

[原 著]

MALDI-TOF MS 2 機種とバイテック 2 の nutritionally variant streptococci の
同定精度の比較検討と同定に重要な生化学的性状の検討

古垣内美智子¹⁾・江成 博³⁾・吉田 敦⁴⁾⁶⁾・奥住捷子⁵⁾・河村好章⁷⁾・江口香織¹⁾
戸田宏文¹⁾・宇都宮孝治¹⁾・松浦宏美¹⁾・山口逸弘¹⁾・上谿俊法²⁾

¹⁾ 近畿大学医学部附属病院中央臨床検査部

²⁾ 近畿大学医学部附属病院臨床検査医学

³⁾ 岐阜大学生命科学総合研究支援センター嫌気性菌研究分野

⁴⁾ 獨協医科大学感染制御・臨床検査医学講座

⁵⁾ 獨協医科大学病院感染制御センター

⁶⁾ 東京女子医科大学感染症科

⁷⁾ 愛知学院大学薬学部微生物学講座

(平成 28 年 1 月 15 日受付, 平成 28 年 4 月 22 日受理)

Nutritionally variant streptococci (NVS) は感染性心内膜炎の起炎菌として重要であるが、発育が遅く同定に苦慮すると言われている。そこで今回、少ない菌量で迅速に同定可能な Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) を原理とするバイテック MS (シスメックス・バイオメリュウ社) と MALDI バイオタイパー (Bruker 社) および従来法のバイテック 2 (シスメックス・バイオメリュウ社) 間の NVS の同定精度を比較した。さらに NVS の同定に重要とされる生化学的性状についても検討を行った。対象の NVS は type strain 3 株と 16S rRNA 遺伝子で既同定の臨床分離株 3 株と健康人口腔内分離株 20 株の計 26 株を用いた。その結果、16S rRNA 遺伝子とは菌種レベルでバイテック MS は 100%、MALDI バイオタイパーは 84.6%、バイテック 2 は 65.4% 一致した。

NVS 同定に重要な生化学的性状の検討の結果、MALDI-TOF MS で同定された場合はその妥当性の評価として、チョコレート寒天培地や嫌気性菌用寒天培地と比較した羊血液寒天培地上で非発育あるいは遅発育といった挙動、コロニーのグラム染色所見がグラム不定・多形性、カタラーゼ試験が陰性、用手法の PYR 陽性の確認が NVS の特徴を押えており、短時間かつ少量のコロニーで実施可能なため重要と考える。一方、MALDI-TOF MS が導入されていない施設では、同定精度が十分とは言えないバイテック 2 などでの同定が必要である。その場合は、上記の生化学的性状に加えて、用手法のアルギニン加水分解試験、 α -galactosidase, satellitism test なども含めた同定が必要となる。

以上から、MALDI-TOF MS は従来法よりも少量の菌量で NVS を迅速かつ正確に同定可能であり、NVS 感染症診療に貢献できるものと考えられる。

Key words: nutritionally variant streptococci, MALDI バイオタイパー, バイテック MS, Satellitism test

序 文

Nutritionally variant streptococci (NVS) は *Abiotrophia defectiva*, *Granulicatella adiacens*, *Granulicatella elegans*, *Granulicatella balaenopterae* の 2 属 4 菌種の総称である。

近年、Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析; MALDI-

著者連絡先: (〒589-8511) 大阪府大阪狭山市大野東 377-2
近畿大学医学部附属病院中央臨床検査部細菌検査室
古垣内美智子
TEL: 072-366-0221 (内線 2193)
FAX: 072-366-0206
E-mail: michiko.furugaito@sayama.med.kindai.ac.jp

TOF MS) は少ない菌量で迅速に測定結果を得られることから新しい細菌同定法としてその有用性が注目されている。現在のところ、NVSのMALDI-TOF MSの検討報告¹²⁾は少ない。

今回、われわれは type strain 3 株を含む 16S rRNA 遺伝子で既同定の NVS 26 株を用いて、MALDI-TOF MS を原理とするバイテック MS (シスメックス・バイオメリュー社)、MALDI バイオタイパー (Bruker 社) と従来法のバイテック 2 (シスメックス・バイオメリュー社) 間の同定精度の比較検討を行った。さらに NVS の同定に重要な生化学的性状についても検討し、NVS をルーチン検査で同定する際に併せて確認すべき生化学的性状について考察したので報告する。

