

投稿論文

症例報告

カテーテル尿より 炭酸ガス依存性の*Escherichia coli*を検出した一症例

○西野 広将¹⁾, 西村 さとみ¹⁾, 小西 真実子¹⁾, 三田村 由枝¹⁾

1) 長浜赤十字病院 検査部

〒526-8585 滋賀県長浜市宮前町14-7

滋賀医学検査2024 vol.14 No. 1
公益社団法人 滋賀県臨床検査技師会

症例報告

カテーテル尿より 炭酸ガス依存性の*Escherichia coli*を検出した一症例

○西野 広将¹⁾, 西村 さとみ¹⁾, 小西 真実子¹⁾, 三田村 由枝¹⁾

1) 長浜赤十字病院 検査部

〒526-8585 滋賀県長浜市宮前町14-7

Key words

Small-colony variants, 炭酸ガス依存性, *Escherichia coli*

【要旨】

尿路感染を疑う患者のカテーテル尿から*Escherichia coli* small-colony variant (SCV) を検出した。尿のグラム染色ではグラム陰性桿菌が多数観察され、炭酸ガス環境下の羊血液寒天培地上には腸内細菌を疑うコロニーの発育が多数認められた。一方、大気環境下でのドリガルスキー改良培地上では黄色小コロニーを形成するにとどまった。羊血液寒天培地上に発育したコロニーを用いて同定・薬剤感受性検査を実施したが発育を認めず同定不能となった。炭酸ガス依存性SCVを疑い、炭酸ガス環境下にてドリガルスキー改良培地を用いて培養したところ、黄色コロニーの発育を認めた。さらにNeg Combo EN5Jパネル（ベックマン・コールター）で同定・薬剤感受性検査を行った結果、発育を認め*E. coli*と同定し、薬剤感受性結果は参考値として報告した。質量分析装置でも同菌と同定されたため、*E. coli*と確定した。SCVsは炭酸ガス依存性の他にも多くの種類が存在するため、SCVsのタイプに応じた培養方法と同定・薬剤感受性検査方法を模索する必要がある。

I 序文

Small-colony variants (SCVs) は、抗菌薬の長期間または頻回の投与や環境因子などの影響により代謝などに異常が生じ、その結果通常に比べて発育が遅く、また様々な栄養要求性を示すようになった細菌の亜集団のことである¹⁾。分離例としては、*Staphylococcus aureus*²⁾、*Escherichia coli*³⁾、*Serratia marcescens*⁴⁾、*Pseudomonas aeruginosa*⁵⁾ など様々な菌種が報告されている。またSCVsはコロニーが通常よりも小型で、生化学的性状も非典型的であるため、分離・同定検査及び薬剤感受性検査が困難となることがある¹⁾。

*E. coli*は通性嫌気性グラム陰性桿菌であり、通常、大気環境下での普通寒天培地上には良好な発育を示し、同定検査及び薬剤感受性検査を実施する際も特

殊な条件は必要としない⁶⁾。

今回我々は、尿路感染を疑う患者のカテーテル尿から、発育に炭酸ガスを要求する*E. coli* SCVを分離したので報告する。

II 症例

患者：40歳代、男性。

主訴：発熱、膿尿、下腹部の違和感。

既往歴：二分脊椎による神経因性膀胱（膀胱瘻造設済み）で複数回の尿路感染症を発症。発症時に抗菌薬（ceftriaxone、levofloxacin、cefmetazole）の治療歴あり。

入院時身体所見：体温38.8℃、血圧121/63 mmHg、呼吸数22回/分、脈拍数105回/分、SpO₂ 99%（room air）、腹部膨満・軟・上腹部軽度圧痛

あり。

入院時尿・血液検査所見（表1）：尿沈渣検査では白血球66.5 /HPF、細菌3+を認めた。血液検査はWBC $9.6 \times 10^3 / \mu\text{L}$ (neutrophil 78.7%)、CRP 3.78 mg/dLで上昇を認めた。

