

[症例報告]

Moraxella nonliquefaciens による角膜潰瘍の1症例

大野達也¹⁾・田中洋輔¹⁾・安西桃子¹⁾・小松奈央¹⁾・大柳忠智²⁾・秋田博伸³⁾

¹⁾ 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院臨床検査部

²⁾ 聖マリアンナ医科大学病院臨床検査部

³⁾ 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院小児科

(平成26年11月12日受付, 平成27年2月19日受理)

今回われわれは *Moraxella nonliquefaciens* による角膜潰瘍の症例を経験した。検索し得た範囲内では、角膜潰瘍からの検出は世界初の報告である。症例は基礎疾患に糖尿病を有する81歳の男性。左眼角膜中央に5~8mmの硬い潰瘍を認め、採取された角膜擦過物から *M. nonliquefaciens* が検出された。角膜擦過物のグラム染色にて大型でかくばったグラム陰性双桿菌を認め、培養検査では光沢のある半透明な集落の周囲に、培地の表面を這うような拡がりが見られた (spreading colony)。本菌は特徴的な生化学的性状を示さないため、従来法での同定は困難である。また、使用する培地の種類により集落性状が異なり、各施設で使用している培地における集落性状を把握しておかないと、同定に難渋すると考えられる。角膜潰瘍は近年増加している疾患であり、起因菌も時代背景に伴い変化してきた。*M. nonliquefaciens* の病原性や細菌学的性状を明らかにする上で、症例報告の蓄積が不可欠であると考えられ、正確な同定を行うために遺伝子解析や質量分析を活用する必要があると考えられた。

Key words: *Moraxella nonliquefaciens*, 角膜潰瘍, spreading colony

序 文

Moraxella nonliquefaciens はグラム陰性桿菌の形態を示す *Moraxella* 属の一種であり、ヒトの上気道の常在菌として存在し、一般に弱毒菌として考えられている。本菌は特徴的な生化学的性状を示さないため、従来法での同定は困難であり、同定キットを用いた場合に他菌種と誤って同定される可能性がある。感染性心内膜炎¹⁾や緑内障濾過手術後の眼内炎²⁾、慢性呼吸器疾患患者の喀痰から検出された報告³⁾があるが、角膜潰瘍から検出された報告はない。今回われわれは、世界で初の *M. nonliquefaciens* による角膜潰瘍の症例を

報告する。

症 例

患者：81歳男性。

既往歴：糖尿病。

主訴：左眼の充血、眼脂、視力低下。

現病歴：20XX年1月8日頃から左眼の異常(主訴)があり、20XX年1月11日に当院眼科外来を受診した。

初診時検査所見：左前眼部細隙灯顕微鏡検査にて、角膜中央部よりやや外側に5~8mmの固い潰瘍が認められた(図1A)。そして角膜潰瘍部擦過物が採取された。

臨床経過：臨床所見により感染性角膜炎を疑い、levofloxacin (LVFX) および cefmenoxime (CMX) の点眼薬と ofloxacin (OFLX) の軟膏薬が処方された。1月17日の再診時には潰瘍は縮小し、各症状ともに改善傾向であったが、提出した角膜擦過物からグラム陰性桿菌が認められていたことより、CMX から dibekacin (DKB) に変更された。その後も潰瘍、各

著者連絡先：(〒241-0811) 神奈川県横浜市旭区矢指町1197-1
聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院臨床検査部
大野達也
TEL: 045-366-8428
FAX: 045-366-1157
E-mail: ohno-marianna-tatsuya@marianna-u.ac.jp

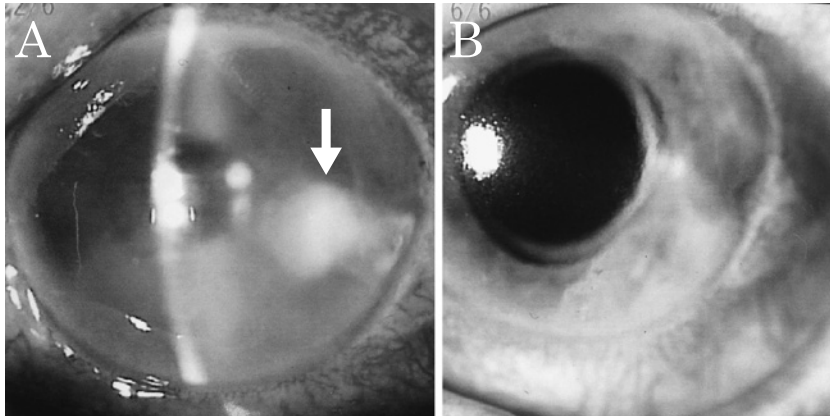


図1. 左前眼部細隙灯顕微鏡検査写真

A: 中央やや外側に潰瘍を認め、角膜混濁、結膜充血を認めた。矢印は潰瘍を示す。(1月11日, 初診時)
 B: 潰瘍は縮小し、角膜混濁、結膜充血ともに改善を認めた。(2月8日, 再診時)

