

[総 説]

*Staphylococcus aureus* の small-colony variants

松本竹久・堀内一樹・根岸達哉

信州大学医学部附属病院臨床検査部

(平成 27 年 10 月 29 日受付)

*Staphylococcus aureus* の small-colony variants (SCVs) は様々な感染症にて分離され、また持続性・再発性感染症にも関与するとされる。SCVs とは抗菌薬や環境因子などの何らかの影響により選択され、代謝等に関する遺伝子に異常が生じ栄養要求性を示すようになった細菌の亜集団を指す。臨床微生物では、アミノグリコシド系抗菌薬やスルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤、フルオロキノロン、フシジン酸、トリクロサンなど様々な抗菌薬に耐性を示す SCVs の報告がなされてきた。また近年、ヘミン、メナジオン、そしてチミジン依存性の SCVs に対する原因メカニズムが解明され、さらに SCVs は宿主に対し強い免疫反応を誘発せずに、自身の感染を持続させ得ることが分かってきた。

本稿では、*S. aureus* SCVs について、栄養要求性、変異メカニズムなどの基本的事項から検査に関する事項について紹介する。

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, Small-colony variants, 栄養要求性

はじめに

Small-colony variants (SCVs) とは、正常型と比べてゆっくり発育する栄養要求性細菌の亜集団を指す<sup>1)</sup>。Dwarf colony variants と呼ばれてきた SCVs は 1910 年に Jacobsen より *Salmonella Typhi* において最初に報告された<sup>2)</sup>。その後、*Escherichia coli* や *Shigella* 属、*Vibrio* 属、*Bacillus* 属、*Corynebacterium* 属<sup>3)</sup>、*Serratia marcescens*<sup>4)</sup>、*Neisseria gonorrhoeae*<sup>5)</sup>、*Pseudomonas aeruginosa*<sup>6)</sup>、*Burkholderia cepacia*<sup>7)</sup>、*Stenotrophomonas maltophilia*<sup>8)</sup> などの多くの臨床細菌において報告されてきた。慢性細菌感染症などにおいて抗菌薬などの環境因子の選択圧により、ハウスキーピング遺伝子に突然変異を生じた SCVs が選択される<sup>9)~11)</sup>。電子伝達系に関与する遺伝子への変異はアミノグリコシド系抗菌薬に耐性を示すようになり、ATP の合成が不足し菌の発育は遅くなるが、生じた変異により通常とは異なる代謝や発育性となることで

宿主側の防御に対し、抵抗性が増すことがある<sup>12)</sup>。

*Staphylococcus aureus* は通常血液寒天培地に特徴的なコロニーを形成する。しかし稀に長期間、抗菌薬が投与された患者検体より、通常と異なる小型のコロニーを形成する *S. aureus* SCVs が分離されることがある<sup>13)14)</sup>。*Staphylococcus* 属菌における SCVs の報告は *S. aureus* のみでなく、*S. lugdunensis*<sup>15)</sup> と、*S. capitis*、*S. epidermidis*<sup>16)</sup> についても報告されてきた。かつて臨床微生物学者が報告してきた内容は SCVs についての散発的な症例報告と栄養要求性を解析したわずかな報告のみであった<sup>17)18)</sup>。また私の知る限り、本邦での最初の報告は谷本らによる敗血症患者から分離された MRSA SCVs の報告である<sup>19)</sup>。当時の報告の中では SCV という言葉は使用していないが、2005 年にはチミジン依存性の MRSA であったことと、チミジン依存性 SCV の特徴を詳細に報告している<sup>20)</sup>。そして 1994 年以來 Proctor ら<sup>21)</sup> が分子レベルで *S. aureus* SCV 株の病原性と生物学的特徴を解析したことで、SCVs の新しい時代が始まることとなった。現在までに様々な栄養要求を示す SCVs についての分子メカニズムや病原性についての解析が行われ、*S. aureus* SCVs は何十年にも渡り宿主に持続感染することなども明らかにされてきた<sup>12)</sup>。

著者連絡先：(〒390-8621) 長野県松本市旭 3-1-1  
信州大学医学部附属病院臨床検査部  
松本竹久  
TEL: 0263-37-3493  
FAX: 0263-34-5316

表1. 各栄養要求性 *S. aureus* SCVs における感染症

SCVsの栄養要求性	感染症	引用文献
CO <sub>2</sub>	骨髄炎	Gómez-González et al. <sup>40)</sup> , Proctor et. al. <sup>21)</sup>
	脊椎椎間板炎	Gómez-González et al. <sup>40)</sup>
	縦隔炎	Gómez-González et al. <sup>40)</sup>
	創傷感染	Gómez-González et al. <sup>40)</sup>
	器具関連感染	Gómez-González et al. <sup>40)</sup> , Proctor et. al. <sup>21)</sup>
ヘミン	骨髄炎	Proctor et. al. <sup>21)</sup>
	器具関連感染	Proctor et. al. <sup>21)</sup>
	呼吸器感染	Kahl et al. <sup>14)</sup>
メナジオン	骨髄炎	Proctor et. al. <sup>21)</sup>
	筋膿瘍, 敗血症性関節炎	Proctor et. al. <sup>21)</sup>
	器具関連感染	Proctor et. al. <sup>21)</sup>
	呼吸器感染	Kahl et al. <sup>14)</sup> , Besier et al. <sup>10)</sup>
チミジン	軟部腫瘍感染	Besier et al. <sup>11)</sup>
	中耳炎	Besier et al. <sup>11)</sup>
	心内膜炎	Besier et al. <sup>11)</sup>
	呼吸器感染	Kahl et al. <sup>14)</sup> , Besier et al. <sup>11)</sup>