材料と方法

1. 対象菌株, 培養条件

対象株は、NVS の type strain 3 株 (*A. defectiva* PAGU 0001^T, *G. adiacens* PAGU 0142^T, *G. elegans* PAGU 0147^T) と、臨床分離株 (*G. adiacens* 3 株) および健康人の口腔内分離株 20 株 (*A. defectiva* 1 株, *G. adiacens* 16 株, *G. elegans* 3 株) の計 26 株とした。

培養条件は -80℃ でスキムミルクに保存している NVS 26 株を 5% ウサギ血液加ブルセラ HK 寒天培地 (極東製薬) に接種し、グラム染色は 36℃ 5% 炭酸ガス培養下で 2 回継代したコロニーを、その他の生化学的性状、同定は数回継代培養したコロニーを使用した。

2. MALDI-TOF MS の測定方法

1) バイテック MS の測定

バイテック MS の測定は、ワークフローに従い直接法のみを行った。ターゲットスライドに爪楊枝で少量 (1 μl 定量白金耳分, 10⁵ CFU 程度に相当) のコロニーを直接塗布後、MS-CHCA マトリックス試薬 (シスメックス・バイオメリュー社) を 1 μl 滴下し乾燥後に測定した。バイテック MS の解析ソフトは、バイテック MS V2.0、解析ソフトウェア Myla V3.2.0 を使用した。

2) MALDI バイオタイパーの測定

MALDI バイオタイパーの直接法は、ターゲットプレートに爪楊枝で少量のコロニーを直接塗布後、HCCA マトリックス試薬 (Bruker 社) を 1 μl 滴下し乾燥後に測定した。解析に用いたソフトウェアの version は version flex control 3.4.119, flex analysis 3.4.70, RTC3.1, ライブラリ Ver.4.0.0.1 で行った。

MALDI バイオタイパーでは 16S rRNA 遺伝子と菌株が不一致および Score value が 1.7 未満の場合に、

追加で 70% ギ酸抽出法とエタノール・ギ酸抽出法を実施し再測定した。70% ギ酸抽出法はコロニーをターゲットプレートに塗布し、70% ギ酸 (和光純薬工業) を 1 μl 滴下し乾燥させ、HCCA マトリックス試薬を 1 μl 滴下し乾燥後に測定した。

エタノール・ギ酸抽出法は、マイクロチューブ内で蒸留水 300 μl と 1 白金耳量のコロニーを釣菌・懸濁し、エタノールを 900 μl 加えて攪拌後、13000 rpm 2 分間遠心し、上清を除去した。ペレットに 70% ギ酸を 20 μl 加え攪拌後、アセトニトリル (和光純薬工業) を 20 μl 加え攪拌した後、13000 rpm 2 分間遠心した。上清 1 μl をターゲットプレートに乗せ乾燥した後に HCCA マトリックス試薬を 1 μl 滴下し乾燥後に測定した。

3) 評価方法

バイテック MS は信頼性レベルが良好 (同定確率 60~99.9%) の場合を信頼性があると評価した。MALDI バイオタイパーは同定の信頼性の指標である Score value が 2.0 以上を菌種レベルの一致、1.7 以上 2.0 未満を属レベルの一致、1.7 未満を同定不能と評価し、最上位に表記された菌種を同定菌とした。

3. バイテック 2 の測定

バイテック 2 の同定はグラム陽性菌用の GP 同定カードを用いた。バイテック 2 の測定結果が 16S rRNA 遺伝子と不一致の場合は、下記の用手法による生化学的性状も総合して、複数菌種が表示された場合はバイテック 2 が示した追加試験を実施後、再同定した。

4. NVS のグラム染色所見と用手法における重要な生化学的性状

グラム染色はパーミー法 (武藤化学) を実施した。生化学的性状試験は、カタラーゼ試験、L-pyrrolidonyl arylamidase はリドザイム PYR テスト (LSI メディエンス: PYR)、馬尿酸加水分解試験はリドザイム HIP-M テスト (LSI メディエンス: 馬尿酸) を行った。α-Galactosidase (α-GAL)、leucin aminopeptidase (LAP) は DIATABS (ROSCO) を使用した。また、ブレインハートインフュージョンブイヨン「ニッスイ」(日水製薬) に NaCl を加えて 6.5% に調製した 6.5% NaCl 加 Brain Heart Infusion Broth (6.5% NaCl) とポアメディア胆汁エスクリン培地 (栄研化学: BE 培地) で発育能を確認した。アルギニン加水分解試験 (以下、arginine dihydrolase: ADH) はメラーの培地に pyridoxal hydrochloride 10 mg/l および L-cysteine を 100 mg/l の割合で添加したものを 24 時間毎に最終 96 時間で判定した。また、迅速に ADH の結果を得るた

