

[症例報告]

IMP-6 メタロ-β-ラクタマーゼ産生 *Leclercia adecarboxylata* による 肝内胆管癌に伴う腹腔内遺残膿瘍の1症例

笹垣貴美¹⁾・上田恒平²⁾・田中美智男³⁾・松村康史³⁾

¹⁾ 市立豊中病院臨床検査部

²⁾ 市立豊中病院感染対策室

³⁾ 京都大学医学部附属病院検査部・感染制御部

(令和元年10月8日受付, 令和2年2月19日受理)

症例は50代男性。1週間前から発熱, 右季肋部痛があり, 近医を受診した際, 腹部エコーにて肝S4に30 mm大の腫瘤を認めたため当院消化器内科を受診。造影CTにて肝腫瘤の横行結腸穿通と診断され, 精査加療目的に入院となった。その後, 肝拡大前区域切除術, 胆嚢摘出術をおこない, 術後2日目に提出された左肝管と後区域枝肝管ドレーン排液よりグラム陰性桿菌を多数認めた。分離培養を実施したところ翌日に発育を認め, VITEK 2および質量分析装置 MALDI Biotyperにて *Leclercia adecarboxylata* と判定された。薬剤感受性検査では meropenem に耐性 (MIC>4 μg/mL) を示し, modified carbapenem inactivation method が陽性。全ゲノム解析を実施したところプラスミド上にIMP-6型カルバペネマーゼ遺伝子が存在していることが疑われ, プラスミド伝達による耐性遺伝子獲得が推定された。*L. adecarboxylata* はヒトからの分離例が稀であり, 抗菌薬に対し感受性を示す株が多い。しかし今回, カルバペネマーゼ遺伝子陽性株が検出されたことから, 今後カルバペネム耐性菌として本菌が広がる可能性が示唆された。

Key words: *Leclercia adecarboxylata*, カルバペネム耐性菌, IMP-6, プラスミド伝播

序 文

Leclercia adecarboxylata は通性嫌気性グラム陰性桿菌, オキシダーゼ陰性で1962年にLeclercによって *Escherichia adecarboxylata* として最初に報告された菌種である¹⁾。その後, DNA表現型の違いにより新たに *Leclercia adecarboxylata* として分類された²⁾。本菌は食品や環境からの分離例が多数報告されており³⁾, ヒト臨床材料から分離されるのは稀であるが, 血液培養, 糞便, 喀出痰などからの検出が報告されている⁴⁾。今回, 肝内胆管癌切除術後の腹腔内遺残膿瘍よりIMP-6メタロ-β-ラクタマーゼ産生 *L. adecarboxylata* を検出したため報告する。

症 例

患者: 50代, 男性

既往歴: 胃癌で胃全摘 (33歳), 腸閉塞 (34歳)

生活歴: 飲酒・喫煙なし

主訴: 肝腫瘤

現病歴: 20XX年6月上旬頃から発熱, 右季肋部痛あり。近医でcefcape pivoxillを投与されたが改善しないため, 一週間後に他院を受診したところ腹部エコーにて肝S4に30 mm大の腫瘤像を認めた。その翌日, 当院消化器内科に紹介

受診となり, 造影CTにて肝腫瘤の横行結腸穿通と診断されたのち, 当院外科に精査加療目的に緊急入院となった。

入院時所見: 体温37.9度, 血圧103/55 mmHg, 脈拍76回/分。意識清明。嘔気, 倦怠感なし。腹部は平坦・軟で右季肋部に圧痛あり。血液検査は白血球8,000/μL, CRP 8.24 mg/dLであった。

画像所見: 入院時の腹部CT所見では, 肝S5に腫瘤影あり, 壁外に突出し横行結腸に浸潤を認めた。腫瘤内にはガス像があり, 横行結腸浸潤による交通を疑う所見であった (Fig. 1)。

入院経過: 肝拡大前区域切除術, 胆嚢摘出術, 横行結腸部分切除術を行い cefmetazole (CMZ) の投与が開始された。術後2日に体温38.6度, 白血球数9,300/μL, CRP 11.45 mg/dLと炎症反応の上昇あり。また腹部膨満感, 創部痛の増強があり手術部位感染が疑われた。左肝管ドレーンおよび後区域枝肝管ドレーンから茶黒色排液を認めたため細菌培養と血液培養2セットが提出された。術後7日に, 血圧低下をきたしショック状態となり, 胆管炎または遺残膿瘍が原因として疑われた。抗菌薬適正使用支援チームで検討した結果, 術後2日目に採取した各ドレーン培養から検出されていたカルバペネム耐性 *L. adecarboxylata* は, tazobactam/piperacillin に感受性であり (Table 1), 緑膿菌を含むグラム陰性桿菌や偏性嫌気性菌などその他に考えうる原因菌のカバーも可能と考えられたことから tazobactam/piperacillin へ抗菌薬を変更した。病理検査において肝内胆管癌と診断され, ドレナージおよび抗菌薬療法を継続し, 軽快退院となった。