本稿では SCVs のコロニー所見の写真を掲載しているが、コロニーの大小といった培地への発育性は、例え同じ栄養を要求する SCVs であっても生じている遺伝子変異箇所や変異の程度により差が生じると考えられる。そのため、本稿で示す SCVs のコロニー写真の所見が絶対的な所見ではないことをご理解いただきたい。

#### 臨床検査における *S. aureus* SCVs の分離と同定

正常な *S. aureus* の表現型に対して、SCVs は発育に栄養要求を示す。*S. aureus* SCVs は正常な株に比べ、発育に栄養を要求するため、一般的に病原性が弱い株であると考えられがちであるが、これまでに様々な感染症の原因菌として分離されている (表1)。また SCVs は非色素性もしくは、非溶血、目玉焼き状コロニー、ピンポイントコロニーの形成といった特徴を持って分離されることが多い (図1, 2)。このような非典型的なコロニー形態に加え、SCVs は通常生化学的性状についても、性状の欠落もしくは減弱 (例えばマンニトール食塩寒天培地に非発育など) といった特徴を持つことが多いため、生化学的性状による同定検査で誤同定されてしまうことがあるので注意が必要である<sup>22)</sup>。臨床微生物学者は、こういった SCVs の通常とは異なる形態学・生理学的特徴の原因を追究してきた<sup>23)</sup>。

SCVs の要求する栄養を調べる方法に栄養要求性試験がある。栄養要求性試験の方法は、通常被験 SCVs

株が発育しなかった寒天培地を用い、薬剤感受性試験の Disk 試験法と同様の手技にて、菌を培地に接種し、空 disk に栄養要求に該当すると疑われる各種化合物を適当な濃度で染み込ませ、適切な培養条件下にて培養を行う。培養後、特定の disk 周囲にのみ菌の発育が観察されれば、その disk に含有された化合物は被験菌株の発育に必要な化合物であると確認できる (図3)。

SCVs の分裂速度は正常な *S. aureus* のおよそ 1/9 であるため、正常な *S. aureus* が存在した場合見逃されやすい<sup>1)</sup>。またコアグラゼ試験に偽陰性を示す *S. aureus* SCVs の存在も報告があり、同定検査は、菌種特異的遺伝子 *nuc* や *coa* など DNA 配列を用いた同定解析を行い、*S. aureus* を確認するべきとされている<sup>24)</sup>。また、私たちは日常検査において遺伝子検査よりも簡易に SCVs を同定する方法はないかと考え、近年普及しつつある MALDI-TOF MS による SCVs の同定が可能であるか確認するため、チミジン依存性 *S. aureus* SCVs に対する MALDI-TOF MS による同定検査の有用性を検討した<sup>25)</sup>。その結果、生化学的性状検査では同定に至らなかったチミジン依存性 SCVs はすべて正しく *S. aureus* と同定結果が得られることが分かった (表2)。今後、検査室にて同定が曖昧で正しく同定されてこなかった SCVs の報告が MALDI-TOF MS により正しく同定報告されることが期待される。

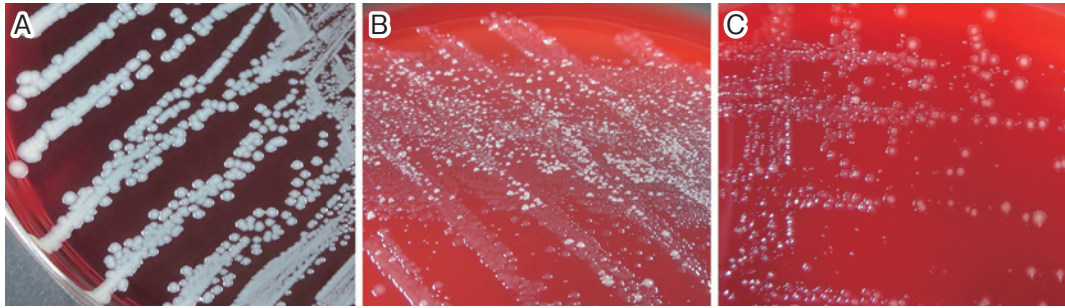


図1. ヒツジ血液寒天培地上の *S. aureus* SCV のコロニー  
*S. aureus* ATCC 25922 (A), 正常型コロニーと色素の薄い大小不同のコロニーの混在 (B), 色素の薄い大小不同のコロニー (C)