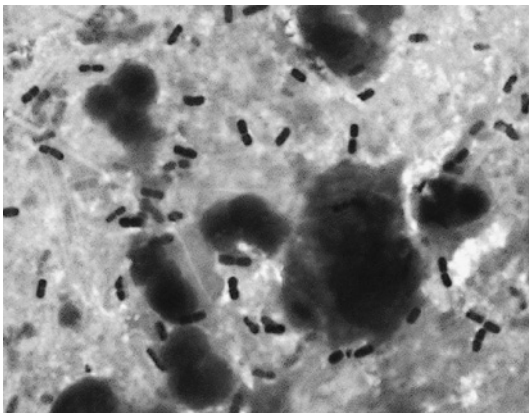


図2. 角膜擦過物グラム染色像 (×1000)

症状ともに改善を認め、2月8日の再診時にCMX, LVFXの処方が中止された。その時の左前眼部細隙灯顕微鏡検査写真(図1B)を示す。そして3月8日に他院紹介となった。

微生物学的検査

塗抹・鏡検検査: 提出された角膜潰瘍部擦過物(カルチャースワブ, 日本BD)のグラム染色(Bart-holomew & Mittwer 法)にて, 多数の白血球に貪食された大型でかくばったグラム陰性桿菌を多数認めた。その多くは菌体が二つ連なった双桿菌様に存在した(図2)。

分離培養検査: 培養は, 羊血液寒天培地(日水製薬), チョコレートEXII寒天培地(日水製薬)を35℃,

5%CO₂環境下にて24時間培養し, マッコンキーII寒天培地(日本BD)を37℃, 好気環境下にて24時間培養した。羊血液寒天培地にて1.0~2.0mmの集落を形成し, チョコレート寒天培地にて0.5~1.0mmの集落を形成した。*M. nonliquefaciens*以外の菌の発育は認めなかった。集落性状は, 非溶血性で光沢のある半透明の集落であり, その周囲には培地の表面を這うような特徴的な拡がりをも認めた(図3)。マッコンキー寒天培地には発育は認めなかった。また, 羊血液寒天培地を用い, 好気環境下, 25℃での発育は陽性, 42℃での発育は陰性であった。

各種分離培地による集落の違いと大学分離株との違い: 培地による発育集落の違いを検討するために, 3メーカー4種類の羊血液寒天培地を用いて比較試験を行った。35℃, 5%CO₂環境下にて24時間培養した集落を図4A-Dに示す。羊血液寒天培地(日水製薬)では集落周囲に1.5~2.0mmのspreadingを認めていたが, 他種類の培地ではspreadingの幅が小さい, または認められないものも存在した。また, 聖マリアンナ医科大学病院にて分離された*M. nonliquefaciens*(大学分離株)の35℃, 5%CO₂環境下にて24時間培養した発育集落を図4Eに示す。培地には最もspreadingの幅が大きい結果を得た羊血液寒天培地(日水製薬)を用いた。大学分離株では, 0.5~1.0mmの白色, 半透明の集落でspreadingは認めず, *Moraxella cattarrhalis*と類似の集落性状を示した。

