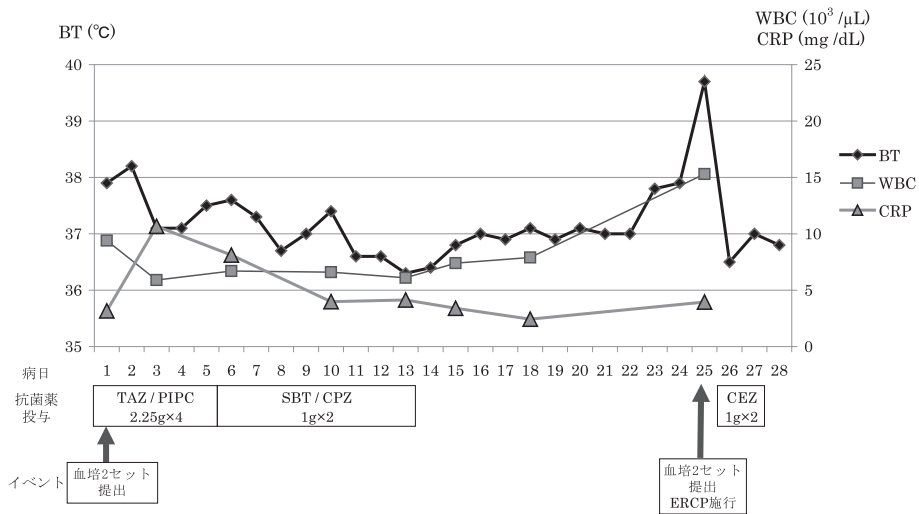
既往：脳梗塞、症候性てんかん、慢性心不全、前立腺肥大、胃瘻あり

著者連絡先：〒384-0301 長野県佐久市臼田 197
JA 長野厚生連佐久総合病院臨床検査科
高見沢将
TEL: 0267-82-3131
FAX: 0267-81-1033

表 1. 入院時血液検査所見

WBC	$9.4 \times 10^3 / \mu\text{L}$	TP	7.2 g/dL	γ -GT	399 IU/L
RBC	$441 \times 10^4 / \mu\text{L}$	A/G	3.3 g/dL	UN	19 mg/dL
Hb	13.7 g/dL	T-Bil	1.6 mg/dL	CRE	0.66 mg/dL
Ht	39.5 %	AST	856 IU/L	eGFR	87
PLT	$22 \times 10^4 / \mu\text{L}$	ALT	398 IU/L	Glu	101 mg/dL
		LD	580 IU/L	CRP	3.16 mg/dL
		ALP	1,215 IU/L		