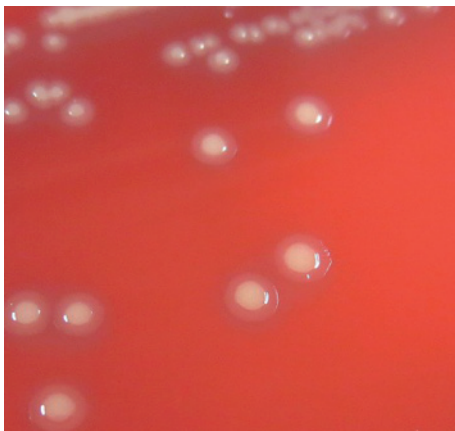


図2. ヒツジ血液寒天培地上に発育した *S. aureus* SCV の目玉焼き状のコロニー

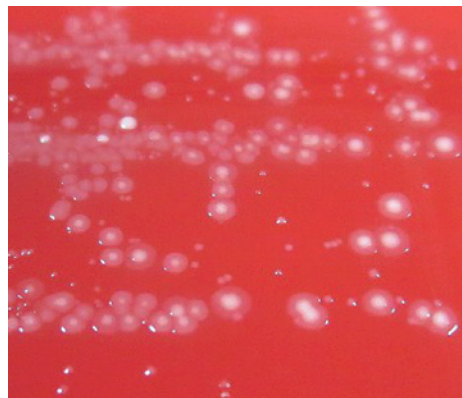


図4. ヒツジ血液寒天培地上に発育したチミジン依存性 *S. aureus* SCV の目玉焼き状のコロニーと大小異なるコロニー

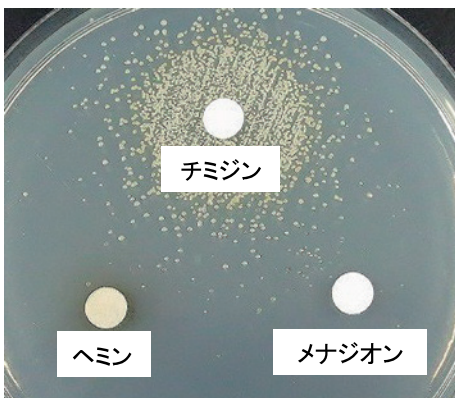


図3. ミュラーヒントン寒天培地を用いた栄養要求性試験  
 チミジン含有 disk 周囲に菌の発育が確認され、チミジン依存性 *S. aureus* であることが確認された。

#### 様々な栄養要求性を示す *S. aureus* SCVs

*S. aureus* は *in vitro*<sup>26)27)</sup> と *in vivo*<sup>27)28)</sup> にて突然変異や抗菌薬により誘導された変異に由来する亜集団を生じることがある<sup>29)</sup>。SCVs は生じた遺伝子変異により生合成系もしくは代謝系の活性が低下することで世代時間が遅延するためコロニー形成に時間を要することになる。そのため、正常の *S. aureus* よりも小さいコロニー形成となることから、small-colony variants と名付けられるようになった。しかし SCVs を含んだ細菌集団は長期間の抗菌薬の投与などによる選択圧をかけられると、その細菌集団において変異した細菌の数が親株と比較して増加する。そのためその後提出された臨床検体からは SCVs が優位に分離されることになる。

##### 1. チミジン依存性 *S. aureus* SCVs

チミジン依存性 *S. aureus* は長期間 ST 合剤で治療されてきた患者検体より分離され得り<sup>30)</sup>、欧米では肺



表2. 生化学的性状検査と遺伝子検査, MALDI Biotyper によるチミジン依存性 *S. aureus* SCVs の同定検査結果 (文献 25 より抜粋し一部編集)

Strain	Identification by biochemical tests <sup>a</sup>	16S rRNA sequence	MALDI Biotyper			
			Formic acid extraction		Ethanol-formic acid extraction	
			Identification	Score <sup>b</sup>	Identification	Score
SCV1	Not determined	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	2.358	<i>S. aureus</i>	2.341
SCV2	Not determined	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	2.25	<i>S. aureus</i>	2.301
SCV3	Not determined	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	2.386	<i>S. aureus</i>	2.307
SCV4	Not determined	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	2.23	<i>S. aureus</i>	2.304
SCV5	Not determined	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	2.35	<i>S. aureus</i>	2.352
SCV6	Not determined	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	2.301	<i>S. aureus</i>	2.338

<sup>a</sup> MicroScan Pos Combo 3.1J or 1T were used.

<sup>b</sup> Score $\geq$ 2.0 : probable species identification, 1.7 $\leq$ Score $<$ 2.0 : probable genus identification, Score $<$ 1.7 : not reliable identification.