著者連絡先: (〒560-8565) 大阪府豊中市柴原町4-14-1
市立豊中病院臨床検査部
笹垣貴美
TEL: 06-6843-0101 (内線 3210)
E-mail: t-33gaki@chp.toyonaka.osaka.jp



Fig. 1. Abdominal contrast-enhanced computed tomography image. A hepatic mass with air was present

Table 1. Antimicrobial susceptibilities of the *L. adecarboxylata* isolate

Antimicrobial agents	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Ampicillin	>16
Piperacillin	>64
Ampicillin/Sulbactam	>16
Tazobactam/Piperacillin	≤ 4
Cefazolin	>8
Cefmetazole	>32
Latamoxef	>32
Cefotaxime	>4
Ceftazidime	>8
Cefpodoxime	>4
Aztreonam	>8
Imipenem/cilastatin	≤ 1
Meropenem	>4
Gentamicin	4
Amikacin	≤ 8
Minocycline	>8
Ciprofloxacin	2
Levofloxacin	2

微生物学的検査

術後2日に提出された左肝管と後区域肝管ドレーン排液について3,500 rpm, 10分間遠心し, その沈渣を用いてグラム染色と分離培養検査を実施した。両検体ともにグラム陰性桿菌を認め, 分離培養はチョコレートII寒天培地(日本ベクトン・ディッキンソン:以下日本BD), TSAII5%ヒツジ血液寒天培地(以下血液寒天培地, 日本BD), コロンビアCNA5%ヒツジ血液寒天培地(日本BD)を用いて35°C, 5%炭酸ガス培養とBTB乳糖加寒天培地(日本BD)を用いて35°Cにて好気培養を行った。24時間培養後, 左肝管と後区域肝管ドレーン排液の両検体からチョコレート寒天, 血液寒天, BTB乳糖加寒天培地にチトクロームオキシダーゼ試験陰性のグラム陰性桿菌の発育を認めた(Fig. 2)。TSI培地(栄研化学), LIM培地(栄研化学)の確認試験培地に接種すると



Fig. 2. The colonies on blood agar medium and BTB agar medium after 24 hours of incubation

ともに得られたコロニーよりVITEK 2(バイオメリュー)を用いて同定検査を実施した。確認試験では糖を発酵的に分解し, ガス産生あり, リジン脱炭酸試験陰性, インドール試験陽性, 運動性を認めた。VITEK 2の結果は97%の同定確率で*L. adecarboxylata*と判定された。また, 質量分析装置MALDI Biotyper(ブルカー・ダルトニクス)でも同定検査を実施したところScore Value 2.457で*L. adecarboxylata*と判定された。

薬剤感受性試験はPhoenix(日本BD)にてグラム陰性菌用NMIC/ID-208パネルを用いて測定し, 判定はCLSI M100-S22に基づき判定した。meropenem(MEPM)がMIC>4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と耐性を示したため(Table 1)追加試験としてCLSIにてカルバペネマーゼ検出法として推奨されているmodified carbapenem inactivation methodを実施したところ陽性と判定された。全自動核酸抽出増幅検査システムBD MAX(日本BD)のCheck-Points CPOキットにて耐性遺伝子検索を実施した結果, IMP遺伝子が検出された。Nextera XTおよびNextSeq500(Illumina社)を用いて菌株の全ゲノムシーケンズを行った。SPAdes ver. 3.12.0を用いた*de novo*アセンブリの結果, 4.9 M bpのドラフトゲノムが得られた(Genbank WGS accession no. WQRG00000000)。JSpecies V 1.2.1のANIbを用いた解析の結果, *L. adecarboxylata* ATCC 23216^Tとのaverage nucleotide identityが98.6%であり同菌であることが確認された。AMRFinderおよびPlasmidFinderを用いた耐性遺伝子とプラスミドレプリコンの検索により $bla_{\text{CTX-M}2}$, $bla_{\text{IMP}6}$, $aacA4'$, $aadA2$, $tet(A)$, $sull$ が検出され, これらは全てIncN1レプリコンを有する51 kbpのコンティグ上に存在していた。このコンティグは2009年に広島で分離された*Klebsiella pneumoniae*が保有していた $bla_{\text{IMP}6}$ 陽性IncN1プラスミドであるpKPI-6(47 kbp; DDBJ accession no. AB616660)の配列を包含しており, 99.9%の相同性を示した。