同定検査: オキシダーゼ試験, カタラーゼ試験はともに陽性であり, 発育したコロニーのグラム染色においても大型で角ばったグラム陰性桿菌を認めた。同定

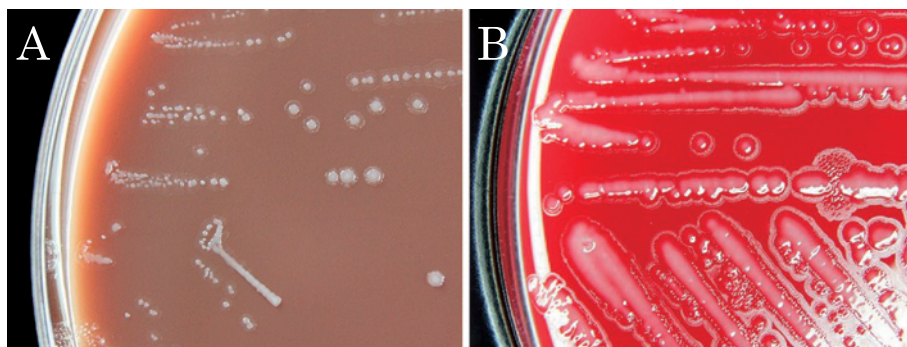


図3. *Moraxella nonliquefaciens* のコロニー
 A: チョコレート寒天培地 EXII (日水製薬)
 B: 羊血液寒天培地 (日水製薬)

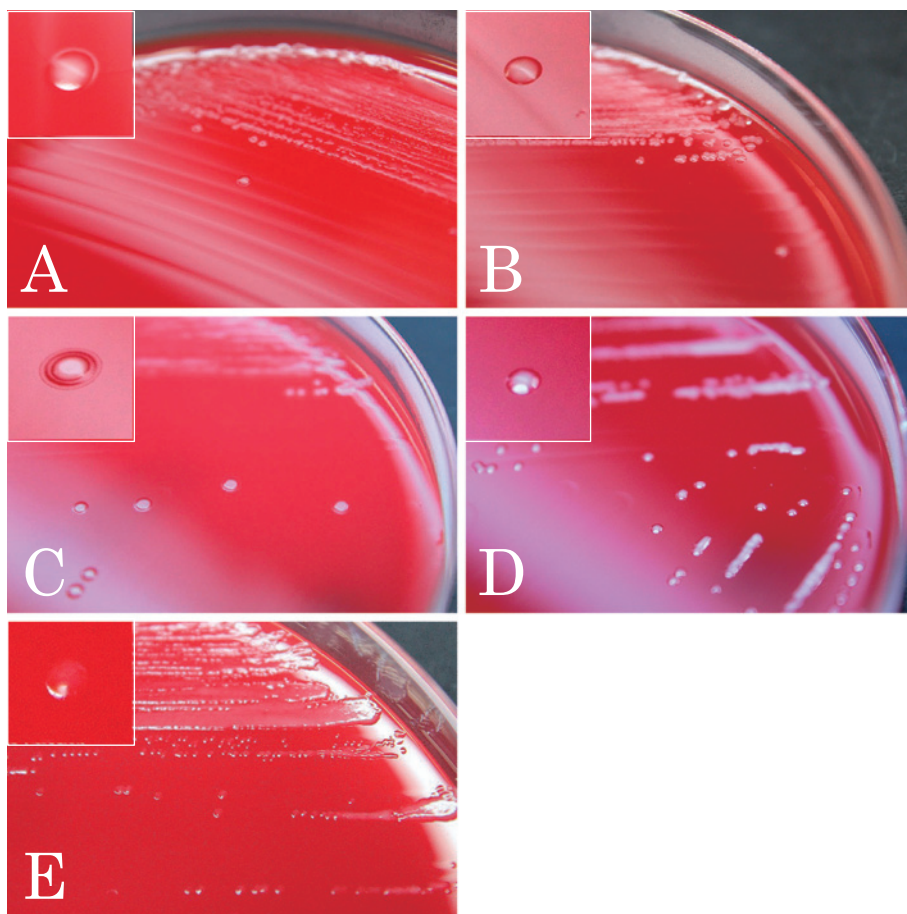


図4.
 A: TSA II 5% ヒツジ血液寒天培地 (日本 BD)
 B: ポアメディア 羊血液寒天培地 M70 (栄研化学)
 C: ポアメディア 羊血液寒天培地 M58 (栄研化学)
 D: バイタルメディア ヒツジ血液寒天培地 (極東製薬)
 E: 大学分離株 羊血液寒天培地 (日水製薬)