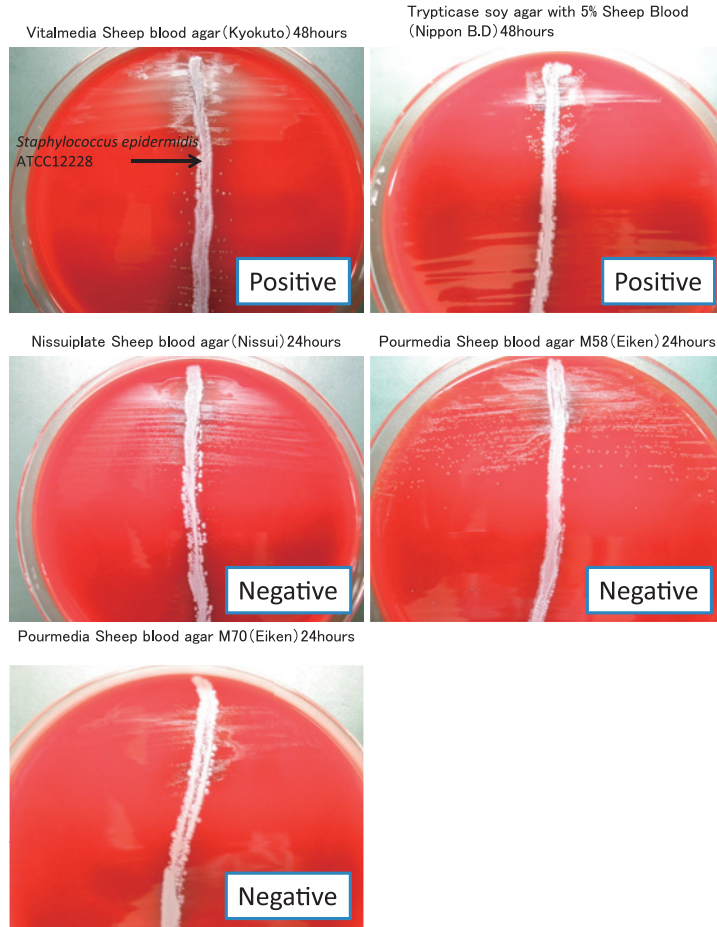


Fig. 1. Result of satellitism test

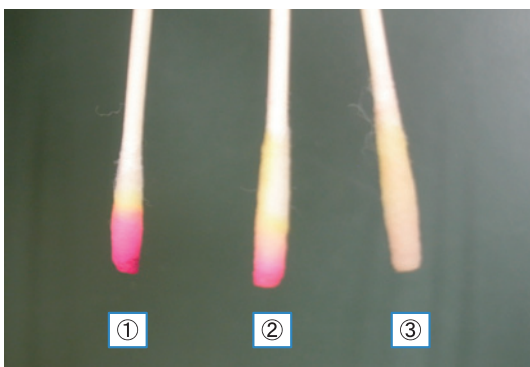


Fig. 2-1. Result of RID zyme PYR

- ① *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, Positive control
- ② *Granulicatella adiacens* (Kindai NVS-1), Positive (weak reaction)
- ③ *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, Negative control

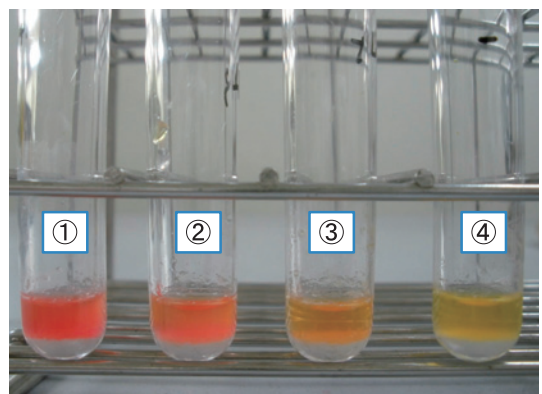


Fig. 2-2. Result of DIATABS LAP

- ① *E. faecalis* ATCC 51299, Positive control; ② *G. adiacens* (Kindai NVS-19), Positive; ③ *G. adiacens* (Kindai NVS-15), Positive (weak reaction); ④ *Aerococcus viridans*, Negative control