表 2. 臨床経過



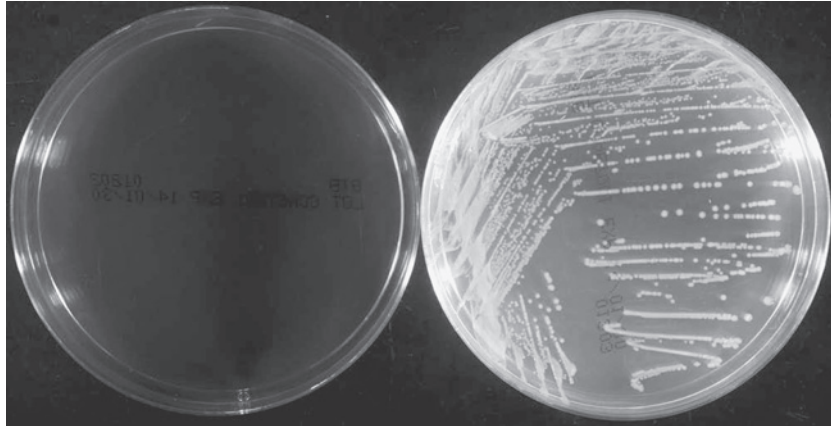
家族歴：特記事項なし

臨床経過：介護施設入所中。長期臥床による誤嚥性肺炎に対して sulbactam/ampicillin (SBT/ABPC) による治療を繰り返していた。2012年11月に38°C台の発熱を認め、SpO₂が63%まで低下したため、酸素を3L/分で開始した。その後も発熱が続き、血圧も83/68 mmHgと低下したため、当院に救急搬送された。救急外来で発熱の原因精査として、血液培養2セットを採取し、血液検査では肝胆道系酵素の上昇を認めた(表1)。CT検査で下部胆管内に結石像を認めたため、総胆管結石性胆管炎の診断で、精査加療のため入院となった。本症例は、早急の内視鏡的逆行性胆管膵管造影(ERCP)が必要と考えられたが、家族の強い要望により温存療法が選択され、第1病日より tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC) 2.25 g × 4/day による化学療法を開始した。入院第1病日の救急外来で採取した血液培養が、翌日第2病日に陽性となり、グラム陰性桿菌が検出された。その後、解熱傾向を認め

ため、第6病日に sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ) 1 g × 2/day に変更となった。第25病日に再度発熱を認め、血液検査上、胆管炎の急性増悪を認めたため、緊急のERCPを施行した。ERCP施行前に採取された血液培養2セット4本中1本より、第1病日と同様のグラム陰性桿菌が検出された。ERCPにて総胆管結石摘出後は炎症反応改善し、第38病日に提出された血液培養2セットから菌は検出されず、軽快となった(表2)。

培養検査法と成績

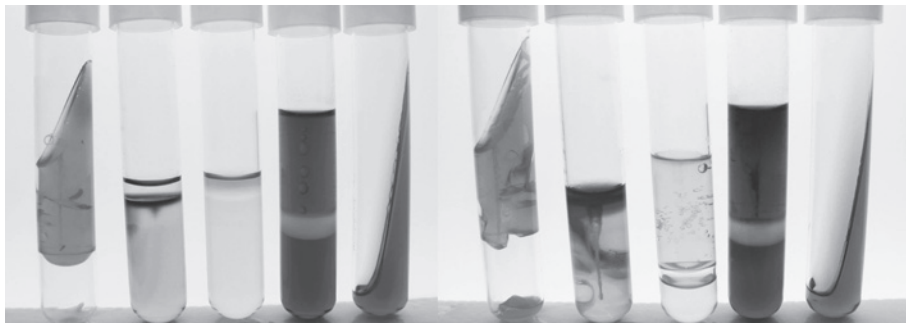
血液培養には BacT/ALERT SN および BacT/ALERT SA ボトルを用い、自動血液培養装置は BacT/ALERT 3D (シスメックス・ビオメリュー) にて培養した。第1病日の救急外来で2セット採取された血液培養は、4本中3本陽性となった。グラム染色ではグラム陰性桿菌を認め、形態からは腸内細菌科が疑われた。培養陽性までの時間は17~26時間と有意な延



好気環境下培養

5%CO₂ガス環境下培養

図1. BTB 培地を用いた培養結果 (24 時間培養)



好気環境下培養

5%CO₂ガス環境下培養

左から TSI・SIM・VP・OLMI・CIT 培地

図2. 試験管培地による生化学的性状

長は認めなかった。分離培養は羊血液寒天培地（極東製薬）を5%CO₂ガス環境下、BTB寒天培地（極東製薬）を好気環境下にて35℃で約18時間培養した。羊血液寒天培地にはsmooth型で非溶血性コロニーの発育を認めたが、BTB寒天培地には発育を認めなかった。第26病日の血液培養では2セット提出中、4本中1本が陽性となり、第1病日の血液培養から分離された同様の菌が分離された。

同定および薬剤感受性試験は、全自動同定感受性測定装置 MicroScan WalkAway96SI を使用し、同定感受性試験パネル NBP6.23J（シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス）を使用した。試験の結果、24時間では発育を認めず、48時間後に発育不良となった。5%CO₂ガス培養を行なった羊血液寒天培地に発育し、好気培養を行ったBTB寒天培地に発育を認め

