

[症 例 報 告]

一過性に *Shigella* spp.様の性状が得られた *Citrobacter freundii* complex 菌血症における 相同性の確認に IR バイオタイパーが有用であった 1 症例

田口 舜¹⁾・山口健太¹⁾・香月万葉¹⁾・佐野由佳理¹⁾・平野敬之¹⁾・安波道郎¹⁾

福岡麻美²⁾・塚本のはら^{3) 4)}・平田雄哉⁵⁾・藤永あずみ⁶⁾・永沢善三^{4) 7)}

¹⁾ 地方独立行政法人佐賀県医療センター好生館検査部

²⁾ 地方独立行政法人佐賀県医療センター好生館感染制御部

³⁾ 医療法人社団高邦会高木病院検査技術部

⁴⁾ 国際医療福祉大学大学院医療福祉学研究科保健医療学専攻臨床検査学分野

⁵⁾ 富士フイルム和光純薬株式会社臨床検査薬事業部臨床検査薬営業本部西日本営業部大阪営業課

⁶⁾ ブルカージャパン株式会社タルトニクス事業部アプリケーション部

⁷⁾ 国際医療福祉大学福岡保健医療学部医学検査学科

(令和 2 年 12 月 25 日受付, 令和 3 年 8 月 17 日受理)

膵臓癌に対して術後補助化学療法中の 74 歳男性。本症例の過程で 3 回の血液培養を施行し 4 株の *Citrobacter freundii* complex を検出した。しかしうち 1 株はコロニー所見が非典型的であり, バイテック 2 ブルー (バイオメリュー・ジャパン) で *Shigella* group と同定され, かつ赤痢菌免疫血清「生研」(デンカ生研) で B 群に凝集を示したため *S. flexnerii* を疑った。しかし精査目的で質量分析法と 16S rRNA 遺伝子解析を施行し, 本株を *C. freundii* complex と同定した。

本症例の過程で分離された菌株間の相同性は IR バイオタイパー (ブルカージャパン) と PFGE にて確認した。IR バイオタイパーでは 4 株中 3 株が自動算出されたカットオフ値以下となり相同性があると判断した。またこの 3 株は PFGE で同等のバンドパターンが得られたことを目視にて判断した。この 3 株には非典型的な株と典型的な株が含まれており, それらが同一株であることが IR バイオタイパーを用いて容易に推定された。

Key words: *Citrobacter freundii* complex, 菌血症, IR バイオタイパー, PFGE

序 文

Citrobacter freundii はヒト, 動物の腸内および自然界に広く分布し, 日和見感染を起こす¹⁾。薬剤耐性として染色体性 AmpC 型 β-ラクタマーゼを産生し, アンピシリンや第一および第二世代セファロスポリン系抗菌薬に自然耐性を示す。また本酵素を過剰産生することで第三世代セファロスポリン系抗菌薬にも耐性を示すことが報告されている²⁾。

従来, 感染症の原因微生物の検出には分離培養法や免疫血清法, 比色法による自動同定機器が利用されてきた。そして近年, 操作性・迅速性に優れた質量分析法を導入する施設が増加している。

疫学および病院内での水平伝播の解析においては, 菌株間の相同性の鑑別は重要である。解析法にはパルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis: PFGE), マルチローカスシーケンスタイピング (multilocus sequence

typing), 全ゲノムシーケンス (whole genome sequencing) 等が用いられるが, 検査コストが高く, かつ解析には時間を要すること, さらに臨床検査技師の技量も必要など課題も多い。日本では簡易な疫学解析を可能とする PCR-based ORF Typing (POT) 法が普及しているが対象菌は限定されている。

2018 年, ブルカージャパンより, フーリエ変換赤外線 (FT-IR) 分光システムを原理とする IR バイオタイパーが日本国内にて発売された。この IR バイオタイパーは, 操作時間・方法が簡便でかつ対象菌が限定されることがなく, 菌株間の相同性の評価が可能なシステムである³⁾。そこで, 本症例の経過にて計 4 菌株の *C. freundii* complex に対し, 日本国内で最初の解析を行ったので併せて報告する。