嚢胞性繊維症患者の慢性気道感染に関連するとされている<sup>27,31</sup>。ST 合剤の作用機序はテトラヒドロ葉酸の合成の妨げである。テトラヒドロ葉酸はウラシルからチミジンへの変換を行うチミジル酸合成酵素に対する補因子としての機能を有する。つまり ST 合剤はテトラヒドロ葉酸の合成を妨げることにより、間接的に DNA であるチミジンの合成を妨げ、菌の増殖を抑える。しかし、チミジン依存性 SCVs は細胞外に存在するチミジンを細胞内に取り込むことで生存することが可能である。通常臨床検体から分離されるチミジン依存性 SCVs の発育に必要なチミジンは感染組織における細胞の分解や膿から提供されていると考えられている<sup>30</sup>。

チミジン依存性 *S. aureus* SCVs は一般的にヒツジ血液寒天培地上にて特徴的な目玉焼き状のコロニー所見 (図 2) や大小不同のコロニー形成を示す (図 4) とされており<sup>22</sup>、光学顕微鏡や電子顕微鏡においても、大小不同の細胞像を示すことが報告されている<sup>32</sup>。

また、臨床検査におけるチミジン依存性 SCVs の最大の特徴は、薬剤感受性検査用培地である Mueller-Hinton 培地に発育しないことである<sup>33</sup>。薬剤感受性検査を実施したが菌が発育してこないことを経験してきた微生物検査技師は少なくないと思われる。この現象の一部にチミジン依存性 SCVs が含まれる。チミジン依存性 SCVs が Mueller-Hinton 培地へ発育しない理由は、薬剤感受性検査用プロスである Mueller-Hinton プロスの組成にある。Mueller-Hinton プロスの組成は、肉浸出物とカゼイン酸加水分解物、デンプンが含まれているが、チミジンが ST 合剤の感受性検査に影響を及ぼすこと<sup>34</sup>を理由に極力チミジン含有量を減らした組成となっている。一般細菌の多くはチミジン

を合成できるため、Mueller-Hinton 培地に発育可能であるが、チミジン依存性 SCVs であるチミジン合成能を失った細菌は、外界からチミジンを取り込まなければ DNA を合成できず、複製が行えないため発育することができない。よって、チミジン依存性 SCVs は Mueller-Hinton プロスを使用した一般的な薬剤感受性試験では発育することができないため、通常薬剤感受性結果を得ることができない。一方で、*S. aureus* は MRSA であるか否かを調べることは感染症治療上重要なことである。臨床細菌検査では、MRSA か否かを判断する一般的な手段として、セフォキシチンに対する感受性検査法が挙げられる。*S. aureus* については、Mueller-Hinton プロスもしくは寒天培地を用いて、セフォキシチンに対する薬剤感受性検査を実施することが求められるが、チミジン依存性 *S. aureus* SCVs は発育することができないため、セフォキシチンに対する感受性結果を得ることができないという問題点が生じている<sup>33</sup>。

## 2. ヘミン, チアミン, メナジオン依存性 *S. aureus* SCVs

メナジオン, ヘミン, チアミンは電子伝達系に関わるタンパク質の生合成に必要な化合物である。メナジオンは、電子伝達系において電子の授受に関与するメナキノンを形成するためにイソプレニル化される。ヘミンはメナキノンの電子の授受と、電子伝達鎖を完結するシトクロームの生合成において必要とされる。チアミンはメナジオン生合成に必要な化合物であるため、チアミン依存性 SCVs はメナジオン依存性でもあるということになる。

Schaaffら<sup>35</sup>はアミノグリコシド誘導性 SCVs を用いた実験を行い、アミノグリコシド系抗菌薬がヘミン

依存性 SCV の形成に関与することを示した。ヘミン、チアミン、メナジオン依存性 SCVs の多くは、アミノグリコシド系抗菌薬治療を受けた患者から分離されている<sup>36)37)</sup>。

Lannergård ら<sup>29)</sup>は抗菌薬治療を受けた患者から分離されたメナジオン依存性 SCV と野生株について解析を行った。そしてメナジオン依存性 SCV において、メナキノン生合成に関連する *menB* における変異とゲンタマイシンに対する MIC の上昇を確認した。また培養を繰り返すことでメナジオンに依存しない復帰変異株を検出している。当施設にて分離されたメナジオン依存性 *S. aureus* SCV は野生型の *S. aureus* と異なり BTB 寒天培地への発育をほとんど認めない (図 5)。

Jonsson ら<sup>38)</sup>は、*hemB* 変異株とその親株を用いたマウスの敗血症性関節炎モデル作製し、ヘミン依存性 SCVs の病原性を調べた。その結果、親株に比較して *hemB* 変異株は高頻度で重症な関節炎を生じ、SCV によるプロテアーゼ産生量が 20 倍上昇していたことから病原性が高くなったと考察されている。同じく Brouillette ら<sup>39)</sup>は、*hemB* 変異 SCV を用いた実験において、*hemB* 変異 SCV は *in vivo* において効率的な定着は減るものの、第 1 世代セフェム系抗生物質による抗菌薬圧をかけることで感染が親株よりも 100 倍持続したと報告している。当施設にて分離されたヘミン依存性 *S. aureus* SCV はメナジオン依存性 SCV (図 5) と異なり、BTB 寒天培地に小さいコロニーを形成した (図 6)。