なお, 同日に提出された血液培養からは菌の発育を認めなかった。

考 察

これまでの報告によれば, *L. adecarboxylata*は免疫機能が低下した患者から単独感染として検出されることがほとんどで, 免疫応答性に問題の無い患者からは複数菌感染のうちの1菌種として検出される⁵⁾。今回の症例では初回のドレーン排液からは単独分離されたが, その後は*Enterococcus fae-*

cium, *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* complex と同時に検出された。

L. adecarboxylata は *Escherichia coli* と比べ、リジン脱炭酸試験およびオルニチン加水分解試験が陰性である点が異なっているものの、生化学性状の類似点が多く、またコロニー性状もよく似ているため誤同定される可能性がある。そのため過小報告されているのではないかとの見解もある⁶⁾。今回分離された菌株はコロニー性状が *E. coli* と異なっていた点や、確認試験培地を併用していたため判別がつきやすかったが、同定検査を実施する際は全自動同定感受性検査システムだけではなく、用手法や質量分析装置等、複数を利用するなど誤同定も念頭に置き検査を実施する必要があると思われる。

L. adecarboxylata は、通常ほとんどの抗菌薬に感受性を示す株が多いが、現在までに多剤耐性の *L. adecarboxylata* による肺炎症例⁷⁾や、*bla*_{SHV-12} extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 遺伝子陽性株による急性骨髄性白血病患者の菌血症例⁸⁾、肺癌患者において *bla*_{CTX-M-3} 型 ESBL 陽性株の検出⁹⁾などの報告事例がある。また、カルバペネマーゼ産生株においては環境中からの検出事例はあるものの、臨床検体からの検出事例は Riazzo¹⁰⁾らが足の外傷患者より NDM-1 産生型 *L. adecarboxylata* の報告を含め、数例しかなく非常に稀である。今回我々が分離した株は piperacilin, cefotaxime, ceftazidime, MEPM など多くの薬剤に耐性を示しており、カルバペネム系薬に関しては、MEPM は MIC > 4 μ g/mL であったが、imipenem (IPM) は MIC \leq 1 μ g/mL と低い値を示す IMP-6 メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌であった。IMP-6 メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌は MEPM には耐性となるものの、IPM の分解活性が低く感性を示す特徴がある¹¹⁾。そのため検出が困難な場合があり、その特徴からステルス型と呼ばれている。広島では IPM 以外のほぼすべての β -ラクタム薬に耐性を示す *Klebsiella pneumoniae* が分離され、ISM RK (imipenem-susceptible but meropenem-resistant *Klebsiella*) として報告されている¹²⁾。責任遺伝子である *bla*_{IMP-6} は、これまでの解析では 47,236 bp の接合伝達性プラスミドである pKPI-6 上のインテグロンに存在している¹¹⁾。pKPI-6 は *bla*_{IMP-6} に加え ESBL 遺伝子である *bla*_{CTX-M-2} を有しており、そのためほぼすべての β -ラクタム薬に耐性を示すが、IPM のみに感受性を示すという表現型を示す。pKPI-6 は *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii* など多くの腸内細菌科細菌に伝播する性質を持っており、2014 年には西日本の病院で IMP-6 産生株による大規模なアウトブレイク事例も発生するなど、*Klebsiella* 属以外の腸内細菌科細菌に属する多くの菌種からも本プラスミドあるいは類似プラスミドが確認されている¹²⁾。したがって本分離株もゲノム解析の高い相同性から pKPI-6 類似の IncN プラスミドにより IMP-6 メタロ- β -ラクタマーゼを得たと推測される。院内感染対策として個室隔離および接触予防策を実施し、他患者から検出された腸内細菌科細菌について注視に努めた。なお、同時期に別病棟の患者から *L. adecarboxylata* が検出されたが、IMP-6 非産生株であった。また、他菌種でも同時期に IMP-6 産生を疑う菌株の検出はなかった。