Table 1. Identification 26 NVS isolates by direct colony method by two MALDI-TOF MS compared to 16S rRNA

16S rRNA	n	VITEK MS				MALDI Biolyser			
		No. (%) correctly identified		No. (%) correctly identified		No. (%) correctly identified		No. (%) not reliably identified (Score value < 1.700)	
		CV ^a range	CV ^a mean	Matching at the genus	Matching at the species	Score value ≥ 2.000	Score value > 1.700-1.999	Matching at the genus	Matching at the species
<i>Abiotrophia defectiva</i>	2	99.9	99.9	2 (100)	2 (100)	1 (50)	1 (50)	1 (50)	1 (50)
<i>Granulicatella adiacens</i>	20	99.9	99.9	20 (100)	20 (100)	19 (95)	20 (100)	20 (100)	20 (100)
<i>Granulicatella elegans</i>	4	99.9	99.9	4 (100)	4 (100)	4 (100)	1 (25)	1 (25)	1 (25)
Total	26	99.9	99.9	26 (100)	26 (100)	20 (76.9)	22 (84.6)	22 (84.6)	2 (7.7)

^a Confidence value

めに上記のメラーのアルギニン培地を 250 μ l 滅菌スピッツに分注し, McFarland No. 4 以上になるように菌液を作成後に流動パラフィンを 250 μ l 重層し, 36°C で 4 時間と 24 時間で判定した。

NVS の反応性を確認するために, リドザイム PYR テストと DIATABS LAP は *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 を陽性対照に, また陰性対象はそれぞれ 16S rRNA 遺伝子で既同定の *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* と *Aerococcus viridans* を用いた。また, PYR, LAP, α -GAL, ADH, 6.5% NaCl については用手法とバイテック 2 との反応性の比較を行った。

Satellitism test に使用した羊血液寒天培地 (sheep blood agar : SBA) は, バイタルメディア羊血液寒天培地 (極東製薬工業 : 極東-SBA), トリプチケースソイ 5% ヒツジ血液寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン : 日本 BD-SBA), ニススイプレート羊血液寒天培地 (水製薬 : 水-SBA), ポアメディア羊血液寒天培地 M58, M70 (栄研化学 : 栄研 M58-SBA, 栄研 M70-SBA) の計 4 社 5 種を用いた。各 SBA の上部に NVS を少量接種し, 上から下へ画線し, 菌塗布量に濃度勾配ができるようにした。続いて画線した方向と垂直に *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 を培地に 1 本画線し, 5% 炭酸ガス培養で 24 時間, 最終 48 時間で判定した。Satellitism test の判定は画線した *S. epidermidis* ATCC 12228 の周囲にのみ発育している場合に陽性と判定し, *S. epidermidis* ATCC 12228 から離れた遠位に独立して発育が見られた場合は陰性とした (Fig. 1)。

結 果

1. MALDI-TOF MS 2 機種間の 16S rRNA 遺伝子との一致率 (Table 1, 2)

16S rRNA 遺伝子との一致率は, バイテック MS では菌種レベルで同定確率 99.9% の高確率で 100% 一致した。一方, MALDI バイオタイパーは菌種レベル, 属レベルともに 84.6% 一致した。菌種レベルで一致した株のうち, 76.9% が Score value 2.0 以上であった。また, MALDI バイオタイパーで不一致の 2 株と Score value が 1.7 未満の 2 株の計 4 株 (*G. elegans* 3 株, *A. defectiva* 1 株) について 70% ギ酸抽出法とエタノール・ギ酸抽出法を行い再測定した。その結果, 70% ギ酸抽出法では 3 株, エタノール・ギ酸抽出法では 4 株すべてが菌種レベルで一致した。

Table 2. Re-examined isolates of misidentified and score value <1.700 results by MALDI Biotyper after each extraction methods

Strain No.	16S rRNA	Direct colony method (Score value)	70% formic acid extraction (Score value)	Ethanol-formic acid extraction (Score value)
21	<i>A. defectiva</i>	<i>G. adiacens</i> (2.231)	<i>A. defectiva</i> (2.319)	<i>A. defectiva</i> (2.229)
13	<i>G. elegans</i>	not reliably identification (1.648)	<i>G. elegans</i> (1.874)	<i>G. elegans</i> (1.865)
17	<i>G. elegans</i>	not reliably identification (1.442)	not reliably identification (1.567)	<i>G. elegans</i> (2.049)
Type strain	<i>G. elegans</i>	<i>A. defectiva</i> (1.982)	<i>G. elegans</i> (1.799)	<i>G. elegans</i> (2.084)