表1. *M. nonliquefaciens* の薬剤感受性検査成績

抗菌薬名	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	<i>M. catarrhalis</i> の MIC 判定基準値 ⁴⁾		
		感性	中間	耐性
penicillin G	2			
ampicillin	0.25			
clavulanic acid/amoxicillin	≤ 1	≤ 4		≥ 8
sulbactam/ampicillin	≤ 0.5			
cefotiam	≤ 0.5			
cefotaxime	0.25	≤ 2		
cefazopran	1			
ceftriaxone	≤ 0.12	≤ 2		
cefaclor	≤ 0.25	≤ 8	16	≥ 32
cefixime	≤ 0.25			
cefditoren pivoxil	0.06			
meropenem	≤ 0.12			
clarithromycin	≤ 2	≤ 1		
erythromycin	0.25	≤ 2		
azithromycin	≤ 0.25	≤ 0.25		
clindamycin	> 1	≤ 0.5	1-2	≥ 4
levofloxacin	≤ 0.25	≤ 2		
ciprofloxacin	≤ 0.12	≤ 1		
tetracycline	≤ 0.5	≤ 2	4	≥ 8
minocycline	≤ 0.5			
sulfamethoxazole-trimethoprim	$\leq 9.5/0.5$	$\leq 9.5/0.5$	19/1-38/2	$\geq 76/4$
chloramphenicol	≤ 0.5			

キットにはIDテスト・HN-20ラピッド(日水製薬)を使用したところアラニンアミノペプチダーゼ、硝酸塩還元、プロリンアミノペプチダーゼが陽性になり、*Neisseria canis* 84%、*Neisseria elongate/nitororeducens* 6%、*Kingella dentrificans* 6%、(コード: 5020000)と同定された。しかし、カタラーゼ試験や集落性状、グラム染色形態から他菌種を疑い精査を依頼し、16S rRNA 遺伝子配列解析により、*M. nonliquefaciens* と同定された。また、質量分析装置MALDI Biotyper (BRUKER) では同定スコア2.327にて*Moraxella nonliquefaciens* と同定された。

薬剤感受性検査: 本菌はClinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) で定められた薬剤感受性試験方法がないため、CLSI M45-A2⁴⁾の*M. catarrhalis*の勧告法に準拠して微量液体希釈法に基づくMICROFAST 4JとMICROFAST 7J Panel (BECKMAN COULTER)を使用し、最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。すなわちMcFarland 0.5に調整した菌液をMueller-Hinton brothに100 μL 添加し、それぞれのPanelにリノックシステム(BECKMAN COULTER)で接種したのち35°C、好気環境下で20~24時

間培養後に判定を行った。その結果を表1に示す。またセフィナーゼディスク(日本BD)を用いたニトロセフィン法による β -ラクタマーゼ産生性試験は陽性であった。

考 察

呼吸器感染症の起原菌となる*M. catarrhalis*は検出頻度が高い。その他の*Moraxella*属はヒトの皮膚や粘膜、特に上気道の常在菌であり中でも、*M. nonliquefaciens*、*Moraxella osloensis*、*Moraxella lincolnii*はまれに感染症の起原菌として分離される。*M. nonliquefaciens*はこれら3菌種のなかでも最も検出頻度が高いとされているが⁵⁾、本邦における報告例は少なく、その細菌学的性状についてはほとんど知られていない。その原因として各種同定キットに本菌の記載が無い、または記載があっても確率が低く正確な同定が困難なこと、本菌はこれまで感染症の起原菌となることが稀な、常在菌の一種として取り扱われてきたことなどが考えられる。しかし井上らの報告⁶⁾によると、感染性結膜炎の起原菌として報告の多い*Moraxella lacunata*と同様に、*M. nonliquefaciens*においてもfibri-

nolysin, hyaluronidase, lecithinase などの毒素様物質を他の *Moraxella* 属に比べ強く産生するとされている。本症例でも貪食像を認め、純培養状に検出されており、本菌の病原性が示唆された。

本症例での *M. nonliquefaciens* のグラム染色像は、グラム陰性の大型でかくばった桿菌であり、菌が対になった双桿菌様に認められたところも多くあった。角膜からの分離頻度の高い、*Pseudomonas aeruginosa* や *Acinetobacter* spp. とは形態が異なり鑑別の一助になると考えられる⁷⁾。また、報告によってはグラム染色にてグラム陽性桿菌とグラム陰性桿菌が混在するとされている²³⁾が本症例でははっきりとしたグラム陰性桿菌として観察された。

集落の大きさや spreading の有無は過去の報告においても様々である²³⁾。国内に限っても羊血液寒天培地は数十種類が流通しており、自施設で使用している羊血液寒天培地における菌の特徴を把握していないと検出が困難になると思われる。また、*M. nonliquefaciens* でも菌株によって *M. catarrhalis* と類似の集落性状を示す株も存在することから、集落性状と併せて集落のグラム染色を実施することで誤同定を防ぐことができると考えられる。

