

[症例報告]

アスペルギローマ患者の喀痰及び肺組織より *Serratia marcescens* の
Small-Colony Variant を検出した 1 症例

太田悠介¹⁾・松本竹久²⁾・春日恵理子²⁾・堀内一樹²⁾

根岸達哉²⁾・矢口ともみ²⁾・名取達矢²⁾

¹⁾ 信州大学大学院医学系研究科保健学専攻

²⁾ 信州大学医学部附属病院臨床検査部

(平成 26 年 9 月 4 日受付, 平成 26 年 11 月 21 日受理)

肺アスペルギローマと診断された患者の喀痰及び肺左上葉組織より *Serratia marcescens* small-colony variant (SCV) が分離された。本菌株は発育が遅く小型のコロニーを形成し, triple sugar iron 培地 (栄研) での発育性からブドウ糖非発酵菌と推定された。WalkAway 96 Plus System (SIEMENS) を用いた MicroScan Neg Combo 6.11J (SIEMENS) パネルによる同定検査では *Yersinia enterocolitica* group と同定された。後日 16S rRNA 遺伝子配列解析と質量分析装置 MALDI Biotyper (Bruker) による同定検査の結果, *S. marcescens* と同定された。薬剤感受性検査では, *S. marcescens* が本来自然耐性を示す抗菌薬の内, 微量液体希釈法では ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefaclor, cefmetazole と colistin に, ディスク拡散法では ampicillin, ampicillin/sulbactam と cefaclor に感性を示した。

SCVs 感染症例では, 治療に有効な抗菌薬を推定する上で菌種の同定が重要であり, 同定検査については遺伝子学的検査や質量分析法による検査が有用と考えられる。

Key words: Small Colony Variants, *Serratia marcescens*, 16S rRNA, MALDI Biotyper

序 文

Small-colony variants (SCVs) は, 発育が遅く小型のコロニーを形成する変異株の総称であり, *Staphylococcus aureus*¹⁾, *Escherichia coli*²⁾ や *Pseudomonas aeruginosa*³⁾ など様々な菌種において分離例が報告されている。SCVs は持続性や再発性の感染症を引き起こすが, その非典型的な性状から同定・薬剤感受性検査が困難となり, 日常検査を行う上で問題視されている⁴⁾。

Serratia marcescens は腸内細菌科に属する通性嫌気性のグラム陰性桿菌で, 塵埃や水中など自然界だけでなく, 医療環境にも存在する菌であり, 呼吸器感染,

創傷感染, 血流感染や尿路感染などの感染症を引き起こし, 致命的な経過をとることがある。

今回, 喀痰及び肺組織より triple sugar iron (TSI) 培地 (栄研) にてブドウ糖非発酵の性状を示し, 同定・薬剤感受性パネルである MicroScan Neg Combo 6.11J (SIEMENS) にて *Yersinia enterocolitica* group と誤同定された *S. marcescens* の SCV を分離したので報告する。

症 例

患 者: 50 代, 男性。

主 訴: 肺左上葉の腫瘍。

既往歴: 肺結核 (左上葉部分切除術施行)。

現病歴: 入院 1 年前に胸部 X 線検査にて肺の腫瘍を指摘されたが, 気管支鏡検査では異常所見を認めず, 喀痰抗酸菌塗抹の蛍光染色および喀痰抗酸菌培養検査とともに陰性であった。1 年後に実施した胸部 CT 検査においても肺の腫瘍が認められ, 手術目的で入院した。抗菌薬は手術の予防投与として imipenem

著者連絡先: (〒390-8621) 長野県松本市旭 3-1-1
国立大学法人信州大学医学部附属病院
松本竹久
TEL: 0263-37-3493
FAX: 0263-37-5316
E-mail: ggatcc@shinshu-u.ac.jp