なかったためCO₂要求株であることを疑い、BTB寒天培地に菌を接種後、5%CO₂ガス培養を行なったところ、乳糖分解陽性の黄色コロニーの発育を認めた（図1）。以上より、CO₂の存在が菌の発育に関与していると考えられた。そこでTSI培地、SIM培地、VP培地、OLMI培地、シモンズ・クエン酸ナトリウム培地（すべて栄研化学ポアメディア）を用いた手法による生化学的性状確認試験を、好気環境下と5%CO₂ガス環境下にてそれぞれ35℃、18時間培養を行なった（図2）。好気培養ではTSIのみに反応を示したものの、その他は反応を示さなかった。CO₂ガス環境下ではTSI（+/+）、インドール（+）、運動性（+）、VP反応（-）、リジン（+）、オルニチン（+）、シモンズ・クエン酸ナトリウム（-）と*E. coli*様の性状を示した。CO₂要求性の菌である事が示唆されたため、

表 3. 5%CO₂ ガス環境下における薬剤感受性結果

薬剤名	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	判定
Ampicillin (ABPC)	>16	R
Piperacillin (PIPC)	>64	R
Cefazolin (CEZ)	16	I
Cefotiam (CTM)	≤ 8	S
Cefotaxime (CTX)	≤ 8	S
Ceftazidime (CAZ)	≤ 8	S
Cefepime (CFPM)	≤ 8	S
Cefpirome (CPR)	≤ 8	S
Cefozopran (CZOP)	≤ 8	S
Cefaclor (CCL)	≤ 8	S
Cefditoren pivoxil (CDTR-PI)	≤ 1	S
Cefdinir (CFDN)	≤ 1	S
Cefcapene pivoxil (CFPN-PI)	1	S
Cefmetazole (CMZ)	≤ 16	S
Flomoxef (FMOX)	≤ 8	S
Clavulanic acid/amoxicillin (CVA/AMPC)	$\leq 8/4$	S
Tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC)	≤ 16	S
Sulbactam/cefoperazone (SBT/CPZ)	$\leq 16/8$	S
Aztreonam (AZT)	≤ 8	S
Imipenem/cilastatin (IPM/CS)	≤ 4	S
Meropenem (MEPM)	≤ 4	S
Faropenem (FRPM)	≤ 1	S
Gentamicin (GM)	≤ 4	S
Amikacin (AMK)	≤ 16	S
Tobramycin (TOB)	≤ 4	S
Minocycline (MINO)	≤ 4	S
Levofloxacin (LVFX)	>4	R
Ciprofloxacin (CPFX)	>2	R
Sulfamethoxazole/trimethoprim (ST)	$\leq 2/38$	S
Fosfomycin (FOM)	≤ 4	S

S : susceptible I : intermediate R : resistant

再度同定感受性試験パネル NBP6.23J を用い、5%CO₂ ガス環境下にて 35°C 18 時間培養後、自動同定感受性測定装置 MicroScan autoSCAN-4 (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス) による試験判定を行った。同定試験では *E. coli* (同定確率 99.9% バイオタイプ 73115012) と同定され、薬剤感受性試験結果では ampicillin (ABPC), piperacillin (PIPC), SBT/ABPC, levofloxacin (LVFX) に耐性 (R) を示した (表 3)。ディスク拡散法における薬剤感受性試験は、ミュラーヒントン寒天培地 (日本 BD) を用い、CLSI に準じて菌接種し、35°C 18 時間培養を行なった。好気条件下では菌の発育を認めず判定不能であったが、5%CO₂ ガス環境下では菌の発育を認め阻止円の計測