症 例

1. 臨床所見

患者: 74 歳, 男性。

主訴: 食思不振, 腹部膨満感, 下肢の浮腫, 下痢。

既往歴: 膵臓癌。

家族歴: 特記事項なし。

現病歴: 20XX-2 年 9 月, 膵臓癌に対する亜全胃温存膵頭十二指腸切除術を施行し, 術後補助化学療法を継続してい

著者連絡先: (〒840-8571) 佐賀県佐賀市嘉瀬町中原 400 番地
佐賀県医療センター好生館検査部
田口 舜
TEL: (0952) 24-2171
FAX: (0952) 29-4328
E-mail: taguchi-shun@koseikan.jp

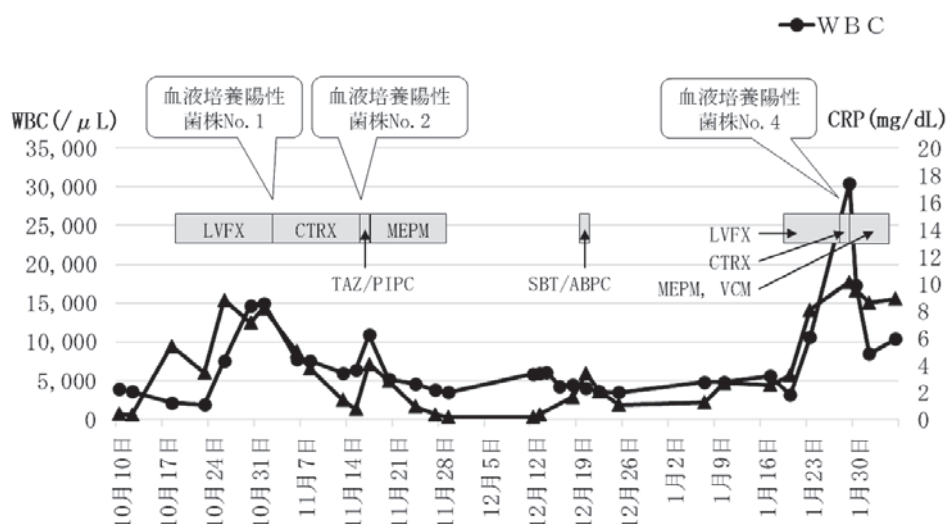


Fig 1. 臨床経過

た。20XX年9月CTで再発を疑う所見を認めた。10月後半から38℃台の発熱、食思不振、腹部膨満感、下肢の浮腫、下痢が出現したため近医にてLevofloxacin (500 mg×1/日)が投与された。11月上旬、当院を受診し腹部CTにて腹水に加えて肝臓・胆管炎の所見を認めたため、血液培養と腹水穿刺液培養を行い、*Citrobacter freundii* complexを検出した。入院時の検査所見では白血球数10,900/μL、CRP 4.1 mg/dLと炎症反応の上昇を認め、Ceftriaxone (CTR) (2 g×1/日)が14日間投与された。

入院15日目に下部消化管内視鏡検査を施行、同日夜間に悪寒を伴う39.3℃の発熱を認め、下部消化管内視鏡検査に伴うバクテリアトランスロケーションを疑い、血液培養が採取された。血液培養から小型のグラム陰性桿菌が検出されTazobactam/Piperacillin (4.5 g×3/日)を開始したがAmpC型β-ラクタマーゼ産生（以下AmpC産生）菌であることが判明したためMeropenem (MEPM) (0.5 g×4/日)に変更した。後に本菌もまた*C. freundii* complexであることが判明した。

11月下旬、症状が軽快したため退院となった。20XX+1年1月下旬、CTで肝臓・胆管炎の増悪、その後血圧低下、血小板数低下を認め、DICの疑いにて入院となり血液培養にて*C. freundii* complex, *Staphylococcus epidermidis* (MRSE)を検出したため、MEPM (0.5 g×4/日)、Vancomycin (1 g×2/日)が14日間投与された。その後腹水より*Stenotrophomonas maltophilia*が検出され、Sulfamethoxazole-Trimethoprim (ST合剤)を7日間投与し症状安定のため他院に転院となったが翌月に死亡した (Fig 1)。