<血算>		<生化学>	
WBC	$9.6 \times 10^3 / \mu\text{L}$	CRP	3.78 mg/dL
Neutrophil	78.7 %	TP	6.7 g/dL
Lymphocyte	8.5 %	ALB	3.9 g/dL
Monocyte	10.5 %	BUN	14.5 mg/dL
Hemoglobin	15.2 g/dL	CRE	0.40 mg/dL
Platelet	$175 \times 10^3 / \mu\text{L}$	AST	21 IU/L
<尿定性>		ALT	26 IU/L
WBC	500 / μL	LD	119 IU/L
亜硝酸塩	+2	Na	131.6 mEq/L
<尿沈査>		K	4.0 mEq/L
WBC	66.5 /HPF	Cl	97.9 mEq/L
細菌	3+		

臨床経過：高熱、炎症反応の上昇、及び濃尿の所見より尿路感染症を疑い、CTR_X 2g/dayで治療を開始し、X日に入院となった。入院時からの臨床経過を図1に示す。同日、CTR_X投与前のカテーテル尿のグラム染色及び培養検査を開始した。

X+1日、39.1℃、WBC $11.8 \times 10^3 / \mu\text{L}$ に一旦上昇した。X+4日には37.3℃まで解熱、WBC $6.4 \times 10^3 / \mu\text{L}$ 、CRP 2.91 mg/dLとなり炎症反応は改善傾向になった。X+5日にGroup G *streptococcus*を報告。X+6日には症状も改善。ルート確保が困難ということもあり、抗菌薬をLVFX 500mg/day内服へ変更された。X+7日には膀胱瘻のカテーテルの交換と膀胱内の洗浄が行われた。X+8日、発育不良であった*E. coli* ESBLを報告した。X+9日、

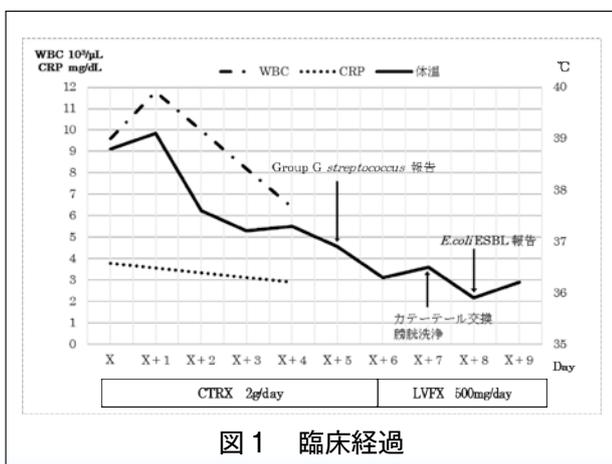


図1 臨床経過

発熱、症状の悪化もなく経過良好であったため退院となり、LVFX内服はX+13日まで継続された。

Ⅲ 細菌学的検査

1. 塗抹検査

グラム染色による塗抹検査では、グラム陽性球菌（連鎖状）と腸内細菌目細菌を疑うグラム陰性桿菌をそれぞれ3+（6～30個/視野）認めた。

2. 培養同定検査

カテーテル尿を5%炭酸ガス環境下にて5%羊血液寒天培地（栄研化学）、大気環境下にてドリガルスキー改良培地（栄研化学）を用いて35℃・18時間培養を行った。ただし、2日間の休日に入ったため、35℃・18時間培養後は、45時間・6℃で保冷し増殖を抑制した。羊血液寒天培地上にはβ溶血を伴うコロニー（プロレックス「イワキ」レンサ球菌抗原キットを用いてGroup G *streptococcus*と同定）と灰白色のコロニーをそれぞれ多数（10⁶ CFU/mL）認め、ドリガルスキー改良培地上には極微小のコロニーと黄色小コロニーを少数ずつ認めた。

羊血液寒天培地上の腸内細菌目細菌を疑った灰白色コロニーは、プロンプト法で菌液を調整し、Neg Combo EN5Jパネルを用いた全自動同定感受性装置MicroScan WalkAway DxM1040（ベックマン・コールター）による同定・薬剤感受性検査を実施した。検査の結果、陽性コントロール、薬剤、生化学的性状のいずれのウェルも発育・反応を示さず、発育不良で判定不能となった。発育不良の原因をプロンプト法での菌液調整が不良であったと考察し、CLSI標準法に準じた方法、すなわちMcFarland No.0.5の菌液調整液100 μLを希釈水に加え再検査を行ったが、プロンプト法と同様に発育不良となった。