### 3. CO<sub>2</sub>依存性 *S. aureus* SCV

Gómez-González ら<sup>40)</sup>は、一つの大学病院において様々な感染症患者から分離された CO<sub>2</sub>依存性 *S. aureus* SCVs (表 1) の様々な病原遺伝子等の保有を調べた結果、SCVs も病原因子を保有していたことから、感染症の原因として注意しなくてはならないことを報告している。また CO<sub>2</sub>依存性の MRSA による感染症例も報告されている<sup>41)</sup>。通常の薬剤感受性検査法ではコントロールウェルに菌が発育せず、MRSA であるか否かの判断や薬剤感受性検査結果を得ることができないため、CO<sub>2</sub>依存性 SCVs については大気培養と炭酸ガス培養の環境下で検査することで見逃しがなくなるとされている。また、Hamson ら<sup>42)</sup>は、ある診療科において CO<sub>2</sub>依存性の MRSA によるアウトブレイクが生じたことを報告している。当施設にて分離された CO<sub>2</sub>依存性 *S. aureus* SCV のコロニー所見を図 7 に示す。5%CO<sub>2</sub>ガス環境下において培養すると正常型と同様のコロニーを形成するが、大気ガス環境下に

て培養を実施すると発育できずコロニー形成が確認できない。

## SCVs 表現型の原因となる分子メカニズム

### 1. チミジン依存性 *S. aureus* SCVs

チミジン依存性の分子メカニズムは Beier ら<sup>10)43)</sup>と Chatterjee ら<sup>44)</sup>により同定され、チミジン依存性 SCVs は thymidylate synthase gene (*thyA*) に変異が存在することが示された。*thyA* の遺伝子変異は様々な箇所において欠失・挿入・点変異が確認されており hot spot は存在していない。また、Chatterjee らは *thyA* 変異株において正常型の *thyA* での補完と、その SCV の表現型の正常型への変換を実験的に確認し、*thyA* における遺伝子変異がチミジン依存性 SCVs の原因メカニズムであることを証明している<sup>44)</sup>。

### 2. メナジオン依存性 *S. aureus* SCVs

Lannergård ら<sup>29)</sup>は、メナジオン依存性 SCVs のメナキノン合成経路に関与する *men* オペロンのシーケンス解析を行い、2 株の SCVs の *menB* に 9 bp の欠失変異、フレームシフト変異、アミノ酸置換を生じる点突然変異が存在していたことを確認し、この *menB* における遺伝子変異がメナジオンに対する要求性の原因と考えたことを報告している。

### 3. ヘミン依存性 *S. aureus* SCVs

Schaaff ら<sup>35)</sup>は、ヘミン依存性 SCV のヘム合成に関与する *hem* オペロン全体の DNA 配列を解析し、*hemH* に欠失変異が存在したことを報告している。また、von Eiff ら<sup>45)</sup>は実験的に *hemB* に変異を導入した *S. aureus* 株を作製し、その SCV 株がヘミン依存性 SCV の表現型とアミノグリコシドへの耐性を示すことを明らかにした。

### 4. CO<sub>2</sub>依存性 *S. aureus* SCVs

CO<sub>2</sub>依存性となる原因メカニズムは未だに分かっていない。

## *S. aureus* SCVs の薬剤感受性

*S. aureus* の SCVs は親株よりもいくつかの種類は抗菌薬に耐性となることがある。多くの SCVs の場合、アミノグリコシドもしくはスルホンアミドのどちらかに耐性を示す。ヘミンもしくはメナジオン依存性の *S. aureus* は通常アミノグリコシド系抗菌薬に耐性を示す。電子伝達系の異常により、細胞膜内へのアミノグリコシド系抗菌薬の取り込みが減少することが原因と考えられており、ゲンタマイシンに対し高い MIC をしたと報告されている<sup>46)</sup>。この原因の一つに電気化学勾配の異常がアミノグリコシドなどの抗菌薬の

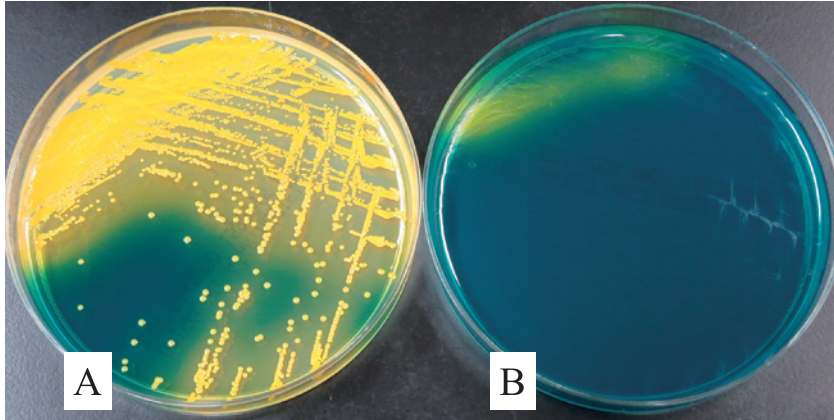


図5. BTB 寒天培地上でのメナジオン依存性 *S. aureus* SCV  
*S. aureus* ATCC 25922 (A), メナジオン依存性 *S. aureus* (B)

