

[症例報告]

POM-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生を有する *Pseudomonas otitidis* を分離した 6 例

西山直哉¹⁾・上地幸平¹⁾²⁾・當銘高明²⁾・下地真里有²⁾・大城健哉³⁾

仲松正司¹⁾・金城武士¹⁾・健山正男¹⁾・藤田次郎¹⁾

¹⁾ 琉球大学大学院医学研究科感染症・呼吸器・消化器内科学

²⁾ 琉球大学医学部附属病院検査・輸血部

³⁾ 那覇市立病院検査室

(平成 30 年 7 月 3 日受付, 平成 30 年 10 月 31 日受理)

Pseudomonas otitidis は 2006 年に新種報告された *Pseudomonas* 属菌である。今回我々は *P. otitidis* を分離した 6 症例を経験した。3 例は喀痰, 2 例は耳分泌物, 1 例は糞便から分離した。生化学的性状やコロニーの形態などにより当初は *P. aeruginosa* や *P. putida* と同定したが, 16S rRNA と MALDI-TOF MS での解析により本菌と同定した。薬剤感受性検査では, カルバペネム系抗菌薬に耐性であるが, 抗緑膿菌作用を有するペニシリン系, セファロスポリン系抗菌薬に対して感性であった。本菌は染色体性メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) である POM-1 (*P. otitidis* MBL-1) を産生するため, 特徴的な薬剤感受性を示すと考えられた。カルバペネム系抗菌薬のみ耐性を認める *Pseudomonas* 属菌を認めた際には本菌を念頭に置く必要がある。

Key words: *Pseudomonas otitidis*, メタロ-β-ラクタマーゼ, POM-1, MALDI-TOF MS

序 文

Pseudomonas otitidis は, 耳感染症例に多く分離される *Pseudomonas* 属の一種で, その最大の特徴として染色体性メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 産生がある。生化学的性状やコロニー形態の類似性から *Pseudomonas aeruginosa* と誤同定されることがあるが, *P. aeruginosa* と異なる特徴的な薬剤感受性を有しており, 同定にあたっては注意が必要である。今回我々は, *P. otitidis* を分離した 6 症例を経験したので報告する。

症 例

症例 1: 40 歳代, 男性

主訴: 発熱

既往歴: 15 年前より左側舌癌の術後経過中に発症した下顎骨髄炎で通院中。

現病歴: 慢性下顎骨髄炎と下顎骨皮膚露出に対して下顎骨部分切除術, 遊離腹直筋皮弁再建術, 気管切開術が施行された。術後 2 日目に 39°C の発熱が出現し, 人工呼吸器関連肺炎が疑われ, 術後より開始していた sulbactam/ampicillin (SBT/ABPC) を meropenem (MEPM) へ変更し抗菌薬治療が継続された。同日の喀痰培養より *P. otitidis* と *Klebsiella pneumoniae* が分離された。術後 6 日目より cefepime (CFPM) へ変更となり, 症状の改善が認められたため術後

9 日目に抗菌薬治療が終了となった。*P. otitidis* は当初, *P. putida* と同定されていた。カルバペネム系抗菌薬に耐性を示し, カルバペネマーゼ産生の確認試験により MBL 産生が疑われたため, 術後 7 日目より接触感染予防策を実施した。16S rRNA 遺伝子解析により *P. otitidis* と最終的に同定され染色体性 MBL 産生菌と確認されたため, 術後 13 日目に接触感染予防策は解除した。

症例 2: 70 歳代, 女性

主訴: 振戦, 食事摂取不良

既往歴: 9 年前からパーキンソン病で通院中。

現病歴: パーキンソン病治療に伴う wearing-off 症状のため内服が困難となり, 経鼻胃管チューブ留置による内服, 栄養管理のため緊急入院となった。入院時に発熱があり, 胸部 CT で右中下葉のすりガラス影を認め, 誤嚥性肺炎の診断となり SBT/ABPC による抗菌薬治療が開始となった。入院第 3 病日の喀痰より, *P. otitidis*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* complex, *Stenotrophomonas maltophilia* が分離された。入院第 8 病日, 末梢血好酸球増多を認め薬剤性好酸球増多症が疑われ SBT/ABPC は終了となった。