入院時の尿培養で、羊血液寒天培地とドリガルスキー改良培地での発育量に大きな差が出た原因を、培養環境の違いによるものであると考えた。そこで、腸内細菌を疑う灰白色コロニーに対して羊血液寒天培地とドリガルスキー改良培地に純培養を行う際、炭酸ガス環境下と大気環境下の2つの条件で培養を

行い、発育量の違いを比較した。結果、炭酸ガス環境下では発育が良好だったのに対して、大気環境下での発育はほとんど認められなかった（図2）。

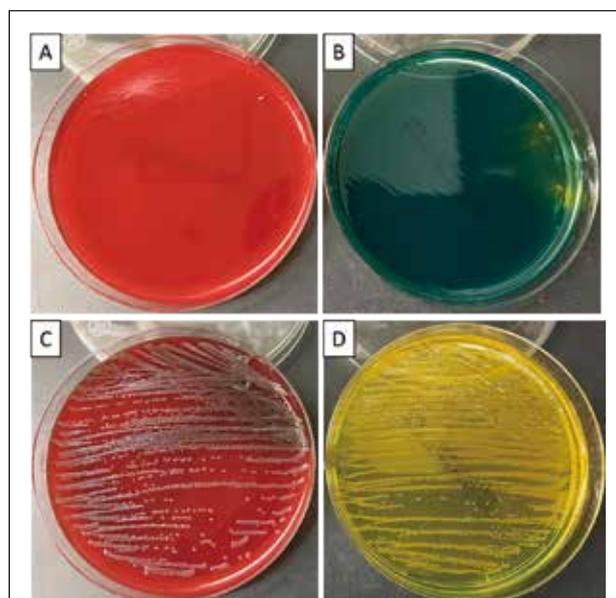


図2 培養条件の違いによる発育結果

左：5%羊血液寒天培地、
右：ドリガルスキー改良培地
A, B：大気環境下にて35℃ 18時間培養
C, D：炭酸ガス環境下にて35℃ 18時間培養

培養環境の違いによる発育性の検討から炭酸ガス依存性の腸内細菌目細菌を疑い、炭酸ガス環境下による同定・薬剤感受性検査を試みた。CLSI標準法に準じた方法により菌液調整した希釈液をNeg Combo EN5Jパネルに接種し、35℃・18時間炭酸ガス培養を行った結果、陽性コントロールウェルに発育を認めた。パネルに添加試薬を滴下し、目視にて生化学的性状の判定を行った結果、同定確率93%で*E. coli*と同定した。薬剤感受性（表2）は、aztreonam > 8 μg/mL, ceftazidime > 8 μg/mL, cefpodoxime > 4 μg/mL, CTRX > 2 μg/mL, cefpodoxime / clavulanic acid ≤ 1/4 μg/mLであった。しかし、MICが参考値となるため、ESBL確認試験として double disc synergy test を実施した。CLSIに準じて調整した菌液をミュラーヒントンス寒天培地（栄研化学）に接種し、KBディスク（栄研化学）のCAZとcefotaxime、clavulanic acid/amoxicillinを用いて、35℃・18時間炭酸ガス環境下で培養後、CAZ及びCTXとCVA/AMPCの間で阻止帯の拡大を確認し、

ESBLと同定した。また生化学的性状による同定検査も参考評価となるため、質量分析法による同定検査を外部委託した。結果は、スコア > 2 で *E. coli* と同定された。

臨床側への報告は、薬剤感受性結果（表2）は参考値として、抗菌薬の治療効果判定には注視するよう伝えた。

表2 薬剤感受性結果

薬剤	MIC (μg/mL)	判定
Ampicillin	>16	R
Cefazolin	>16	R
Ceftriaxone	>2	R
Ceftazidime	>8	R
Cefepime	>8	R
Cefpodoxime	>4	R
Cefmetazole	≤16	S
Flomoxef	≤8	S
Meropenem	≤0.12	S
Aztreonam	>8	R
Ampicillin/sulbatam	≤8/4	S
Piperacillin/tazobactam	≤8/4	S
Gentamicin	≤4	S
Amikacin	≤16	S
Minocycline	≤4	S
Levofloxacin	>1	R
Cefpodoxime/clavulanic acid	≤1/4	-