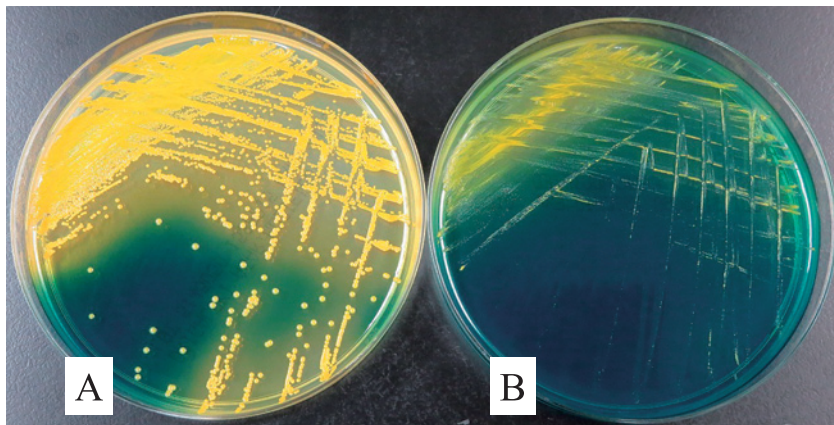


図6. BTB 寒天培地上でのヘミン依存性 *S. aureus* SCV  
*S. aureus* ATCC 25922 (A), ヘミン依存性 *S. aureus* (B)

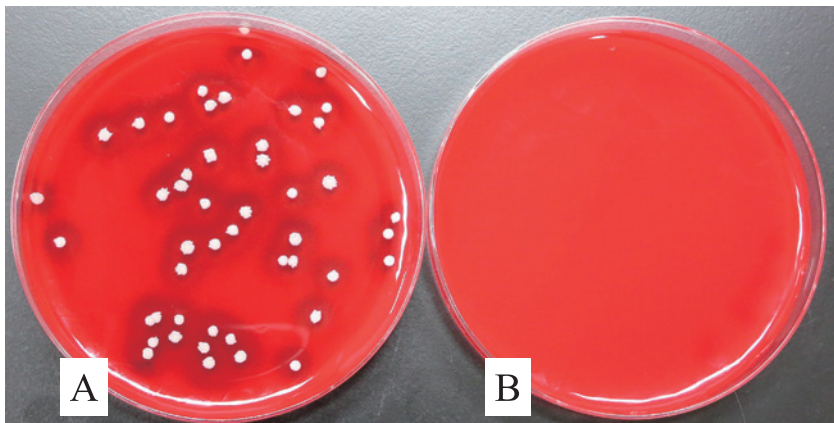


図7. ヒツジ血液寒天培地上での  $\text{CO}_2$  依存性 *S. aureus* SCV  
 5%  $\text{CO}_2$  ガス環境下で培養した  $\text{CO}_2$  依存性 *S. aureus* (A), 大気ガス環境下で培養した  $\text{CO}_2$  依存性 *S. aureus* (B)



ような荷電をもつ分子の細胞膜内への取り込みに関係していると考えられている<sup>47)</sup>。

またすでに述べたように ST 合剤は間接的に細菌のチミジン合成を阻害するが、チミジン依存性 *S. aureus* SCVs は細胞外からチミジンを取り込むため ST 合剤へ耐性をしめす<sup>1)</sup>。

### S. aureus SCVs に対する薬剤感受性試験

SCVs は遅発育や栄養要求性を示すことから、日常検査における薬剤感受性試験結果を得ることは困難である。*S. aureus* SCVs は正常な *S. aureus* と混在して分離されることが多いが、その同時に分離された正常な *S. aureus* の薬剤感受性結果が SCV の感受性を反映するかは定かではない。また SCVs が復帰する株であった場合、薬剤感受性試験を実施した菌液の中で SCVs の性状が復帰してしまうと SCVs の本来の感受性を知ることは難しくなってしまう。SCVs に対する Disk 拡散法、Etest、微量液体希釈法、自動感受性試験システムによる感受性試験や抗 PBP2a ラテックス凝集試験といった臨床検査では、正しい結果が得られない場合があることを覚えておかなければならない<sup>48)49)</sup>。また *S. aureus* SCVs に対する MRSA 検査法は、分子生物学的方法による *mecA* の検出や抗 PBP2a ラテックス凝集試験に用いる接種菌量を増やして実施するといったことが必要な場合がある<sup>48)49)</sup>。

チミジン依存性菌についての薬剤感受性試験は前述したように、Muller-Hinton 培地にチミジンが含まれないためチミジン依存性菌は発育せず、試験の判定をすることができない。そこで私たちはチミジン依存性 *S. aureus* SCVs についての MRSA 検査として国内で販売されている MRSA スクリーニング培地の有用性を検討した<sup>50)</sup>。その結果、チミジン依存性 MRSA SCVs は多くのメーカーの培地に発育せず、検出できないことが分かった。そして発育に必要なチミジンを添加した改良スクリーニング培地を調整し同様に検討したところ、検出できなかった各種メーカーの MRSA スクリーニング培地にてチミジン依存性 MRSA SCVs が検出できるようになった。今後さらに臨床検査室にて *S. aureus* SCVs に対し正しく MRSA と判定できる改良 MRSA 検査法の検討が望まれる。

### おわりに

*S. aureus* は分離頻度が高く、様々な感染症を引き起こすことから長期に抗菌薬投与される頻度も増えることとなり SCVs として検出される頻度も高いと考えられる。いまだ栄養要求性が不明な *S. aureus* SCVs