2. 細菌学的検査所見

便宜上、11月上旬の血液培養から検出されたグラム陰性桿菌（糖分解：+、AmpC産生：-）を菌株No. 1、約2週間CTRが投与された後に血液培養から検出された小型で乳糖非分解のグラム陰性桿菌（糖分解：-、AmpC産生：+）を菌株No. 2とした。菌株No. 2の培養を延長することで乳糖分解性を有する亜集団のグラム陰性桿菌（糖分解：+、AmpC産生：+）を認めたので本菌を菌株No. 3とした。1

月下旬の血液培養から検出されたグラム陰性桿菌（糖分解：+、AmpC産生：+）を菌株No. 4として以後報告する。

血液培養検査は、SA好気用ボトル（バイオメリュージャパン）、SN嫌気用ボトル（バイオメリュージャパン）を1セットとし、BacT/ALERT 3D微生物培養検査システム（バイオメリュージャパン）で2セット実施した。

試験管培地は、TSI寒天培地（TSI、栄研化学）、SIM培地（SIM、栄研化学）、VP半流動培地（VP、栄研化学）、OIML培地（栄研化学）、シモンズ・クエン酸ナトリウム培地（栄研化学）を用い、性状はlactose/sucrose fermentation (lac/suc), glucose fermentation (glu), hydrogen sulfide production (H₂S), gas production (GAS), indolepyruvic acid production (IPA), motility (Mot), indole production (Ind), Voges-Proskauer reaction (VP), Ornithine decarboxylase activity (Orn), Lysine decarboxylase activity (Lys), ability to use sodium citrate (Cit)を判定した。

1) コロニー所見

菌株No. 1はドリガルスキー改良寒天（BTB）培地（日水製薬）を用いて35℃の好気条件で約24時間培養した結果、乳糖分解を示す黄色のS型コロニーを認めた (Fig 2a)。菌株No. 2は菌株No. 1と同じ培養条件にて、乳糖非分解を示す青白色の小さなS型コロニーを認めた (Fig 2b)。Fig 2bを培養延長すると、培養72時間後に黄色のS型コロニーを亜集団的に認めた (Fig 2c)。その株を分離すると菌株No. 1と類似した黄色の大きなS型コロニー（菌株No. 3）が得られた。菌株No. 4のコロニー所見は菌株No. 1、No. 3と類似していた。

2) 同定検査

菌種同定はバイテック2ブルー（VITEK2、バイオメリュージャパン）、質量分析計バイテックMS（VITEK-MS、バイオメリュージャパン）、16S rRNA遺伝子解析を用いた。

VITEK2の同定結果は機器が提示した菌名を、VITEK-MS、16S rRNA遺伝子解析の同定結果は機器が*C. freundii*・*C. braakii*・*C. gillenii*・*C. murlinae*・*C. rodentium*・*C. sedlakii*・*C. werkmanii*・*C. youngae*のいずれかを提示したも