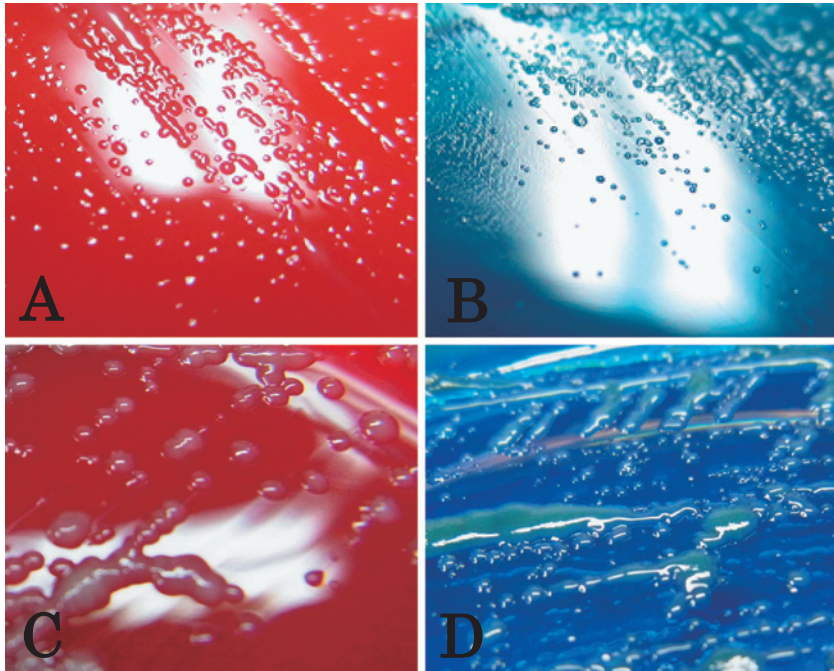


Fig. 1. Microscopic observation of *S. marcescens* isolate colonies
A: Sheep blood agar for 24 h, B: BTB agar for 24 h, C: Sheep blood agar for 48 h, D: BTB agar for 48 h.

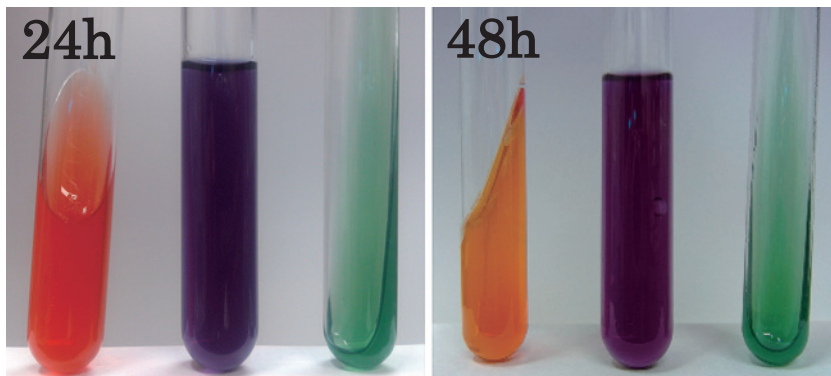


Fig. 2. Growth observation of *S. marcescens* isolate of TSI agar, LIM agar and Simmon's citrate agar

(IPM) 1.5 g/day を手術当日から4日間使用された。術前の喀痰培養検査より *Aspergillus* sp. と発育が非常に遅いグラム陰性桿菌が分離され、術後の肺腫瘍組織における病理診断ではアスペルギローマと診断されたが、細菌培養では同様のグラム陰性桿菌のみ分離された。術後の喀痰及び胸水培養検査は陰性となり術後経過良好のため退院となった。

細菌学的・遺伝子学的検査

1. 塗抹検査

術前の喀痰及び肺組織の塗抹標本について、Bart-holomew & Mittwer 変法 (Wako) によるグラム染色を実施し、喀痰より糸状菌とグラム陰性桿菌、肺組織より同様のグラム陰性桿菌が観察された。

2. 培養検査

術前の喀痰培養より起因菌疑いでグラム陰性桿菌と

Aspergillus sp. がそれぞれ 2+ と 1+ で分離され、その他常在菌として *α-Streptococcus* spp., *Neisseria* sp., *Haemophilus* sp. と *Bacillus* sp. が分離された。肺組織の培養検査では喀痰で分離された菌と同様のグ

ラム陰性桿菌が単独で分離された。術前の喀痰及び肺組織より分離されたグラム陰性桿菌を、ヒツジ血液寒天培地 (BD) と BTB 乳糖加寒天培地 (BD) に塗抹後、35℃、好気条件下で培養を行い、24 時間培養後に直径 0.2~0.4 mm の小型コロニーを形成し、48 時間培養後に一部赤色色素産生性を示す大小不同コロニーを形成した (Fig. 1)。また栄養最小発育培地である Davis Minimal Agar (DMA) (SIGMA-ALDRICH) では菌発育が認められなかった。

Table 1. Biochemical reactions of *S. marcescens* isolate

Biochemical tests	Results	Expected reactions ⁹⁾
Glucose	+	+
Sucrose	+	+
Sorbitol	+	+
Raffinose	-	-
Rhamnose	-	-
Arabinose	-	-
Inositol	-	+
Adonitol	+	D
Melibiose	-	-
Mannose	-	-
Urea hydrolysis	-	-
Hydrogen sulfide	-	-
Indole production	-	-
Lysine decarboxylase	-	+
Arginine dihydrolase	-	-
Ornithine decarboxylase	+	+
Esculin hydrolysis	-	+
Voges-Proskauer	+	+
Citrate (Simmons)	-	+
Malonate utilization	-	-
o-Nitrophenyl-β-galactoside	-	+