が臨床検体から分離されることから、これら SCVs に対する正しい検査結果を得ていくためにはさらなる SCVs の基礎的な研究が必要である。

発育は悪いが感染症の原因となる *S. aureus* の small-colony variants、主にチミジン依存性 *S. aureus* についてのメカニズム、検査、最近のトピックスについて述べた。Small-colony variants は、培地を観察している臨床検査技師にしか見つけることができないため、SCVs 研究は臨床検査技師に掛かっているといっても過言ではない。今後、臨床検査技師による SCVs の知見が増えていくことに期待したい。

### 文 献

- 1) Proctor, RA, C von Eiff, BC 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.
- 2) STOKES, JL, HG BAYNE. 1958. Dwarf colony mutants of *Salmonellae*. *J Bacteriol.* 76 (2): 136-141.
- 3) 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 (6): 629-634.
- 4) Koh, KS, KW Lam, M Alhede, et al. 2007. Phenotypic diversification and adaptation of *Serratia marcescens* MG1 biofilm-derived morphotypes. *J Bacteriol.* 189 (1): 119-130.
- 5) Morton, HE, J Shoemaker. 1945. The Identification of *Neisseria gonorrhoeae* by Means of Bacterial Variation and the Detection of Small Colony Forms in Clinical Material. *J Bacteriol.* 50 (5): 585-587.
- 6) 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.
- 7) Häussler, S, I Ziegler, A Löttel, et al. 2003. Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J Med Microbiol.* 52 (Pt 4): 295-301.
- 8) Anderson, SW, JR Stapp, JL Burns, et al. 2007. Characterization of small-colony-variant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from the sputum specimens of five patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 45 (2): 529-535.
- 9) Oliver, A, R Cantón, P Campo, et al. 2000. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science.* 288 (5469): 1251-1254.

- 10) Besier, S, C Smaczny, C von Mallinckrodt, et al. 2007. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Microbiol.* 45 (1): 168-172.
- 11) Besier, S, J Zander, E Siegel, et al. 2008. Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants: human pathogens that are relevant not only in cases of cystic fibrosis lung disease. *J Clin Microbiol.* 46 (11): 3829-3832.
- 12) Proctor, RA, B Kahl, C von Eiff, et al. 1998. Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clin Infect Dis.* 27 (Suppl 1): S68-74.
- 13) Proctor, RA, JM Balwit, O Vesga. 1994. Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infect Agents Dis.* 3 (6): 302-312.
- 14) Kahl, B, M Herrmann, AS Everding, et al. 1998. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 177 (4): 1023-1029.
- 15) Seifert, H, D Oltmanns, K Becker, et al. 2005. *Staphylococcus lugdunensis* pacemaker-related infection. *Emerg Infect Dis.* 11 (8): 1283-1286.
- 16) von Eiff, C, P Vaudaux, BC Kahl, et al. 1999. Bloodstream infections caused by small-colony variants of coagulase-negative staphylococci following pacemaker implantation. *Clin Infect Dis.* 29 (4): 932-934.
- 17) GOUDIE, JG, RB GOUDIE. 1955. Recurrent infections by a stable dwarf-colony variant of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Pathol.* 8 (4): 284-287.
- 18) THOMAS, ME. 1955. Studies on a CO<sub>2</sub>-dependent staphylococcus. *J Clin Pathol.* 8 (4): 288-291.
- 19) 谷本綾子, 北垣良憲, 日浦 節, 他. 1995. 敗血症患者から検出した fried egg 状集落を呈する Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *臨床病理* 43 (10): 1061-1065.
- 20) 谷本綾子, 藤原弘光, 田中祐子, 他. 2005. 見逃されやすいチミジン依存性 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* の性状. *日臨微誌* 15 (4): 179-186.
- 21) Proctor, RA, P van Langevelde, M Kristjansson, et al. 1995. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 20 (1): 95-102.
- 22) Melter, O, B Radojevič. 2010. Small colony variants of *Staphylococcus aureus*—review. *Folia Microbiol (Praha)* 55 (6): 548-558.
- 23) Proctor, RA, G Peters. 1998. Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Infect Dis.* 27 (3): 419-422.
- 24) Becker, K, D Harmsen, A Mellmann, et al. 2004. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol.* 42 (11): 4988-4995.
- 25) Ota, Y, T Matsumoto, M Sugano, et al. 2015. Identification of Clinical Thymidine-Dependent Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus* by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rinsho Byori.* 63 (6): 683-687.
- 26) Massey, RC, A Buckling, SJ Peacock. 2001. Phenotypic switching of antibiotic resistance circumvents permanent costs in *Staphylococcus aureus*. *Curr Biol.* 11 (22): 1810-1814.
- 27) Kriegeskorte, A, NI Lorè, A Bragonzi, et al. 2015. Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCVs) are induced by trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) and have an increased fitness during SXT challenge. *Antimicrob Agents Chemother.* pii: AAC.00742-15. [Epub ahead of print].
- 28) Becker, K, NA Laham, W Fegeler, et al. 2006. Fourier-transform infrared spectroscopic analysis is a powerful tool for studying the dynamic changes in *Staphylococcus aureus* small-colony variants. *J Clin Microbiol.* 44 (9): 3274-3278.
- 29) Lannergård, J, C von Eiff, G Sander, et al. 2008. Identification of the genetic basis for clinical menadione-auxotrophic small-colony variant isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 52 (11): 4017-4022.
- 30) Besier, S, J Zander, E Siegel, et al. 2008. Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants: human pathogens that are relevant not only in cases of cystic fibrosis lung disease. *J Clin Microbiol.* 6 (11): 3829-3832.
- 31) Yagci, S, G Hascelik, D Dogru, et al. 2013. Prevalence and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect.* 19 (1): 77-84.
- 32) 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 separa-