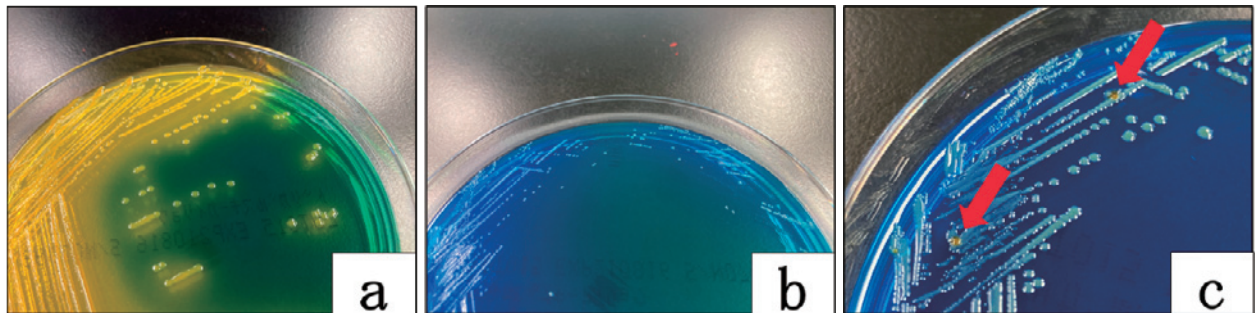


Fig 2. BTB 培地上の集落
a. 菌株 No. 1, b. 菌株 No. 2, c. 培養延長した b

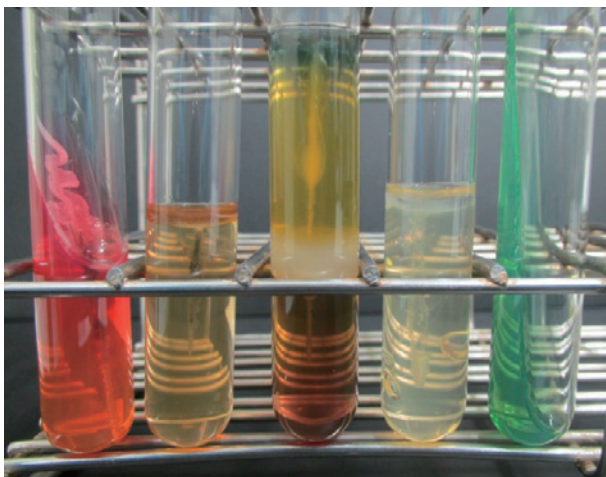


Fig 3. 菌株 No. 2 の試験管培地
左より TSI, SIM (Ind 試薬滴下後), OIML 培地, VP (VP 試薬滴下後), シモンズ・クエン酸ナトリウム培地。判定結果は+ : positive, - : negative, w : weak reaction として表記した。
lac/suc (-), glu (+), H₂S (w), GAS (w), IPA (-), Mot (-), Ind (-), Orn (-), Lys (-), VP (-), Cit (-)

のを *C. freundii* complex と変換した。

菌株 No. 1, No. 3, No. 4 は VITEK2 で *C. freundii* と同定された。追加試験として VITEK-MS, 16S rRNA 遺伝子解析を施行したところ, *C. freundii* complex と同定され VITEK2 との相関が得られた。菌株 No. 2 は VITEK2 で *Shigella* group と同定された。試験管培地では H₂S 弱産生, GAS 弱産生を除き, *S. sonnei* 以外の *Shigella* spp. に類似した生化学的性状を示した (Fig 3)。また赤痢菌免疫血清「生研」(デンカ生研) にて B 群に凝集を認めた (Fig 4)。しかし精査目的のため VITEK-MS, 16S rRNA 遺伝子解析を実施したところ *C. freundii* complex と同定された。菌株 No. 2 の各検査法別の結果を Table 1 に示す。

3) 薬剤感受性検査

薬剤感受性試験はドライプレート「栄研」(栄研化学) を用いて測定を実施した。感受性成績では菌株 No. 1 が CTRX 感性であるのに対し, 菌株 No. 2, No. 3, No. 4 は CTRX 耐性を示した。また菌株 No. 2, No. 3, No. 4 は AmpC/ESBL 鑑別ディスク (関東化学) を用いて AmpC 産生株であることを確認した。