3. 生化学的同定検査

TSI 培地, lysine indole motility (LIM) 培地 (栄研) とシモンズ・クエン酸ナトリウム培地 (栄研) を用いた生化学的性状の検査では、35℃、好気条件下で 24 時間培養後に TSI 培地の高層部は赤色を示しブドウ糖非発酵性と判定されたが、48 時間培養では TSI 培地の高層部が黄変しブドウ糖発酵性と判定された (Fig. 2)。MicroScan Neg Combo 6.11J による同定検査では、バイオタイプ 70201102、同定確率 99.99% で *Y. enterocolitica* group が挙げられた (Table 1)。

4. 増殖曲線

ミュラーヒントンブロス (BD) に *S. marcescens* SCV 株と *S. marcescens* 野生株を接種して 35℃、好気条件下で振盪培養を実施し、0、3、6、9、12、15、18、27、36 時間培養後に 600 nm の波長で培養液の透過度を測定して増殖曲線をプロットした (Fig. 3)。SCV 株は培養 27 時間後に、野生株は培養 12 時間後に定常状態となった。

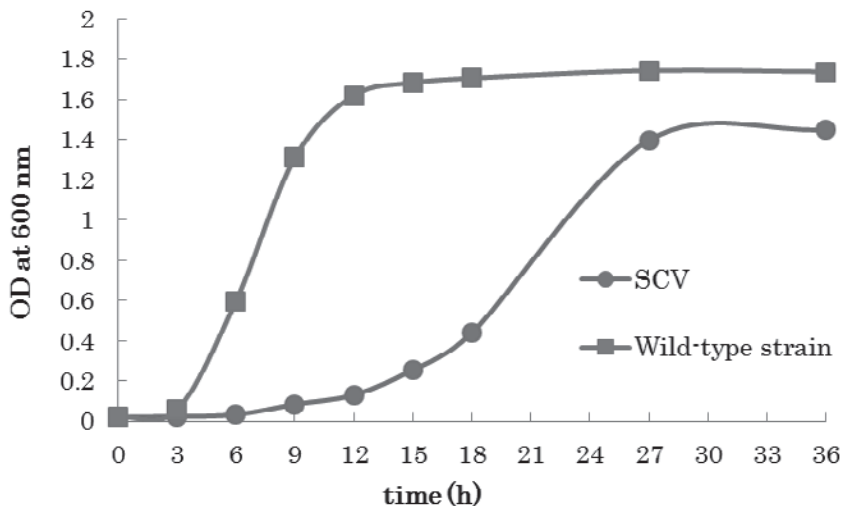


Fig. 3. Growth kinetics of *S. marcescens* SCV and *S. marcescens* wild-type strain

Table 2. Antimicrobial susceptibility results of *S. marcescens* isolate by broth microdilution method

Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	18 h	36 h
Ampicillin	≤ 4 S	≤ 4 S
Piperacillin	≤ 8 S	≤ 8 S
Cefazolin	4 I	16 R
Cefotiam	≤ 8 S	≤ 8 S
Ceftazidime	≤ 4 S	≤ 4 S
Cefpirome	≤ 2 S	≤ 2 S
Cefaclor	≤ 8 S	16 I
Cefmetazole	≤ 16 S	≤ 16 S
Flomoxef	≤ 4 S	≤ 4 S
Amoxicillin/clavulanic acid	$\leq 8/4$ S	$\leq 8/4$ S
Cefoperazone/sulbactam	$\leq 16/8$ S	$\leq 16/8$ S
Aztreonam	≤ 4 S	≤ 4 S
Imipenem	≤ 8 S	≤ 8 S
Gentamicin	≤ 2 S	≤ 2 S
Amikacin	≤ 4 S	≤ 4 S
Minocycline	≤ 2 S	≤ 2 S
Ciprofloxacin	0.5 S	1 S
Levofloxacin	≤ 0.5 S	≤ 0.5 S
Sulfamethoxazole/trimethoprim	$\leq 2/38$ S	$\leq 2/38$ S
Colistin	≤ 2 S	≤ 2 S