が可能となり、液体希釈法と同様に ABPC, PIPC, SBT/ABPC, LVFX に R (耐性) を示した (図 3)。

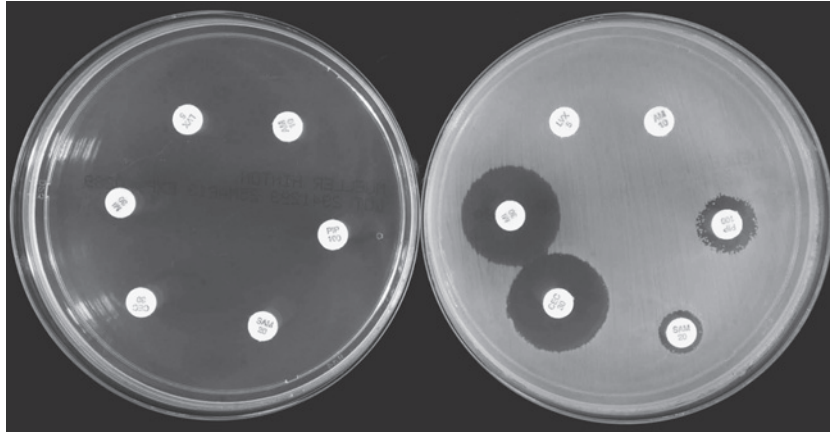
また、質量分析装置 MALDI バイオタイパーによる菌種同定検査と 16S rRNA 遺伝子の塩基配列による菌種推定を行った結果、MALDI バイオタイパーでは同定スコア 2.2 にて *E. coli* MB1464_1 CHB と同定され、16S rRNA 遺伝子解析においても *E. coli* ATCC 11775T に対し 99% (1441/1450 bp) と高い相同性を示すことがわかった。MALDI バイオタイパーと 16S rRNA 遺伝子による同定試験では、*E. coli* と *Shigella* sp. を区別することはできないが、前述の生化学的性状確認試験の乳糖および白糖の分解性から、本菌株は *E. coli* であると同定された。

考 察

本症例は、CO₂ 要求性という特徴をもつ *E. coli* による感染症であったが、胆管炎および菌血症に特異な臨床経過は示さなかった。本菌株は第 1 病日の血液培養から分離され、さらに第 26 病日の胆管炎増悪時にも血液培養から分離されたことより、本菌が生体内で長期間感染していたと考えられた。SCVs は野生株よりも長期間細胞内に生存可能という報告¹⁴⁾や、抗菌薬の影響を受けにくく、再発を繰り返す治療難例が多いと報告されている¹¹⁾¹⁵⁾。本分離株は抗菌薬に対し比較的良好な薬剤感受性を有していたにも関わらず、生体内で長期間感染していた原因は、この SCVs による治療抵抗性に起因していた可能性がある。

本分離株の分離当初、発育に CO₂ が必須であったため、同定感受性結果を報告するまでに通常よりも大幅な時間を要してしまった。臨床検体からの菌の分離培養方法は、施設の規模等の違いにより異なるのが現状であり、本分離株が CO₂ ガス培養環境を持たない施設で分離された場合、死菌や嫌気性菌と誤って考えられる可能性がある。また、本分離株は、血液培養好気ボトル SN および嫌気ボトル SA で発育し得た。血液培養好気ボトル SN および嫌気ボトル SA 中に含まれるガス環境についてシスメックス・バイオメリュ社に問い合わせたところ、濃度は教えられないとのことだが、それぞれの培養ボトルにはある濃度の CO₂ ガスが含まれているとの回答が得られた。ガス濃度は不明であるが、培養ボトル中の CO₂ ガスが、本菌株の発育の一因となったと考えられる。

試験管培地を用いた生化学的性状試験で、好気環境下で TSI のみ反応を示した原因は不明であった。しかし、5%CO₂ ガス環境下における、試験管培地での生化学的性状試験や、同定感受性試験パネル NBP6.23J



好気環境下培養

5%CO₂ガス環境下培養

図3. ディスク拡散法による薬剤感受性試験 (18時間培養)

を用いた同定試験では、両者とも *E. coli* の性状を示す結果が得られ、生化学的性状を必要としない質量分析装置 MALDI-Biotyper と 16S rRNA 遺伝子配列による同定試験結果と一致した。CO₂要求性となった SCVs の同定試験には、CO₂ガス環境下における生化学的性状試験や質量分析装置による同定試験、もしくは遺伝子学的同定試験が有用であると考えられた。

薬剤感受性試験については、薬剤感受性試験に及ぼす CO₂濃度の影響について考えなくてはならない。薬剤感受性試験における CO₂濃度が及ぼす Mueller Hinton broth (MH broth) の pH への影響はすでに知られており、CO₂濃度上昇によって起こる pH 低下により aminoglycoside と quinolone, erythromycin は MIC 高値を示し、penicillin は MIC 低値を示すとされている¹⁶⁾¹⁷⁾。宇田川らによる培養環境下の CO₂ガス濃度と MH broth の pH の関係について検討した結果では、CO₂濃度が5%の場合、MH broth の pH は72時間後も大きな変化は認められなかったが、CO₂濃度が15%の場合、72時間で pH が0.61低下し、clarithromycin の MIC が高値となると報告している¹⁸⁾。以上の報告より、本菌株に対し実施した5%CO₂ガス環境下での薬剤感受性試験では、MH broth の pH への影響は少ないと考えられ、Clinical and Laboratory Standards Institute に準じた方法と変わらない試験結果が得られたと考えられる。本菌株の LVFX に対する MIC 値が高かったことは、キノロン耐性遺伝子 *qnr* の保有や、DNA ジャイレースもしくはトポイソメラーゼ IV の変異によるものが推測された¹⁹⁾。