- tion. J Clin Microbiol. 41 (1): 410-413.
- 33) Gilligan, PH, PA Gage, DF Welch, et al. 1987. Prevalence of thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 25 (7): 1258-1261.
  - 34) Stokes, A, RW Lacey. 1978. Effect of thymidine on activity of trimethoprim and sulphamethoxazole. J Clin Pathol. 31 (2): 165-171.
  - 35) Schaaff, F, G Bierbaum, N Baumert, et al. 2003. Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol. 293 (6): 427-435.
  - 36) 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 (4): 1033-1037.
  - 37) Kohler, C, C von Eiff, G Peters, et al. 2003. Physiological characterization of a heme-deficient mutant of *Staphylococcus aureus* by a proteomic approach. J Bacteriol. 185 (23): 6928-6937.
  - 38) Jonsson, IM, C von Eiff, RA Proctor, et al. 2003. Virulence of a *hemB* mutant displaying the phenotype of a *Staphylococcus aureus* small colony variant in a murine model of septic arthritis. Microb Pathog. 34 (2): 73-79.
  - 39) Brouillette, E, A Martinez, BJ Boyll, et al. 2004. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. FEMS Immunol Med Microbiol. 41 (1): 35-41.
  - 40) Gómez-González, C, J Acosta, J Villa, et al. 2010. Clinical and molecular characteristics of infections with CO<sub>2</sub>-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 48 (8): 2878-2884.
  - 41) Pinto, A, J Merlino. 2011. CO<sub>2</sub>-dependent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 66 (3): 676-677.
  - 42) Hamson, C, KE Walton, J Collins, et al. 2011. Report of an outbreak of CO<sub>2</sub>-dependent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on a regional liver transplant unit. J Antimicrob Chemother. 66 (5): 1179-1181.
  - 43) Besier, S, A Ludwig, K Ohlsen, et al. 2007. Molecular analysis of the thymidine-auxotrophic small colony variant phenotype of *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol. 297 (4): 217-225.
  - 44) Chatterjee, I, A Kriegeskorte, A Fischer, et al. 2008. In vivo mutations of thymidylate synthase (encoded by *thyA*) are responsible for thymidine dependency in clinical small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 190 (3): 834-842.
  - 45) von Eiff, C, C Heilmann, RA Proctor, et al. 1997. A site-directed *Staphylococcus aureus hemB* mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. J Bacteriol. 179 (15): 4706-4712.
  - 46) von Eiff, C. 2008. *Staphylococcus aureus* small colony variants: a challenge to microbiologists and clinicians. Int J Antimicrob Agents. 31 (6): 507-510.
  - 47) Baumert, N, C von Eiff, F Schaaff, et al. 2002. Physiology and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* small colony variants. Microb Drug Resist. 8 (4): 253-260.
  - 48) Kipp, F, BC Kahl, K Becker, et al. 2005. Evaluation of two chromogenic agar media for recovery and identification of *Staphylococcus aureus* small-colony variants. J Clin Microbiol. 43 (4): 1956-1959.
  - 49) Kipp, F, K Becker, G Peters, et al. 2004. Evaluation of different methods to detect methicillin resistance in small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 42 (3): 1277-1279.
  - 50) Horiuchi, K, T Matsumoto, Y Ota, et al. 2015. Addition of thymidine to culture media for accurate examination of thymidine-dependent small-colony variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a pilot study. J Microbiol Methods. 110: 40-44.

## Small colony variants of *Staphylococcus aureus*

Takehisa Matsumoto, Kazuki Horiuchi, Tatsuya Negishi

Department of Laboratory Medicine, Shinshu University Hospital, Matsumoto, Japan

Bacterial variants of *Staphylococcus aureus* called small colony variants (SCVs) originate by mutations in metabolic genes, resulting in emergence of auxotrophic bacterial subpopulations. SCVs are resistant to various antibiotics such as aminoglycosides, trimethoprim-sulfamethoxazole, fluorquinolones, fusidic acid or triclosan. In late years, causative mechanisms for hemin, menadione and thymidine-dependent SCVs have been revealed. Clinically, small colony variants are better able to persist in mammalian cells and are less susceptible to antibiotics than their wild-type counterparts, and can cause latent or recurrent infections on emergence from the protective environment of the host cell. This review covers the auxotrophy, genetic mechanisms and clinical laboratory tests for *S. aureus* SCVs.