5. 遺伝子学的検査

一夜培養後のヒツジ血液寒天培地より得られたコロニーからDNAを抽出した。シークエンス反応にはBig Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life technologies)を用い、測定はABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Life technologies)により行った。得られたDNA配列をBLAST及びRibosomal Database Project IIにて相同性解析を行った結果、*S. marcescens*と99.7% (1487/1492 bp)の相同性を示した。

6. 質量分析法による同定検査

一夜培養後のヒツジ血液寒天培地より得られたコロニーを、エタノール・ギ酸抽出法で処理し、MALDI Biotyper 3.1 (Bruker)を用いてReal Time Classificationによる検査を行った。本検査ではスコアが2.0以上であると菌種レベルで信頼性が高い結果であることを示し、スコアが1.7以上2.0未満であると属レベルで信頼性が高い結果であることを示すが、被検菌株のマススペクトルパターンと類似する波形がデータベース上に存在しない場合スコアが1.7未満となりnot reliable identificationと判定される。本分離株の検査の結果、スコア2.345で*S. marcescens*、スコア1.971で*Serratia entomophila*、スコア1.943で*Serratia fi-*

Table 3. Antimicrobial susceptibility results of *S. marcescens* isolate by disk diffusion method

Antibiotic	Diameter (mm)	
	18 h	36 h
Ampicillin	24 S	22 S
Piperacillin	32 S	32 S
Cefazolin	14 R	14 R
Ceftazidime	32 S	32 S
Cefepime	34 S	34 S
Cefaclor	20 S	16 I
Cefmetazole	22 S	10 R
Ampicillin/sulbactam	22 S	22 S
Cefoperazone/sulbactam	32 S	32 S
Aztreonam	42 S	42 S
Imipenem	34 S	34 S
Gentamicin	32 S	32 S
Amikacin	30 S	30 S
Minocycline	16 S	16 S
Levofloxacin	24 S	24 S
Sulfamethoxazole/trimethoprim	22 S	22 S

caria が挙げられた。

7. 薬剤感受性検査

微量液体希釈法による薬剤感受性検査を実施し、培養18時間後と36時間後のMICを測定した (Table 2)。またCLSI M100-S23に準拠したディスク拡散法を実施し、ampicillin (ABPC), piperacillin, cefazolin, ceftazidime, cefpirome, cefaclor (CCL), cefmetazole (CMZ), ampicillin/sulbactam (ABPC/SBT), cefoperazone/sulbactam, aztreonam, IPM, gentamicin, amikacin, minocycline, levofloxacinと sulfamethoxazole/trimethoprimについて培養18時間後と36時間後に阻止円を測定した (Table 3)。両検査では、CLSI M100-S23に準拠した判定基準を用いて評価を行った。セフィナーゼディスク (BD) による β -ラクタマーゼ産生能の検査では、 β -ラクタマーゼ産生が確認された。

考 察

本菌株は喀痰と肺の膿瘍より分離され、同部を切除して以降一度も検出されず、膿瘍形成の原因菌の1つであると考えられた。本症例では既往の肺結核による肺組織の破壊及び同部の部分切除術施行により、肺組織に抗菌薬が移行しにくい環境ができ、何らかの経路から *Aspergillus* sp. と *S. marcescens* に感染したと推測した。またSCVsは生物活性が弱いため免疫応答を受けにくく、体内で死滅せず生き残りやすいという

特徴から、持続性や再発性の感染症を引き起こすと考えられており⁴⁾、本症例においても同様の理由にて、肺の部分切除術施行まで本菌による感染症が持続した可能性が考えられた。

SCVs はある代謝経路の異常によりその代謝産物を合成出来ず、栄養素の要求性を示すことで発育不良や発育遅延となり、日常検査において誤同定や見落としの要因となると考えられている⁴⁾。本菌株は、通常 S. marcescens が発育する栄養最小培地である DMA に発育が認められなかったことから、何らかの栄養素を要求することが示唆された。その為、生化学的同定検査に使用した培地やミュラーヒントン培地には、本分離株の発育に必要な因子が十分含まれず、発育不良を示すことで本来 S. marcescens が陽性を示す複数の検査項目が陰性となり、妥当な同定・薬剤感受性結果が得られなかったと推測した。また S. marcescens SCV の増殖速度は、S. marcescens 野生株の増殖速度と比較し定常状態となるまで 2 倍程度の時間を要し、24 時間培養後の TSI 培地におけるブドウ糖非発酵の所見は、本変異株の発育遅延が原因と考えられた。