今回、ID テスト・HN-20 ラピッドを用いてコード：5020000 と判定したが、プロリンアミノペプチダーゼテストの判定は弱陽性であった。プロリンアミノペプチダーゼテストの判定を陰性と判定すると、*M. lacunata*/*M. nonliquefaciens* 87%、*M. catarrhalis* 13%、(コード：5000000)となる。プロリンアミノペプチダーゼテストの判定結果次第では *Neisseria* sp. と誤って同定されてしまう可能性があるため判定には注意が必要だと思われる。*M. lacunata* はゼラチン液化試験陽性となるため、他キットとの併用により *M. nonliquefaciens* と鑑別することが可能だが、陽性率は42%と高くない⁵⁾。

M. nonliquefaciens は *M. catarrhalis* と同様に BRO β -lactamase を産生することが知られており⁸⁹⁾、本症例分離株でもセフィナーゼディスクが陽性を示したことから BRO-1 もしくは BRO-2 β -lactamase を産生していたと考えられる。Nonaka によると *M. nonliquefaciens* の 68.1% にマクロライド系薬高度耐性 (MIC $\geq 128 \mu\text{g}/\text{mL}$) を示す株が存在し、23S rRNA 遺伝子領域に A2058T の変異を認めたとされている¹⁰⁾。本症例分離株では、マクロライド系薬で低い MIC 値を示しており、変異を獲得していない wild type であったと考えられる。また、ペニシリン系薬、セファロsporin系薬、ニューキノロン系薬においては Nonaka ら

の報告¹⁰⁾と同様な MIC 値を示した。本症例において、ニューキノロン系薬および第三世代セファロsporin系薬、アミノグリコシド系薬の使用で症状の改善が認められたことから、抗菌薬投与による治療効果があったと考えられる。*M. nonliquefaciens* は健常成人に比べ、6歳以下の小児の咽頭やウイルスによる呼吸器感染患者の上気道で高頻度に存在することが報告されている¹¹⁾。外来診療において、諸外国に比べてマクロライド系薬が処方される割合が高い本邦において¹²⁾、小児やウイルス感染後の二次感染患者では特に注意すべき細菌の一種であると考えられる。

角膜潰瘍は、細菌感染などにより、角膜実質まで組織欠損が及んだ状態であり、早急に適切な治療を行わないと失明に至る可能性のある重篤な疾患である。また、近年では高齢者のみならず、コンタクトレンズ装用者の低年齢化に伴い、若年者の感染も増加している疾患であるとともに、細菌の薬剤耐性化が治療困難例の増加をもたらしている⁷⁾。しかし、感染性角膜炎の大部分は広域スペクトルの抗菌薬により治癒すること¹³⁾、検査結果と治療効果が必ずしも一致しないこと¹³⁾、薬剤感受性検査の判定基準は薬剤を全身に投与した場合の血中濃度に基づいていることが多く、点眼とは状況が異なること¹⁴⁾などから細菌学的検査が施行されていないことも多い。一方、北村らの報告¹⁵⁾によると、初期治療に反応しなかった難治性角膜炎 11 例のうち 10 例で細菌学的検査の結果が抗菌薬の変更など、治療内容に有効に反映されたとしている。*M. nonliquefaciens* が原因となった本症例において、細菌学的検査が実施されたことで、参考値とはなるが薬剤感受性成績を報告することが出来た。そして臨床効果と比較しながら抗菌薬の継続、変更の判断を行う一助になった。起因菌動向を把握するために細菌検査室は、遺伝子解析や質量分析を活用し正確な同定、薬剤感受性検査を行うことは重要である。それらの結果にもとづき症例報告の蓄積が不可欠であると考えられた。

本症例は 2014 年度第 63 回日本医学検査学会において発表した。

文 献

- 1) Rafiq, I., H. Parthasarathy, C. Tremlett, et al. 2011. Infective endocarditis caused by *Moraxella nonliquefaciens* in a percutaneous aortic valve replacement. *Cardiovascular Revascularization Medicine* 12: 184-186.
- 2) Laukeland, H., K. Bergh, L. Bevanger. 2002. Posttra-