E. coli の発育には代謝基質として CO₂の存在が必

須であり、様々な小分子の生合成や脂肪酸生合成時に必要といわれており²⁰⁾²¹⁾通常、菌自身の産生する CO₂を利用して様々な生合成を行なっている。大気中の CO₂濃度はおおよそ0.038%であり、通常の *E. coli* はこの大気中の CO₂濃度で発育可能である。本菌株は5%CO₂濃度で発育が認められたことから、発育に必要な CO₂濃度は0.038~5%であることが推測された。この濃度を分圧に換算すると、発育に必要な CO₂分圧は0.29~38 mmHg となる。生体内における血液ガス中の CO₂分圧は通常35~45 mmHg であり、本菌株の発育に必要な CO₂分圧を満たすことから、生体内において長期間感染が可能であったと推測された。

発育に CO₂を要求する菌は、各種細菌の SCVs として少数例報告されているが、原因については未だ解明されていない。本症例の SCVs を誘発した原因との関連性は不明であるが、本菌分離の約4ヶ月前に誤嚥性肺炎+尿路感染症に対して SBT/CPZ 1g×2を5日間、SBT/ABPC 1.5g×3を10日間、TAZ/PIPC 2.25g×4を15日間、延べ30日間の抗菌薬長期投与がなされていた。SCVs の誘発原因として *S. aureus* では gentamicin や sulfamethoxazole-trimethoprim の長期投与の関連性³⁾¹⁵⁾が報告されている。また腸内細菌科でもアミノグリコシド系抗菌薬の投与との関連性が報告⁴⁾⁵⁾されているが、本症例においてはこれら薬剤の投与歴は認められなかった。

ルーチン検査において、塗抹陽性・培養陰性となった場合、CO₂要求性 SCVs の存在を考慮して検査を行う必要がある。また、CO₂要求性 SCVs に遭遇した際の同定・薬剤感受性試験には、本症例にて実施した