症例 3: 80 歳代, 女性

主訴: 発熱

既往歴: 10 年前に胸腹部大動脈人工血管置換術。

現病歴: 胸部大動脈残存瘤に対する人工血管置換術を施行され, 術後腎機能障害に伴う透析導入やカテーテル関連血流感染症などが原因で長期入院となっていた。術後 155 日目に軟便が出現し, *Clostridioides difficile* 感染症の鑑別目的に提出した便培養より *P. otitidis*, *K. pneumoniae*, *Escherichia coli* が分離された。

症例 4: 10 歳代, 女性

主訴: 喀痰増加

著者連絡先: (〒903-0215) 沖縄県西原町字上原 207
琉球大学大学院医学研究科感染症・呼吸器・消化器内科学
西山直哉
TEL: 098-895-1144
FAX: 098-895-1414

既往歴：キアリ奇形2型，上肢攣縮，痙性斜頸，側弯症，気管切開術後，神経因性膀胱，症候性てんかん。

現病歴：小児科外来定期受診時に，気管カニューレからの分泌物が多いとの訴えがあり，気管内痰の培養検査が実施され，*P. otitidis*，*α-streptococcus* が分離された。約2ヶ月後に喀痰培養が再度行われ，*P. otitidis* と *Streptococcus pyogenes*，*Neisseria* spp. が分離された。

症例5：60歳代，男性

既往歴：HBV無症候性キャリア。

現病歴：耳の違和感から近医耳鼻科を受診し外耳道癌が疑われ，紹介受診した。初診時の耳分泌物培養より *P. otitidis* が分離された。

症例6：60歳代，女性

既往歴：肺気腫，慢性中耳炎。

現病歴：3年前より左中耳炎により近医耳鼻科通院。来院1ヶ月前より聞こえづらさを自覚し中耳炎の診断を受け加療されたが，症状の改善が得られず紹介受診となった。初診時の左耳分泌物培養より *P. otitidis* が分離された。

微生物学的検査

分離培養および菌種同定，薬剤感受性検査：

上記6症例を表1にまとめた。症例1，2，4の喀痰，症例5，6の耳分泌物のグラム染色標本ではいずれもグラム陰性桿菌が観察された（症例3は，*C. difficile* と薬剤耐性菌のス

クリーニング検査を実施し塗抹検査は実施していない）。症例1，2，4はヒツジ血液寒天培地，チョコレート寒天培地，MacConkey寒天培地（いずれも日本BD），症例3はMacConkey寒天培地，症例5はチョコレート寒天培地，MacConkey寒天培地を用い，35℃にて18時間分離培養を行った。翌日，各培地上に *P. aeruginosa* 様の集落が観察され（図1），チトクロームオキシダーゼ試験陽性であった。質量分析計VITEK MS（bioMérieux）では同定結果が得られなかったことから，VITEK2 GN同定カード（bioMérieux）およびTSI寒天培地，シモンズのクエン酸塩培地，アセトアミド培地（いずれも栄研化学）を用いて菌種同定を行った。VITEK2では *P. aeruginosa*（49%）と *P. putida*（51%）と2菌種が鑑別に挙がったが，アセトアミド培地陰性の結果より，*P. putida* と同定した。薬剤感受性検査はVITEK2 AST-N309カード（bioMérieux）によりMICを測定した（表2）。抗緑膿菌作用を有するβ-ラクタム系抗菌薬のうち，piperacillin，ceftazidime，CFPMはMICの極端な上昇は認められなかったが，カルバペネム系抗菌薬においては感性の範囲内でもMICは高め，もしくは耐性と判定される値であり，doripenem（DRPM）に関してはbreakpointの設定がないもののMICが高かった。カルバペネム系抗菌薬に耐性を示すことからmodified Carbapenem Inactivation Method（mCIM）によるカルバペネマーゼ確認試験を実施し，メタロ-β-ラクタマーゼSMA‘栄研’（栄研化学）を用いてSMA法によるMBL産生確認試験を行った（表3）。mCIMではMEPMディスクに阻止円が形成されないことからカルバペネマーゼ産生が疑われ，SMA法ではMEPMディスクの阻止円径が垂直方向に5mm以上拡張していることからMBL産生菌であることが疑われた。カルバペネマーゼ産生遺伝子の検出はIMP，VIM，KPC，NDM，GES型およびOXA-48-like遺伝子を対象としてPCR法¹⁾²⁾を行ったが，いずれの遺伝子型も陰性であった。いずれの症例においてもペニシリン系およびセファロスポリン系抗菌薬のMICの極端な上昇が認められないこと，MBLを産生しているにも関わらず，IMPやVIM，NDM