2. バイテック 2 と 16S rRNA 遺伝子との一致率 (Table 3)

バイテック 2 では菌種レベルは 65.4%、属レベルは 80.8% 一致した。不一致 4 株、複数菌種候補名が挙げられた 6 株 (23.1%) の合計 9 株 (1 株重複) については、用手法の生化学的性状試験を併せて再同定を行った。その結果、7 株が菌種レベルで一致し、全体で 16S rRNA 遺伝子と 92.3% 一致した。また、複数菌種候補名が挙げられた 6 株のうち、4 株は *Gemella morbillorum*、*Micrococcus* 属、*Kocuria rosea* と鑑別が必要であり、satellitism test, PYR, 耐気性試験, コロニー性状, カタラーゼ試験で鑑別可能であった。また 3 株は *G. adiacens* と *G. elegans* の鑑別が必要であり、そのうち 2 株は ADH で鑑別可能であった。NVS の同定に重要なバイテック 2 の生化学的性状の結果を (Table 4) に示す。

3. NVS 同定に重要な用手法による生化学的性状試験 (Table 4)

NVS 26 株はすべて、グラム染色所見はグラム不定・多形性を示し、カタラーゼ試験は陰性、6.5% NaCl と BE 培地の発育は陰性、PYR, LAP は陽性であった。ADH はメラー法、迅速メラー法 (4 時間判定) とともに *G. elegans* 4 株は陽性、他の 2 菌種はすべて陰性であった。 α -GAL は *A. defectiva* 2 株は陽性、その他の 2 菌種はすべて陰性であった。

NVS の反応性の検証は、陽性対象と比較してリドザイム PYR テストは 100% 弱陽性、LAP は 34.6% が弱陽性を示した (Fig. 2)。

用手法とバイテック 2 の反応性の比較では、ADH, 6.5% NaCl はすべて一致した。一方、PYR, LAP, *A. defectiva* の α -GAL の陽性率は用手法で 100% に対して、バイテック 2 ではそれぞれ 42.3%, 73.1%, 50% と乖離し、バイテック 2 の陽性率が低かった。

Satellitism test は極東-SBA と日本 BD-SBA は全株陽性を確認できた。その他メーカーでは陽性率に差はあるが陽性を確認できなかった (Table 5)。

考 察

NVS は口腔内や腸管等の常在菌であるが、感染性心内膜炎の起炎菌として重要な菌であり、その予後は *Enterococcus* 属や *viridans streptococci* よりも重篤で再発率や死亡率が高い³⁾⁻⁵⁾。その理由として、PCG に tolerance 株や耐性株⁶⁾⁻⁸⁾、 β -ラクタム系薬やマクロライド系薬に高度耐性株⁹⁾⁻¹⁰⁾の存在だけでなく、NVS の分離、同定および薬剤感受性試験の検査全般の遅延により抗菌薬の治療開始が遅れると言われている³⁾。そのため、NVS は迅速かつ正確に同定する必要がある菌種である。しかし、検査室では NVS の迅速かつ正確な同定は容易ではないこと³⁾や生化学的性状による同定では正確性が不十分である¹¹⁾と考えられてきた。さらに、国内においても NVS の生化学的性状試験として重要な satellitism test の手法や適切な培地、薬剤感受性試験で追加が必要な 0.001% pyridoxal hydrochloride は検査室に常備されていないことなど、NVS の同定・薬剤感受性試験に関する様々な問題点は、1982 年に藤田ら¹²⁾が初めて報告して以来何ら解決していない。

今回、16S rRNA 遺伝子との菌種レベルの一致率は、バイテック MS 100%, MALDI バイオタイパー 84.6%, バイテック 2 65.4% であり、MALDI-TOF MS の方が正確に同定可能であった。これは Ratcliffe ら¹⁾の報告 (バイテック MS 100%, MALDI バイオタイパー 78.5%, バイテック 2 64.2%) と同等な結果であった。MALDI バイオタイパーでは不一致株と Score value が 1.7 未満の 4 株について 70% ギ酸抽出法およびエタノール・ギ酸抽出法を行うことで 16S rRNA 遺伝子との一致率が向上した。また、MALDI バイオタイパーで誤同定された株は NVS における菌種間の誤同定であった (Table 2)。そのため、従来法で問題となっていた *viridans streptococci*、生物活性が低い¹¹⁾ため誤同定されやすい *Gemella* 属¹¹⁾¹³⁾¹⁴⁾や、嫌気性菌用培地の発育の方が良好なことや同定キットの選択ミスによる嫌気性菌¹³⁾との誤同定は無かった。これは従