今回、臨床検体からメタロ- β -ラクタマーゼ遺伝子および ESBL 遺伝子保有 *L. adecarboxylata* が検出されたことにより、今後、他菌種への広がりが懸念されるとともに、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の同定と薬剤感受性検査について慎重に実施し注視する必要があると思われる。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) Leclerc, H. 1962. Biochemical study of pigmented *Enterobacteriaceae*. Ann Inst Pasteur 102: 726-741.
- 2) Tamura, K, R Sakazaki, Y Kosako, E Yoshizaki. 1986. *Leclercia adecarboxylata* gen. nov. formerly known as *Escherichia adecarboxylata*. Curr Microbiol 13: 179-184.
- 3) Teramoto, T, R Sakazaki. 1984. Taxonomic analysis of so-called coliform organisms isolated from food and environmental materials. J Food Hyg Soc Jpn 25: 322-328.
- 4) Richard, C. 1989. New *Enterobacteriaceae* found in medical bacteriology *Moellerella wisconsensis*, *Koserella trabulsii*, *Leclercia adecarboxylata*, *Escherichia fergusonii*, *Enterobacter asburiae*, *Rahnella aquatilis*. Ann Biol Clin 47: 231-236.
- 5) Longhurst, C. A., D. C. West. 2001. Isolation of *Leclercia adecarboxylata* from an infant with acute lymphoblastic leukemia. Clin Infect Dis 32: 1659.
- 6) Hess, B, A Burchett, M. K. Huntington. 2008. *Leclercia adecarboxylata* in an immunocompetent patient. J Med Microbiol 57 (pt7): 896-898.
- 7) Eiland, E. H. 3rd, H Siddiqui, A. M. Goode, et al. 2013. Pneumonia due to multi drug resistant *Leclercia adecarboxylata*. Am J Health Syst Pharm 70 (11): 940-941.
- 8) Mazzariol, A, J Zuliani, R Fontana, et al. 2003. Isolation from blood culture of a *Leclercia adecarboxylata* strain producing an SHV-12 extended-spectrum beta-lactamase. J Clin Microbiol 41 (4): 1738-1739.
- 9) Shin, G, M You, H Lee, et al. 2012. Catheter-Related Bacteremia Caused by Multidrug-Resistant *Leclercia adecarboxylata* in a Patient with Breast Cancer. J Clin Microbiol 50 (9): 3129-3132.
- 10) Riazzo, C, L Lopez-Cerero, MD Rojo-Martin, et al. 2017. First report of NDM-1-producing clinical isolate of *Leclercia adecarboxylata* in Spain. Diagn Microbiol Infect Dis 88 (3): 268-270.
- 11) Yano, H, A Kuga, R Okamoto, et al. 2001. Plasmid-encoded metallo- β -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. Antimicrob. Agents Chemother 45 (5): 1343-1348.
- 12) Kayama, S, N Shigemoto, R Kuwahara, et al. 2015. Complete Nucleotide Sequence of the IncN Plasmid Encoding IMP-6 and CTX-M-2 from Emerging Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* in Japan. Antimicrob Agents Chemother 59 (2): 1356-1359.

Postoperative abscess caused by IMP-6 carbapenemase-producing *Leclercia adecarboxylata*
in a patient with intrahepatic cholangiocarcinoma

Takami Sasagaki¹⁾, Kohei Ueda²⁾, Michio Tanaka³⁾, Yasufumi Matsumura³⁾

¹⁾ Department of Clinical Laboratory, Toyonaka Municipal Hospital

²⁾ Division of Infection Control, Toyonaka Municipal Hospital

³⁾ Department of Clinical Laboratory Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine

A male patient in his 50s had fever and experienced pain in the right hypochondrium for one week. When he visited a local doctor, abdominal ultrasound revealed a 30 mm-mass measuring in the liver. He was then referred to the gastrointestinal medicine department of our hospital. Based on contrast CT, the patient was diagnosed with a hepatic tumor penetrating the transverse colon. Extended resection of the anterior segment of the liver and cholecystectomy were performed. On postoperative day two, Gram staining of the drainage discharge from liver revealed gram-negative bacilli. The bacteria was identified as *Leclercia adecarboxylata* by VITEK2 and mass-spectrometry. The patient developed septic shock on postoperative day 7 and required intensive care. *L. adecarboxylata* isolate was meropenem resistant (minimum inhibitory concentration > 4 µg/mL) and carbapenemase production was confirmed using the modified carbapenemase inactivation method. Genomic analysis revealed the presence of the IMP-6 carbapenemase gene on a plasmid, suggesting its acquisition of the carbapenemase by plasmid transfer. *L. adecarboxylata* are usually susceptible to antimicrobials and are rarely isolated from humans. However, recently it has been described as an emerging human pathogen with the potential to cause severe infection in some situation. The present case raises concerns about the spread of carbapenem-resistant *L. adecarboxylata*.