表1. *P. otitidis* を分離した6例

症例	年齢	性別	検出検体	診断
1	40歳代	男	気管支内痰	人工呼吸器関連肺炎
2	70歳代	女	喀痰	誤嚥性肺炎
3	80歳代	女	糞便	保菌
4	10歳代	女	気管支内痰	保菌
5	60歳代	男	耳分泌物	保菌
6	60歳代	女	耳分泌物	慢性中耳炎

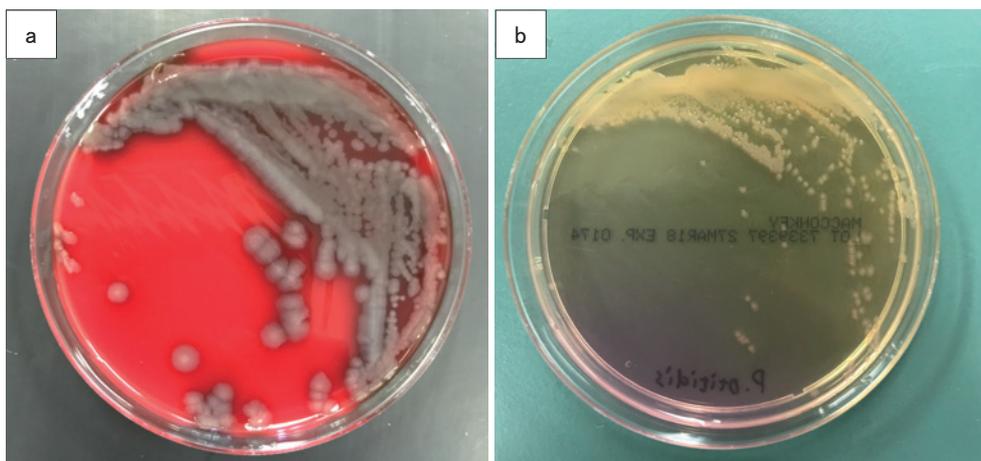


図1. 各種培地におけるコロニー像

a. ヒツジ血寒天培地

b. MacConkey寒天培地

いずれも35℃，18時間培養

表 2. 微量液体希釈法 (VITEK 2) による薬剤感受性検査結果

抗菌薬	MIC ($\mu\text{g/mL}$)					
	症例 1	症例 2	症例 3	症例 4	症例 5	症例 6
Piperacillin	16	≤ 4	16	8	≤ 4	8
Tazobactam/piperacillin	4/8	$\leq 4/4$	4/16	4/8	$\leq 4/4$	$\leq 4/4$
Ceftazidime	4	2	4	2	2	4
Cefepime	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	2
Aztreonam	16	4	16	16	2	4
Imipenem	2	2	8	2	2	2
Meropenem	≥ 16	4	≥ 16	8	≥ 16	8
Doripenem	≥ 8	≥ 8	≥ 8	≥ 8	≥ 8	≥ 8
Gentamicin	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Tobramycin	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Amikacin	≤ 2	≤ 2	≤ 2	≤ 2	≤ 2	≤ 2
Levofloxacin	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	2
Ciprofloxacin	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	0.5
Sulfamethoxazole/trimethoprim	$\leq 1/19$	$\leq 1/19$	$\leq 1/19$	$\leq 1/19$	$\leq 1/19$	$\leq 1/19$
Colistin	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5