S : susceptible R : resistant

IV 考察

今回、我々はカテーテル尿から炭酸ガス依存性の *E. coli* SCVを検出した。SCVsには様々な栄養要求性が報告されており、発生原因が判明されているものもある。チミジン依存性SCVsでは、ST合剤の長期投与により遺伝子変異がおこり、DNA合成過程に必要なチミジル酸合成酵素の活性が失われ、菌体外からチミジンを取り込むようになることが発生原因と考えられている²⁾。本症例においても神経因性膀胱により複数回の尿路感染症を発症し、抗菌薬治療を行っていたことが、SCV発生の要因の一つであると思われる。

SCVsは全く発育できない場合や発育遅延によるコロニーの小型化、非典型的な生化学的性状により検査を円滑に進めることが難しくなる。松本ら⁷⁾は、チミジル酸生合成欠損型と電子伝達系欠損型、炭酸ガス依存性SCVsを中心に、その表現型や原因、関

連情報をまとめ、発育性からSCVsの原因を推定するフローチャートを考案している。現在わかっているSCVsの特徴を把握し、対処方法を決めておくことで、見落としや誤同定を防止することにつながると思われる。本症例の炭酸ガス依存性SCVについては、炭酸ガス環境下と大気環境下の培養環境の違いで発育に大きな差が生じたことから、最終的にSCVの推定につなげることができた。しかし、炭酸ガス環境下での培養を行っていない場合は、グラム染色で確認できた菌量と培養結果の相違から、死菌や嫌気性菌が原因と考える場合もあるため注意が必要である。

本症例から、適切な培養条件で同定検査を実施すれば、質量分析装置のない施設でも有用な結果が得られるケースもあることがわかった。しがしながら、松本らはチミジン依存性SCVsについて、APIを用いた同定検査を実施したところ、半数以上は誤同定もしくは同定確率80%未満となる結果であったことを報告しており²⁾、最終的には質量分析法による確認が必要であると思われる。薬剤感受性検査についても、栄養要求性の種類に応じた薬剤感受性検査を実施する必要があるが、CLSIやEUCASTにおいて、SCVsについての検査法は提案されていないため薬剤感受性検査結果は参考値となる。本症例は炭酸ガス依存性SCVであったため、培養を炭酸ガス環境下に変更するだけで、市販の薬剤感受性パネルで結果を得ることができた。またESBL産生*E. coli*のSCVを疑ったことから、炭酸ガス環境下でのESBL確認試験や耐性遺伝子の確認を加える必要がある。SCVsは、野性株よりも長期間細胞内に生存可能という報告や抗菌薬の影響を受けにくく、再発を繰り返す治療難渋例が多いと報告されている³⁾。そのため、臨床側とはSCV株の存在と治療効果判定についての情報共有を行うことが重要である。

V 結語

今回、カテーテル尿から炭酸ガス依存性の*E. coli* SCVを検出した。SCVsの種類は炭酸ガス依存性の

他にも多くの種類が存在し、発育不良となるため結果報告には時間を要する。発育不良となる原因の1つとしてSCVsの存在を念頭に検査を行う必要がある。

■文献

- 1) 高橋尚子, 他:「チミジン要求性*Escherichia coli* Small Colony Variantによる小児の急性腎盂腎炎」, 日本臨床微生物学会雑誌 2022; 32 (3) : 26-32.
- 2) 松本竹久, 他:「*Staphylococcus aureus*のsmall-colony variants」, 日本臨床微生物学雑誌 2016; 26 (1) : 1-10.
- 3) 高見沢将, 他:「血液培養からCO₂要求性*Escherichia coli*が分離された1症例」, 日本臨床微生物学雑誌 2014; 24 (1) : 29-35.
- 4) 太田悠介, 他:「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」, 日本臨床微生物学会雑誌, 2015; 25 (2) : 125-130.
- 5) 永野夏海, 他:「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 2018; 67 (1) : 99-104.
- 6) 堀光弘: 微生物検査ナビ第2版, 2016: 42
- 7) 松本竹久, 他:「臨床細菌検査で問題になるSmall-colony variants」日本臨床微生物学会雑誌 2023; 33 (2) : 1-8.