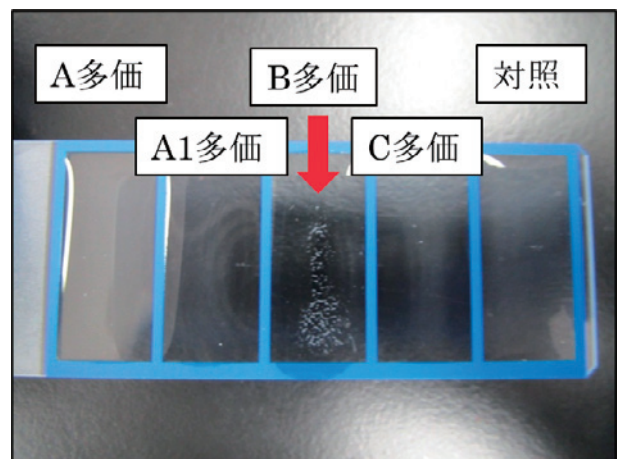


Fig 4. 赤痢菌免疫血清「生研」

4) 菌株間の相同性

本症例で分離された菌株 No. 1~4 における菌株間の相同性を確認するため, IR バイオタイパーでの解析および PFGE を施行した。

(1) IR バイオタイパー

①対象菌株

本症例で分離された菌株 No. 1~4, および別患者から分離された *C. freundii* complex 6 菌株 (No. 5~10) の計 10 菌株について解析を行った。

②操作方法

操作方は IR Biotyper トレーニングテキスト Version 1.0.4 に基づき実施した。

③機器・ソフトウェア

機器は IR バイオタイパー, ソフトウェアは IR バイオタイパーソフトウェア Ver. 2.1 (ブルカー・ジャパン) を使用した。統計解析方法には Euclidean Average Linkage を用いた。

④結果

菌株 No. 1~3 はソフトウェアにより自動算出されたカットオフ値 (0.177) 以下でクラスターを形成した。これは菌株 No. 1~10 の中で比較すると, 菌株 No. 1~3 の相同性が高いことを示すこととなる (Fig 5)。

(2) PFGE

①対象菌株

本症例で分離された菌株 No. 1~4 について解析を行った。

Table 1. 菌株 No. 2 の各検査法別の結果と信頼度

検査機器	原理	結果
VITEK2 (バイオナンバー / 確率)	比色法	<i>Shigella</i> group (4007411040100210 / 93%)
VITEK-MS (信頼値)	質量分析法	<i>C. freundii</i> complex (99.9%)
16s RNA 遺伝子解析 (配列の一致率)	遺伝子検査法	<i>C. freundii</i> complex (99%)

VITEK2 で得られた *Shigella* group は *S. sonnei* 以外の *Shigella* spp. (*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*) の総称を示す。