CO₂ ガス環境下での試験が有用であると考えられる。

文 献

- 1) Balwit, JM, P van Langevelde, JM Vann, et al. 1994. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *J. Infect. Dis.* 170: 1033-1037.
- 2) Kahl, BC, G Belling, R Reichelt, et al. 2003. Thymidine-Dependent Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus* Exhibit Gross Morphological and Ultrastructural Changes Consistent with Impaired Cell Separation. *J. Clin. Microbiol.* 41: 410-413.
- 3) 中本幸子. 2009. マンニト食塩培地に集落形成し損なう Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* small-colony variants の性状. *米子医誌* 60: 89-96.
- 4) 山崎堅一郎. 1986. 尿由来, Catalase-Negative *Citrobacter freundii* に関する検討. *感染症学雑誌* 60 (8): 824-828.
- 5) Funada, H., K. Hattori, N. Kosakai. 1978. Catalase-Negative *Escherichia coli* Isolated from Blood. *J. Clin. Microbiol.* 7 (5): 474-478.
- 6) 山本雅恵, 川畑大輔, 塚原みゆき, 他. 2005. 好気培養で発育遅延となり Methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci と誤同定された Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *日臨微誌* 11: 126-133.
- 7) Brookes, G., J Barker. 1980. The Carbon dioxide Requirement *Klebsiellae*. *J. Med. Microbiol.* 13: 31-36.
- 8) Oana, K, M Yamaguchi, M Nagata, et al. 2013. First Isolation of Carbon Dioxide-Dependent *Proteus mirabilis* from an Uncomplicated Cystitis Patient with Sjögren's Syndrome. *Jpn. J Infect. Dis.* 66: 241-244.
- 9) Eykyn, S., I. Phillips. 1978. Carbon dioxide-dependent *Escherichia coli*. *BMJ (British Medical Journal)* 1 (6112): 576.
- 10) Borderon, E, T Horodniceanu. 1978. Metabolically deficient dwarf-colony mutants of *Escherichia coli* deficiency and resistance to antibiotics of strains isolated from urine culture. *J. Clin. Microbiol.* 8: 629-634.
- 11) Trülzsch, K, H Hoffmann, C Keller, et al. 2003. Highly Resistant Metabolically Deficient Dwarf Mutant of *Escherichia coli* Is the Cause of a Chronic Urinary Tract Infection. *J. Clin. Microbiol.* 41 (12): 5689-5694.
- 12) Colwell, CA. 1946. Small colony variants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 52: 417-422.
- 13) Roggenkamp, A, A Sing, M Hornf, et al. 1998. Chronic prosthetic hip infection caused by a small-colony variant of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2530-2534.
- 14) Schroder, A, R Kland, A Peschel, et al. 2006. Live cell imaging of phagosome maturation in *Staphylococcus aureus* infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes. *Med Microbiol Immunol.* 195: 185-194.
- 15) Proctor, RA, C von Eiff, BC. Kahl, et al. 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature Reviews Microbiology* 4: 295-305.
- 16) 三澤成毅, 小栗豊子, 狩野 淳. 1992. 市販嫌気培養法の薬剤感受性成績に及ぼす影響. *嫌気性菌感染症研究* 22: 58-65.
- 17) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 18th Informational Supplement. M100-S23, CLSI, Wayne, PA, USA.
- 18) 宇田川宏和, 宍戸秀喜, 伊藤 武, 他. 1999. マイクロプレートを用いた微量液体希釈法での *Helicobacter pylori* 薬剤感受性試験における CO₂ 濃度培養条件の検討. *感染症誌* 73: 65-69.
- 19) 平井啓二. 2005. キノロン系薬の作用機序と耐性機構研究の歴史. *日本科学療法学会雑誌* 53 (6): 349-356.
- 20) Merlin, C, M Masters, S McAteer, et al. 2003. Why is Carbonic Anhydrase Essential to *Escherichia coli*? *J. Bacteriol.* 185 (21): 6415-6424.
- 21) Repaske, R., M.A. Clayton. 1978. Control of *Escherichia coli* Growth by CO₂. *J. Bacteriol.* 135 (3): 1162-1164.

Carbon dioxide-dependent *Escherichia coli* isolated from a sepsis patient
with cholangitis: a case report

Masaru Takamizawa¹⁾, Takehisa Matsumoto²⁾, Hironobu Nakamura³⁾, Tatsuro Mitsuhashi³⁾,
Yuki Takamatsu¹⁾, Ryosuke Kato¹⁾, Katsuko Notake¹⁾, Masae Uehara¹⁾, Maki Omori¹⁾,
Emi Yagasaki¹⁾, Kyoko Ide¹⁾

¹⁾Department of Laboratory Medicine, Saku Central Hospital

²⁾Department of Laboratory Medicine, Shinshu University Hospital

³⁾Department of General Medicine, Saku Central Hospital

Small-colony variants (SCVs) constitute a slow-growing subpopulation of bacteria with distinctive phenotypic and pathogenic traits. Atypical colony morphology and altered biochemical profile may lead to failure in identification of SCV strains. We here report for the isolation of an *Escherichia coli* SCV phenotype from a sepsis patient with cholangitis. A gram-negative bacterium from blood culture was isolated in pure culture. Gram-negative, rod-shaped organisms failed to grow on BTB agar incubated in ambient air. On the other hand, the isolate grew on BTB agar under 5%CO₂ gas condition. It was the typical features of a SCV. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems (Bruker Daltonics) and 16S rRNA sequencing identified the bacterium as *Escherichia coli*. We failed to identify the *E. coli* isolate or determine its antimicrobial susceptibilities using the MicroScan WalkAway 96SI (Siemens Healthcare Diagnostics) System because the isolate did not grow in the system. However, we were able to obtain results of identification and antimicrobial susceptibilities by under 5%CO₂ gas condition. To our knowledge, this is the first clinical isolation of capnophilic *E. coli* in Japan.