型などの主要な MBL 遺伝子が陰性であることなどより菌種の誤同定を疑い、16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析を実施した。症例 1-5 では、得られた塩基配列 (約 1,500 bp) を EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) にて解析した結果、*P. otitidis* MCC10330 (T) (Accession no. AY953147) と各々高い相同性 (99.8-100%) を認めた (表 3)。後日に行った、ID テスト NF-18 (ニッスイ) を用いた本菌の生化学的性状と MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) の結果を表 3 に示す。MALDI Biotyper による同定は症例 1-5 で実施し、5 例ともに Score Value が 2,000 以上で *P. otitidis* と同定された。また、*P. otitidis* が染色体性に保有する POM-1 (*P. otitidis* MBL-1) 型 MBL 産生遺伝子 (*bla*_{POM-1} 遺伝子) の有無を確認するため、プライマー POM-1_seq/F (5'-CTGCACAGCCACGCCAC) と POM-1_seq/R (5'-GTCATGCCGCCAGCTCC) を用いた PCR 検査を行ったところ、すべての株において *bla*_{POM-1} 遺伝子が検出された。

考 察

P. otitidis は、2006 年に新種として報告された *Pseudomonas* 属の一種であり耳感染症からの分離が多いことに因んで命名されている³⁾。運動性を有するグラム陰性桿菌であり、トリプチケースソイ寒天培地では、円形、陥凹、非色素性のコロニーを形成し、5% ヒツジ血液含有トリプチケースソイ寒天培地上のコロニーに溶血性は見られない³⁾。*P. otitidis* の感染例は、外耳道炎や中耳炎等の耳感染症が多く³⁾⁴⁾、その他、壊死性筋膜炎、汎発性腹膜炎の報告がある⁵⁾。また、環境や食物 (鶏肉、豚肉) からの分離も報告されている^{6)~8)}。自験例では、3 症例が痰、1 症例が糞便、2 症例が耳分泌物より本菌を分離した。3 症例は感染症状がなく保菌例と考えられ、2 症例は肺炎、1 症例は中耳炎の治療経過での分離であった。

P. otitidis は、16S rRNA 遺伝子の解析において *Pseudomonas* 属菌の中でも *P. aeruginosa* に相同性が高く、生化学的性状やコロニーの形状など表現型においても *P. aerugi-*

nosa と類似している³⁾。表現型のみでは *P. aeruginosa* との鑑別は困難であり、16S rRNA 遺伝子解析など分子生物学的手法により鑑別がなされる。過去に表現型のみで同定された *P. aeruginosa* や他の *Pseudomonas* 属と同定された中に、本菌が誤同定され含まれている可能性がある。Motoshima らは、real-time PCR 法による *gyrB* 遺伝子の検出を基に *P. aeruginosa* の迅速同定法を報告したが、表現型により *P. aeruginosa* と同定された 104 株のうち 2 株が *gyrB* 遺伝子陰性であり、これが *P. otitidis* であった⁹⁾。近年では、質量分析法 MALDI-TOF MS での同定が可能であり、MALDI Biotyper を用いた同定報告がある³⁾。Kim らは、過去に表現型で *P. aeruginosa* と判定されカルバペネム系薬耐性であった 201 株を、MALDI Biotyper を使用した質量分析法により再同定を行ったところ、1 株が *P. otitidis* であったと報告している⁵⁾。当院での分離例を用いた検討において、VITEK MS では同定結果が得られなかったものの、MALDI Biotyper では同定可能 (5 株で同定、1 株は未実施) であった。

P. otitidis の特徴として、染色体性 MBL 遺伝子の保有による MBL 産生があり、*Pseudomonas* 属の中で初めて染色体性に MBL 産生遺伝子を有する種であると報告された¹⁰⁾。本菌種の産生する MBL は、サブクラス B3 であり、POM-1 と総称され、*Stenotrophomonas maltophilia* が産生する L1 MBL に最も近い¹⁰⁾。POM-1 は、カルバペネム系薬、ペニシリン系薬の基質分解能が高く、セファロsporin 系薬で低い傾向がある¹¹⁾。臨床分離株の薬剤感受性検査では、カルバペネム系で中間から耐性と判定される一方で、PIPC やセファロsporin 系薬に感性和判定されることが多い¹⁰⁾¹²⁾。当院での分離例でも同様の傾向が見られた (表 2)。