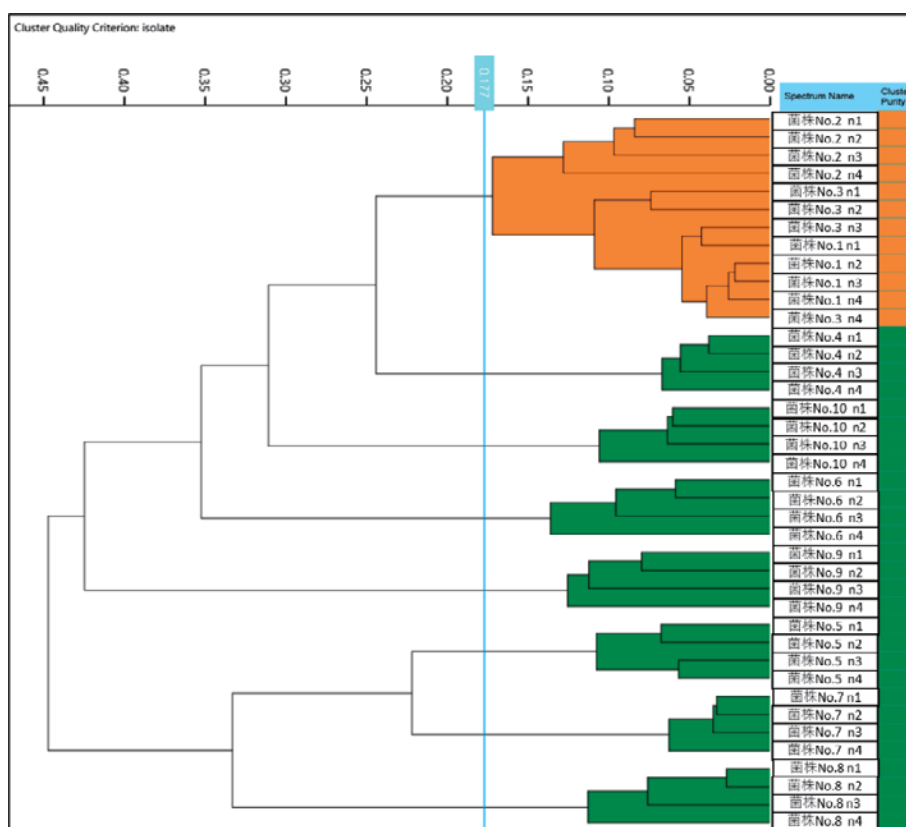


Fig. 5. IR バイオタイパーによる菌株 No. 1 ~ 10 の系統樹

②操作方法

操作方法是臨床微生物検査ハンドブック⁹⁾および BIO RAD 商品の添付文書に基づき実施した。被検菌量は 1 コロニーとし、2 重測定を行った。制限酵素は SmaI 混合液 (New England Biolabs)、ラダーは CHEF DNA サイズスタンダード (#1703635, BIO RAD) を用いた。

③結果

目視確認にて菌株 No. 1~3 とともに同様のバンド形成がみられたのに対し、菌株 No. 4 は過去検出された No. 1~3 とは異なるバンド形成がみられた (Fig 6)。

考 察

通常 *C. freundii* の試験管培地による生化学的性状は、lac/suc, glu, H₂S, GAS, Mot, Cit が陽性を示す⁶⁾。本症例で

得られた菌株 No. 2 の *C. freundii* は比色法による自動同定機器で *Shigella* group と同定され、赤痢菌免疫血清で凝集を認めた。また試験管培地の生化学的性状がほぼ陰性を示し、*S. sonnei* 以外の *Shigella* spp. に類似していた⁷⁾。H₂S と GAS は弱産生であったが、Farmer⁸⁾ らや Aikawa⁹⁾ らは H₂S 産生の *S. sonnei* を、Dodd¹⁰⁾ らは GAS 産生の *S. flexneri* を報告した文献もあるため判断に苦慮した。しかし菌株 No. 2 が分離された際、最近の海外渡航歴、腹痛や下痢の症状がなく、初回菌血症発症日より入院継続中であることに加え、コロニーのサイズや色調から *Shigella* spp. の同定結果に疑問を抱き、質量分析法や 16S rRNA 遺伝子解析の精査を行うに至った。したがって、臨床所見やコロニーの形態などの確認が重要といえる。赤痢菌免疫血清で凝集が生じた理由としては交差反応であったことが示唆され、赤痢菌免疫血清は *Shigella*

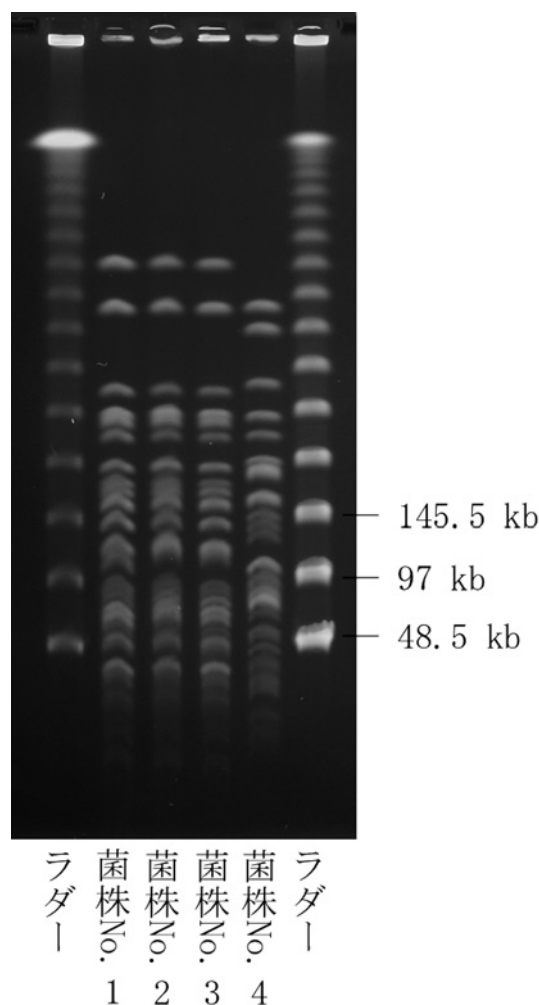


Fig 6. PFGE による菌株 No. 1～4 の電気泳動像

spp.であることが正確に菌種同定された菌株に対して使用されるべきであることが再認識された。質量分析法は分離頻度が稀な菌の同定に対して有効である症例が多数報告されているが、今回の症例では本来と異なる生化学的性状を有する菌株の同定に対しても有効であることを認めた。