- beculectomy Endophthalmitis Caused by *Moraxella nonliquefaciens*. J. Clin. Microbiol. 40: 2668-2670.
- 3) Davis, J.M., M.J. Whipp, C. Ashhurst-Smith, et al. 2004. Mucoid Nitrate-Negative *Moraxella nonliquefaciens* from Three Patients with Chronic Lung Disease. J. Clin. Microbiol. 42: 3888-3890.
 - 4) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline-Second Edition. M45-A2. CLSI, Wayne, PA.
 - 5) Vaneechoutte, M., L. Dijkshoorn, K. Nemeč, et al. 2012. *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. p. 714-738, In: Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. ASM Press, Washington, DC.
 - 6) 井上 勇, 新井武利, 吉沢一太, 他. 1977. *Moraxella* に関する研究 第4報 *Moraxella* の毒素様物質について. 感染症学雑誌 51: 603-607.
 - 7) 感染性角膜炎全国サーベイランス・スタディグループ. 2006. 感染性角膜炎全国サーベイランス—分離菌・患者背景・治療の現況—. 日眼会誌 110 (12): 961-972.
 - 8) WALLACE, R.J. JR, V.A. STEINGRUBE, D.R. NASH, et al. 1989. BRO β -Lactamases of *Branhamella catarrhalis* and *Moraxella* Subgenus *Moraxella*, Including Evidence for Chromosomal β -Lactamase Transfer by Conjugation in *B. catarrhalis*, *M. nonliquefaciens*, and *M. lacunata*. Antimicrob Agents Chemother. 33: 1845-1854.
 - 9) Eliasson, I, C Kamme, M Vang, et al. 1992. Characterization of cell-bound papain-soluble beta-lactamases in BRO-1 and BRO-2 producing strains of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* and *Moraxella nonliquefaciens*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 11 (4): 313-321.
 - 10) Nonaka, S., K. Matsuzaki, T. Kazama, et al. 2014. Antimicrobial susceptibility and mechanisms of high-level macrolide resistance in clinical isolates of *Moraxella nonliquefaciens*. J Med Microbiol. 63: 242-247.
 - 11) Yi, H., D. Yong, K. Lee, et al. 2014. Profiling bacterial community in upper respiratory tracts. BMC Infect Dis. 14 (1): 583.
 - 12) 菅原民枝, 大日康史, 具 芳明, 他. 2012. 薬局サーベイランスによる抗菌薬使用量の検討. 環境感染誌 27: 195-198.
 - 13) O'Brien, T.P., M.G. Maguire, N.E. Fink, et al. 1995. Efficacy of ofloxacin versus cefazolin and tobramycin in the therapy for bacterial keratitis. Report from the bacterial keratitis study research group. Arch Ophthalmol. 113: 1257-1265.
 - 14) McDonnell, P.J.. 1996. Empirical or Culture-Guided Therapy for Microbial Keratitis. Arch Ophthalmol. 114: 84-87.
 - 15) 北村絵里, 河合正孝, 山田昌和, 他. 2004. 感染性角膜炎に対する細菌学的検査の意義. 日本眼科紀要 55: 553-556.

Corneal ulcer caused by *Moraxella nonliquefaciens*

Tatsuya Ohno¹⁾, Yosuke Tanaka¹⁾, Momoko Anzai¹⁾, Nao Komatsu¹⁾,
Tadatomo Ohyanagi²⁾, Hironobu Akita³⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, St. Marianna University School of Medicine Yokohama City Seibu Hospital

²⁾Department of Clinical Laboratory, St. Marianna University School of Medicine

³⁾Department of Pediatrics, St. Marianna University School of Medicine Yokohama City Seibu Hospital

We report a case of corneal ulcer caused by *Moraxella nonliquefaciens* in an 81-year-old man with diabetes mellitus. *M. nonliquefaciens* was isolated from the corneal scrapings of the patient. Gram-stained smears of the corneal scrapings showed numerous polymorphonuclear leukocytes and confirmed the presence of gram-negative bacilli arranged in pairs. When grown on 5% sheep blood agar for 24 h, *M. nonliquefaciens* formed colonies that appeared translucent, glistening, and spreading, with diameters ranging between 1.0 and 2.0 mm. However, identification cannot be based only on colony morphology because it changes depending on the culture medium used and is different among the strains of *M. nonliquefaciens*. Moreover, a *Moraxella catarrhalis* strain is known to have morphology similar to that of *M. nonliquefaciens*. Therefore, detection of this organism in respiratory-tract clinical samples requires caution. Biochemical tests are not sufficient to confirm the identity of this organism. However, 16S rRNA gene sequencing and mass spectrometry successfully identified the isolates. The etiological agents of corneal ulcer have changed overtime. Therefore, it is important to accurately identify this organism and carry out antimicrobial susceptibility tests.