本菌はカルバペネム系薬に関して inoculum size effect があることが指摘されている¹⁰⁾。今回分離した 6 株において、それぞれ菌量を 10^5 CFU/mL と 10^7 CFU/mL に調整した懸濁液を用いた微量液体希釈法によって MEPM と IPM の MIC を測定したところ、MEPM においては 5 株で 3 管差の上昇を認めた (表 4)。*P. otitidis* に対する抗菌薬選択におい

表3. 6症例からの分離株の生化学的性状, カルバペネマーゼ確認検査, 質量分析法および16S rRNA解析による同定結果

	症例1	症例2	症例3	症例4	症例5	症例6
生化学的性状						
オキシダーゼ	+	+	+	+	+	+
TSI	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
シモンズ	+	+	+	+	+	+
アセトアミド	-	-	-	-	-	-
グルコース (ブドウ糖)	+	+	+	+	+	+
フルクトース (果糖)	+	+	+	+	+	+
マルトース (麦芽糖)	-	-	-	-	-	-
ガラクトース	-	-	-	-	-	-
キシロース	-	-	-	-	-	-
マンニット	-	-	-	-	-	-
サッカロース (白糖)	-	-	-	-	-	-
ラクトース (乳糖)	-	-	-	-	-	-
エスクリン分解	-	-	-	-	-	-
ウレアーゼ	-	-	-	-	-	-
クエン酸塩利用	+	+	+	+	+	+
ONPG	-	-	-	-	-	-
リジン脱炭酸	-	-	-	-	-	-
アルギニン脱炭酸	+	+	+	+	+	+
オルニチン脱炭酸	-	-	-	-	-	-
インドール反応	-	-	-	-	-	-
硝酸塩還元	+	+	w ⁺	-	-	w ⁺
ゼラチン液化	+	+	+	+	+	+
アシルアミダーゼ	-	-	-	-	-	-
カルバペネマーゼ						
確認試験						
mCIM (mm)	6*	6*	6*	6*	6*	6*
SMA	+(MEPM)	+(MEPM)	+(MEPM)	+(MEPM)	+(MEPM)	+(MEPM)
質量分析						
MALDI Biotyper Score Value	2.167	2.317	2.106	2.152	2.218	NT
16S rRNA 遺伝子解析						
解析相同率 (%)	99.93 (MCC10330 ^T)	99.86 (MCC10330 ^T)	100 (MCC10330 ^T)	99.88 (MCC10330 ^T)	99.80 (MCC10330 ^T)	NT

+ : positive, w⁺ : weakly positive, - : negative, NT : not tested

* 阻止円を認めず

表4. 接種菌量の違いによるカルバペネム系薬のMIC値への影響

	MIC (μg/mL)					
	Ipimenem			Meropenem		
	10 ⁵ CFU/mL	10 ⁷ CFU/mL	管差	10 ⁵ CFU/mL	10 ⁷ CFU/mL	管差
症例1	2	4	+1	8	64	+3
症例2	1	4	+2	4	32	+3
症例3	2	8	+2	16	128	+3
症例4	2	8	+2	8	64	+3
症例5	2	16	+3	8	64	+3
症例6	1	4	+2	8	32	+2

では, inoculum size effect があること, また, 排出ポンプの作用もあるためカルバペネム系抗菌薬の使用は避けることが望ましい¹⁰⁾。

本菌のカルバペネマーゼを検出する際は, 表現型を用いた確認試験のみでは, プラスミド性もしくは染色体性のMBLなのかは鑑別できない。症例1では, *P. otitidis* と同定結果

が得られる前に mCIM 陽性, SMA による阻害試験陽性であることが判明し, プラスミド性 MBL 産生菌である可能性を考慮し感染対策を講じるに至った。追加試験により *P. otitidis* との同定結果が得られたこと, IMP 型など主要なカルバペネマーゼ遺伝子が陰性であったことから, 染色体性 MBL 産生菌と考え, カルバペネマーゼ産生遺伝子の伝播リスクが低いと判断し感染対策を変更した。プラスミド性にカルバペネマーゼ遺伝子が伝播される場合では, 院内感染対策へ与える影響が染色体性の場合と比べ大きいことが考えられるため, 本菌のような染色体性 MBL 産生菌は分けて考える必要がある。