近年、*Staphylococcus aureus* や *Pseudomonas aeruginosa* 等の small-colony variants (SCVs) が報告されており¹¹⁾¹²⁾、その発生要因としてアミノグリコシド系抗菌薬や ST 合剤等による投与との関連性が挙げられている。その他、in vitro 試験にて CTRX 等のセファロスポリン系抗菌薬により *Enterococcus faecalis* の SCVs の発生率が高まる報告例がある¹³⁾。菌株 No. 2 が一般的な *C. freundii* complex と異なる性状を示した理由も菌株 No. 1 が抗菌薬投与による影響で薬剤耐性の確立と同時に比色法による同定で意義のある生化学的性状に関与する遺伝子に変異し、非栄養要求性の SCVs となった可能性が唆される。菌株 No. 2 から分離し得られた菌株 No. 3 の生化学的性状が一般的な *C. freundii* complex と類似した理由としては、抗菌薬投与でラクトース分解に関与する遺伝子に変異したが、患者体内では乳糖を分解する必要がなくラクトース分解能が欠失していても増殖することが可能だと想定される。しかしグルコースを含まない BTB

培地に置かれたことで乳糖を分解する必要性が生じ、菌のごく一部が再度変異（修復）を起こし乳糖分解能が回復したのではないかと考える。また菌株 No. 4 については同一患者内から分離された菌株ではあるが、菌株 No. 1～3 とは離れた位置関係にあり、菌株 No. 1 と菌株 No. 1 から変異・修復を起こしたであろう菌株 No. 2, 3 とは関連のない *C. freundii* complex であったと考える。

本症例では同一患者から分離された複数の菌株の相同性の調査として IR バイオタイパーと PFGE を用いた。これにより菌株 No. 1～3 は一連の流れで変異を生じた同一株である可能性が高いと判断できた。IR バイオタイパーの有用性を PFGE と対比すると、本症例において PFGE の所要日数は 4 日であったが、本機は工程が短く 3 時間と大幅に短縮することが可能であった。また今回の PFGE では目視確認にてバンドパターンを比較したが、本来ならばソフトウェアを用いた解析まで行うことが理想といえる。ただし高額なソフトウェアを有しない施設において、本機の自動解析は実用性が高い方法である。

利益相反：申告すべき利益相反なし。

文 献

- 1) Lipsky, B.A., E.W. Hook, A.A. Smith, et al. 1980. Citrobacter infections in humans: experience at the Seattle Veterans Administration Medical Center and a review of the literature. Rev Infect Dis 2: 746-760.
- 2) 荒川宜親. 2003. 広域 β-ラクタム薬耐性に関与する β-ラクタマーゼの特徴と遺伝的相関. 日臨微誌 13: 12-23.
- 3) Deal, E.N., S.T. Micek, D.J. Ritchie. 2007. Predictors of in-hospital mortality for bloodstream infections caused by *Enterobacter* species or *Citrobacter freundii*. Pharmacotherapy 27: 191-199.
- 4) Martak, D., B. Valot, M. Sauget, et al. 2019. Fourier-transform infraRed spectroscopy can quickly type gram-negative bacilli responsible for hospital outbreaks. Front. Microbiol 10: 1-9.
- 5) 小栗豊子. 2017. 細菌の型別法. p. 157-168, 臨床微生物検査ハンドブック (小栗豊子 編集, 第 5 版), 三輪書店, 東京.
- 6) 小栗豊子. 2017. 細菌の同定法. p. 131, 臨床微生物検査ハンドブック (小栗豊子 編集, 第 5 版), 三輪書店, 東京.
- 7) 小栗豊子. 2017. 細菌の同定法. p. 134, 臨床微生物検査ハンドブック (小栗豊子 編集, 第 5 版), 三輪書店, 東京.
- 8) Farmer, J.J., C.F. Riddle, M.D. Stargel, et al. 1976. Unusual Enterobacteriaceae: H₂S⁺ *shigella sonnei*, one authentic and one false positive due to contamination with the obligate anaerobe *Eubacterium lentum*. J Clin Microbiol 3: 206-208.
- 9) Aikawa, T., H. Iida. 1977. H₂S-positive *Shigella sonnei*. Microbiol. Immunol 21: 289-293.
- 10) Dodd, E.R., D. Jones. 1981. Enhancement of gas production in a strain of *Shigella flexneri* serotype 6 by R plasmids. J Med Microbiol 14: 469-473.
- 11) 松本竹久, 堀内一樹, 根岸達哉. 2016. *Staphylococcus aureus*