Table 3. Comparative study of 16S rRNA with VITEK 2

16S rRNA	n	No. (%) correctly identified		No. (%) misidentified and plural bacteria candidates identified		Results by VITEK 2	* Matching with additional tests
		Matching at the genus	Matching at the species	Misidentified	Plural bacteria candidates		
<i>A. defectiva</i>	2	1 (50)	1 (50)	1 (50)	1 (50)	<i>A. defectiva</i> <i>G. adiacens</i> / <i>G. elegans</i>	○ ^{a e}
<i>G. adiacens</i>	20	16 (80)	13 (65)	2 (10)	1 (5)	<i>G. adiacens</i> <i>G. elegans</i> <i>G. adiacens</i> / <i>G. elegans</i> <i>G. adiacens</i> / <i>Micrococcus lylae</i> / <i>Micrococcus luteus</i> <i>G. adiacens</i> / <i>G. elegans</i> / <i>Kocuria rosea</i> <i>Gemella morbillorum</i> / <i>G. adiacens</i>	x ^e ○ ^a ○ ^b ○ ^c ○ ^d
<i>G. elegans</i>	4	4 (100)	3 (75)	1 (25)		<i>G. elegans</i> <i>G. adiacens</i>	○ ^e
Total	26	21 (80.8)	17 (65.4)	4 (15.4)	6 (23.1)		24 (92.3)

*. 7 of 9 strains were correctly identified by additional tests.

^a, ADH

^b, catalase, colony pigment

^c, catalase, colony pigment, ADH

^d, satellitism test, PYR, aerotolerance test

^{a~d}, These tests were indicated by VITEK 2.

^e, manual method tested in this study

Table 4. Number of strain indicating the positive or negative reaction of VITEK 2 and additional manual tests

16S rRNA Reac- tion	VITEK 2 GP card												Additional manual tests								
	PYR	ALP	LAP	α-GAL	β-GAL	β-GUR		ADH		6.5% NaCl	Su- crose	Tre- halose	Pul- lulan	RID zyme		Rapid MoellerADH	BE	6.5% NaCl ^a	DIATABS		
						Well No.27	Well No.24	Well No.8	Well No.63					Hippu- rate	PYR						
<i>G. adiacens</i> (n=20)	9	0	15	0	0	4	5	0	0	0	9	0	0	20	0	0	0	0	0	20	
<i>G. elegans</i> (n=4)	1	0	2	0	0	1	1	4	4	0	2	0	0	4	1	4	4	0	0	0	4
<i>A. defectiva</i> (n=2)	1	0	2	1	1	0	0	0	0	0	2	1	1	2	0	0	0	0	0	0	2
+	1	2	0	1	1	2	2	2	2	2	0	1	1	0	2	2	2	2	2	0	0

+, positive - , negative

PYR: L-pyrrolidonyl arylamidase, ALP: Alkaline phosphatase, LAP: Leucin aminopeptidase, α-GAL: α-Galactosidase, β-GAL: β-Galactosidase, β-GUR: β-Glucuronidase
 ADH: Arginine dihydrolase, BE: Bile esculin agar

^a, Brain heart infusion broth w/6.5% NaCl

来法が生化学的性状による同定に対し、MALDI-TOF MS はタンパク質の解析による同定であり両者で測定原理が異なるためと考える。バイテック MS より MALDI バイオタイパーの一致率が低かった理由は、現時点でのデータベースの数やデータベースの構築条件の違いが考えられる¹⁵⁾。MALDI バイオタイパーは 70% 胃酸処理後の *A. defectiva* 3 株, *G. adiacens* 6 株, *G. elegans* 1 株, *G. balaenopterae* 1 株でデータベースを作成している。一方、バイテック MS は複数条件下で得られた *A. defectiva* 12 スペクトル, *G. adiacens* 17 スペクトル, *G. elegans* 12 スペクトル (株数は非公開) がデータベースに登録されている。

従来法のバイテック 2 は菌種レベルの一致が 65.4% と Ratcliffe ら¹⁾の報告と同様に MALDI-TOF MS と比較して十分でない結果であった。バイテック 2 では菌種の不一致および複数菌名が候補表示された株について用手法による生化学的性状試験を併せて同定すると、全体で 16S rRNA 遺伝子と 92.3% 一致し直接法による MALDI バイオタイパー以上の同定精度であった。