本論文の要旨は第 29 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 (2018 年 2 月) において発表した。

利益相反: 申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) Poirel, L., T.R. Walsh, V. Cuvillier, et al. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70: 110-123.
- 2) Dallenne, C., A. Da Costa, D. Decré, et al. 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 65: 490-495.
- 3) Clark, L.L., J.J. Dajcs, C.H. McLean, et al. 2006. *Pseudomonas otitidis* sp. nov., isolated from patients with otic infections. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 709-714.
- 4) Roland, P.S., D.W. Stroman. 2002. Microbiology of acute otitis externa. *Laryngoscope* 112: 1166-1177.
- 5) Kim, D., S.K. Hong, Y.H. Seo, et al. 2016. Two non-otic cases

- of POM-1 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas otitidis* infection: Necrotizing fasciitis and pan-peritonitis. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 7: 157-158.
- 6) Rodríguez-Verdugo, A., V. Souza, J.E. Eguiarte, et al. 2012. Diversity across Seasons of Culturable *Pseudomonas* from a Desiccation Lagoon in Cuatro Ciénegas, Mexico. *Int. J. Microbiol.* 2012: 201389.
- 7) Mehri, I, Y. Turki, M. Chair, et al. 2011. Genetic and functional heterogeneities among fluorescent *Pseudomonas* isolated from environmental samples. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 57: 101-114.
- 8) Wong, M.H., E.W. Chan, S. Chen. 2015. Isolation of carbapenem-resistant *Pseudomonas* spp. from food. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 3: 109-114.
- 9) Motoshima, M., Y. Yanagihara, K. Fukushima, et al. 2007. Rapid and accurate detection of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis targeting *gyrB* gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58: 53-58.
- 10) Thaller, M.C., L. Borgianni, G. Di Lallo, et al. 2011. Metallo-beta-lactamase production by *Pseudomonas otitidis*: a species-related trait. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 55: 118-123.
- 11) Borgianni, L., F. De Luca, M.C. Thaller, et al. 2015. Biochemical characterization of the POM-1 metallo- β -lactamase from *Pseudomonas otitidis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 59: 1755-1758.
- 12) Lee, K., C.K. Kim, D. Yong, et al. 2011. POM-1 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas otitidis* isolate from a patient with chronic otitis media. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 72: 295-296.

Six cases of POM-1 metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas otitidis* isolated from clinical specimens

Naoya Nishiyama¹⁾, Kohei Uechi^{1) 2)}, Takaaki Tome²⁾, Maria Shimoji²⁾, Takeya Ohshiro³⁾, Masashi Nakamatsu¹⁾, Takeshi Kinjo¹⁾, Masao Tateyama¹⁾, Jiro Fujita¹⁾

¹⁾Department of Infectious, Respiratory and Digestive Medicine, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan

²⁾Division of Clinical Laboratory and Blood Transfusion, University of the Ryukyus Hospital, Okinawa, Japan

³⁾Division of Clinical Laboratory, Department of Medical Technology, Naha City Hospital, Okinawa, Japan

Pseudomonas otitidis was first described in 2006 as a causative agent of otic infections. Here, we report six cases of *P. otitidis* isolated from clinical specimens (three from sputum, two from otorrhea, one from stool). Isolates were originally misidentified by morphological and biochemical characters as *P. aeruginosa* or *P. putida*. However, analysis of 16S rRNA sequences and using the MALDI-TOF MS system revealed our isolates to be *P. otitidis*. All strains were susceptible to piperacillin and antipseudomonal cephalosporins, although resistance or decreased susceptibility to carbapenems was observed. *P. otitidis* has a resident metallo- β -lactamase (MBL) gene and produces an MBL, named POM-1. When *Pseudomonas* isolates show unusual β -lactam susceptibility, physicians should suspect *P. otitidis* and use carbapenem-based regimens with caution.