- の small-colony variants. 日臨微誌 26: 1-10.
- 12) 永野夏海, 中矢秀雄, 夏目聖子, 他. 2018. 血液培養から *Pseudomonas aeruginosa* のヘミン要求性 Small-Colony Variant を検出した 1 症例. 医学検査 67: 99-104.
- 13) Thieme, L., M.K. Strobel, A. Hartung, et al. 2018. In vitro synergism and anti-biofilm activity of ampicillin, gentamicin, ceftaroline and ceftriaxone against *Enterococcus faecalis*. J Antimicrob Chemother 73: 1553-1561.

Usefulness of IR biotyper in strain level identification of *Citrobacter freundii* complex with reversible *Shigella* spp.-like properties

Shun Taguchi¹⁾, Kenta Yamaguchi¹⁾, Mayo Katsuki¹⁾, Yukari Sano¹⁾, Takayuki Hirano¹⁾, Michio Yasunami¹⁾, Mami Fukuoka²⁾, Nohara Tsukamoto^{3) 4)}, Yuya Hirata⁵⁾, Azumi Fujinaga⁶⁾, Zenzo Nagasawa^{4) 7)}

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Saga-Ken Medical Centre Koseikan

²⁾Department of Infection Control, Saga-Ken Medical Centre Koseikan

³⁾Department of Clinical Laboratory, Takagi Hospital

⁴⁾Medical Laboratory Science, Graduate School of Health and Welfare Sciences, International University of Health and Welfare Graduate School

⁵⁾Osaka Sales Office, West Area Sales Department, Diagnostics Sales Operations, Diagnostics Division, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

⁶⁾Application Department, Daltonics Division, Bruker Japan K. K.

⁷⁾Department of Medical Technology and Sciences, School of Health Sciences at Fukuoka, International University of Health and Welfare

A 74 years-old male patient with pancreatic cancer who was received adjuvant chemotherapy experienced prolonged febrile symptom because of *Citrobacter freundii* bacteremia confirmed by blood culture. Although a matched antibiotic treatment was conducted after obtaining the report of the first blood culture, the patient did not show convalescence for more than 30 days and the second blood culture was indicated. An isolate, isolate #2 in this report, from the second blood culture exhibited biochemical properties resemble *Shigella* but identified as *C. freundii* complex by VITEK MS[®] (bioMérieux). Interestingly, isolate #2 gave rise small number of variant colonies when the BTB agar plate was incubated for extended period. This variant was picked up as isolate #3 and showed a stable phenotype of typical *C. freundii* as the strain from the first blood culture, isolate #1. These three isolates were indistinguishable by Pulse-field Gel Electrophoresis (PFGE) and IR Biotyper[®] (Bruker) Fourier Transform Infrared (FT-IR) analyses, both of which discriminate bacterial organisms at strain level. Consequently, the variant with *Shigella*-like reversible phenotype was thought to be originated from typical *C. freundii* strain within the patient's body under the pressure of host defense and antimicrobial treatment.