用手法とバイテック 2 の反応性の比較では ADH, 6.5% NaCl はすべて一致した。一方, PYR と LAP, *A. defectiva* の α-GAL の陽性率は用手法とバイテック 2 で乖離し, バイテック 2 で低率であった。これは用手法とバイテック 2 の測定原理や基質の差と考えられる。Christensen ら³⁾は NVS 101 株において PYR と LAP の用手法 (単一基質試験) の結果は全て弱陽性と報告しており, われわれの検討でもリドザイム PYR は 100%, DIATABS LAP は 34.6% で弱陽性を示した (Fig. 2)。以上から, バイテック 2 では PYR, LAP, α-GAL の反応性は NVS に適していなかった。なお, これはバイテック 2 のよし悪しを議論するのではなく, 今回検討した NVS 26 株に対するバイテック 2 の反応性を見直すとともに用手法による追加試験を評価するための検討である。

バイテック 2 で複数菌名が候補表示された際には追加試験が表示されるが, この追加試験の中には GP 同定カード内に含まれる生化学的性状試験項目 (例 ADH, PYR) も含まれる場合がある。理由は, バイテック 2 のカード内において得られた反応結果と, 用手法にて試験管培地や寒天培地上のコロニーを用いて試験を実施した場合の反応結果が異なる場合があるためである。このため, 複数菌種を鑑別する追加試験は, 用手法による確認を実施することをシスメックス・バイオメリュー社は推奨している。今回の PYR, LAP, α-GAL のバイテック 2 の反応性からも, 生化学的性

状の確認は可能な限り用手法で行うことが望ましいと考える。以上から swab, disk, tablet などの単一基質試験を実施することも重要と考える。しかし、バイテック 2 の ADH の結果は用手法との一致率がよいため、用手法が実施できない場合には参照することも有用と考える。

バイテック 2 の GP 同定カードは 3 ml の 0.45~0.5% 滅菌食塩水に McFarland No. 0.5~0.63 濃度の菌液調製が必要であり、最長 8 時間を要する。NVS は他の連鎖球菌に比べて発育が遅くコロニー形成に時間がかかるため同定に時間を要する。また、複数菌名が同時に候補として表示された際の生化学的性状試験の判定に最長 4 日を要するため報告が遅れる。以上を考慮すると、数分で測定可能な MALDI-TOF MS はバイテック 2 よりも少ない菌量で迅速かつ正確に NVS の同定が可能であり有用であった。

以前より NVS の同定や他菌種との鑑別に satellitism test が重要であると言われてきた³¹¹⁾¹³⁾¹⁶⁾。Satellitism test の問題点として、①手法や使用する適切な培地が確立されていないこと、②NVS 以外の菌種による pseudosatelliting の存在の大きく 2 点がある。

①の培地の選択を誤ること⁶⁾や、過度な菌量の接種³⁾は *Staphylococcus* 属に依存せずに NVS が発育するため satellitism test 陰性となり、viridans streptococci や *Gemella* 属¹¹⁾と誤同定される可能性がある。NVS の satellitism test の方法は Clinical Microbiology Procedures Handbook¹⁷⁾に記載があるものの、使用する SBA の指定や注意点に関する記載はない。本来 satellitism test に用いる SBA は NVS が単独で発育しないことが必要である。国内では、1995 年に江成ら¹⁸⁾が国内 5 社 10 種の SBA の NVS 発育指示能を検討し、satellitism test に不適な培地が存在することを報告している。今回われわれは国内 4 社 5 種の SBA を用いて satellitism test を実施可能な培地の再検証かつ実施方法を明確にするため検討した。今回 *S. epidermidis*

ATCC 12228 を使用したが、臨床分離株の *S. epidermidis*¹⁶⁾¹⁹⁾や *Staphylococcus aureus*¹⁶⁾でも使用可能である。Satellitism test に使用する培地の検討では、極東-SBA と日本 BD-SBA で全株陽性を確認できた。極東-SBA は、NVS が発育しないことを前提に開発されている。一方、日本 BD-SBA は、NVS が発育した報告²⁰⁾や、以前われわれが今回と同一株を用いて行った検討（データ未発表）では 2 株が陰性を示したため、使用する培地のロットにより satellitism test の結果に影響があると考えられた。また、栄研、日水の SBA では satellitism test 陰性を示す株が多く存在し、NVS ではないと誤同定される可能性がある。これらの結果は三澤²⁰⁾の各社 SBA における NVS 発育能の差と一致している。以上から、satellitism test は極東-SBA が適していると考えられた。