遺伝子学的検査では、S. marcescens と 99.7% の相同性を示し、MALDI Biotyper を用いた同定検査では、スコア 2.345 で S. marcescens が挙げられ、その他の候補はスコア 2.0 未満であったことから菌種同定に至った。質量分析法による同定検査は、主に生命維持に必須の情報高分子であるリボソームタンパクのピークパターンを照合するため⁶⁾、菌の発育性状や生物活性の変化による影響を受けずに正しい検査結果が得られたと考えられた。

CLSI に準拠した 18 時間判定による薬剤感受性検査を行ったところ、S. marcescens が本来自然耐性を示す抗菌薬の内、微量液体希釈法では ABPC, amoxicillin/clavulanic acid, CCL, CMZ と colistin (CL) に、ディスク拡散法では ABPC, ABPC/SBT と CCL に感性を示した。また増殖曲線での結果を踏まえ、菌の増殖が定常状態となった 36 時間で判定を行うと、微量液体希釈法では CCL に、ディスク拡散法では CCL と CMZ に耐性を示したが、ABPC, β -ラクタマーゼ阻害剤配合抗菌薬と CL は感性を示した。 β -ラクタム系抗菌薬に感性を示した原因として、発育の悪い本菌株に対して腸内細菌科に準じた検査方法が適していない可能性や、発育の悪さが β -ラクタマーゼ産生量に影響を与えている可能性などが考えられたが原因は不明であった。また CL は標的となる lipid A の特異的修飾、抗菌薬の分解や抗菌薬排出ポンプの活性化により耐性化すると報告されており^{7)~9)}、本分離株では生

物活性の低下によりこれらの耐性機構が働かなかった可能性が示唆された。

本菌株のような SCV の薬剤感受性検査では、発育遅延や生物活性の低下により、妥当性を欠く検査結果となる可能性が示された。本分離株に対する抗菌薬の選択は、治療に有効な抗菌薬を推定する上で菌種の同定が重要であり、同定検査については現在のところ遺伝子学的検査や質量分析法による検査が有用と考えられる。

本研究は「公益信託臨床検査医学研究振興基金」平成 25 年度研究奨励金の助成を受けたものである。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) Swingle, E.L. 1935. Studies on Small Colony Variants of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 29 (5): 467-489.
- 2) Colwell, C.A. 1946. Small Colony Variants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 52 (4): 417-422.
- 3) Häussler, S, B Tümmeler, H Weissbrodt, et al. 1999. Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Clin. Infect. Dis. 29 (3): 621-625.
- 4) Proctor, R.A., C. von Eiff, B.C. Kahl, et al. 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nat. Rev. Microbiol. 4 (4): 295-305.
- 5) Farmer, J.J, B.R Davis, F.W Hickman-Brenner, et al. 1985. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 21 (1): 46-76.
- 6) 寺本華奈江, 佐藤浩昭. 2008. 質量分析法によるバクテリアの迅速同定・分類法の進歩. 日本質量分析学会 56 (3): 83-90.
- 7) Guina, T, E.C Yi, H Wang, et al. 2000. A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. J. Bacteriol. 182 (14): 4077-4086.
- 8) Gunn, J.S. 2008. The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. Trends. Microbiol. 16 (6): 284-290.
- 9) Tzeng, Y.L, K.D Ambrose, S Zughaier, et al. 2005. Cationic antimicrobial Peptide Resistance in *Neisseria meningitidis*. J. Bacteriol. 187 (15): 5387-5396.

Characterization of small-colony variant of *Serratia marcescens*
isolated from a patient with pulmonary aspergilloma

Yusuke Ota¹⁾, Takehisa Matsumoto²⁾, Eriko Kasuga²⁾, Kazuki Horiuchi²⁾,
Tatsuya Negishi²⁾, Tomomi Yaguchi²⁾, Tatsuya Natori²⁾

¹⁾Department of Health and Medical Sciences, Shinshu University, Nagano, Japan

²⁾Department of Laboratory Medicine, Shinshu University Hospital, Nagano, Japan

Serratia marcescens small-colony variant (SCV), which showed atypical colony morphology, was isolated from the sputum and lung tissue of a patient with pulmonary aspergilloma. Non-fermentation of glucose was determined with triple sugar iron agar slant. However, MicroScan WalkAway 96 Plus System identified the isolate as *Yersinia enterocolitica* group. The isolate was identified as *S. marcescens* by sequence analysis of the 16S rRNA gene and MALDI Biotyper system. Although *S. marcescens* is known to have natural resistance to various antibiotics, current isolate was susceptible to ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefaclor, cefmetazole and colistin by the broth microdilution or disk diffusion method. *S. marcescens* SCV made it difficult to obtain reliable results in antimicrobial susceptibility test. The bacterial identification of SCV is important for selection of effective antibiotics.