②の NVS 以外の satellitizing GPC は *Gemella sanguinis*²¹⁾²²⁾、*Ignavigranum ruoffiae*²³⁾、*Helcococcus* spp.^{24)~27)}で報告があり、培地上の発育能、生化学的性状から NVS を疑い satellitism が行われており、NVS との鑑別が必要であった。これらの菌種は *Staphylococcus* 属による一時的な増殖促進による pseudosatelliting であり、NVS による *Staphylococcus* 属に依存した発育による satellitism とは異なる現象と考えられている。Pseudosatelliting は 24 時間で satellitism 陽性を示すが、48 時間では培地全面に発育する。そのため pseudosatelliting と satellitism の鑑別は適切な培地で 48 時間まで確認を行うことで可能と考える。*G. sanguinis*、*I. ruoffiae*、*Helcococcus* spp. と NVS を鑑別するために必要な項目を (Table 6) に示した。

Satellitism test 以外の NVS と類縁属菌の鑑別は、グラム染色所見、PYR、LAP、alkaline phosphatase (ALP)、BE 培地、6.5% NaCl が重要である。また、NVS の菌種の鑑別は α -GAL、 β -galactosidase (β -GAL)、 β -glucuronidase (β -GUR)、ADH、馬尿酸、trehalose、pullulan が重要である³¹¹⁾。 α -GAL、 β -GAL、

Table 5. Comparison of satellitism test using sheep blood agar of different manufacturers

Sheep blood agar (Manufacturer)	Basal medium*	% Positive (Satellitizing/Total)	
		24 hours	48 hours
VitalMedia sheep blood agar (Kyokuto)	TSA	100 (26/26)	100 (26/26)
Trypticase soy agar w/5% sheep blood (Nippon Becton)	TSA	100 (26/26)	100 (26/26)
Nissui plate sheep blood agar (Nissui)	TSA	3.8 (1/26)	0 (0/26)
Pourmedia sheep blood agar M58 (Eiken)	HIA	0 (0/26)	0 (0/26)
Pourmedia sheep blood agar M70 (Eiken)	HIA	80.8 (21/26)	65.4 (17/26)

*. TSA: Trypticase soy agar (Soybean-casein digest agar), HIA: Heart infusion agar

Table 6. Differentiation of satelliting Gram-positive cocci

Organism	Cellular morphology	PYR	LAP	ALP	6.5% NaCl	Satelliting (Pseudosatelliting)	References
<i>A. defectiva</i>							
<i>G. adiacens</i>	Pleomorphic	+	+	-	-	+	
<i>G. elegans</i>							
<i>Gemella sanguinis</i>	Cocci, Occur singly, in pairs, or in short chains	+	+	+	-	+	21
						.	22
<i>Ignavigranum ruoffiae</i>	Ovoid shape, Form single cells, pairs or groups	+	+	-	+	V	23
<i>Helcococcus kunzii</i>	Cocci	+	-	-	V	.	24
						+	25
<i>Helcococcus sueciensis</i>	Cocci, Occur singly, in pairs or in short chains	+	+	+	.		
" <i>Helcococcus seattlensis</i> " ^a	Cocci, Occur singly or in clusters with variable cell sizes	-	-	.	.	+	26, 27

P: Positive, N: Negative, V: Variable

PYR: L-pyrrolidonyl arylamidase, LAP: leucine arylamidase, ALP: alkaline phosphatase, 6.5% NaCl: brain heart infusion broth with 6.5% NaCl

^a, "*Helcococcus seattlensis*" has not been described in DSMZ_bactnames (updated December 2015).

trehalose, pullulan が陽性であれば *A. defectiva*, β-GUR が陽性であれば *G. adiacens*, 馬尿酸や ADH が陽性であれば *G. elegans* が推定可能となる。

NVS のグラム染色所見は特徴的であり、栄養状態により形態が変わる³⁾²⁸⁾。今回の検討条件では全株グラム不定・多形性を示した。栄養状態が十分な場合は連鎖球菌様の形態を示し、不十分な場合はグラム不定・多形性を示すと考えられている³⁾²⁸⁾。また、異なる培地・培養条件、継代により形態が変化した報告¹⁴⁾²⁹⁾や、血液培養ボトルではグラム陽性連鎖球菌であったが、コロニーではグラム不定・多形性と異なった報告⁶⁾¹⁶⁾もあるため、様々な条件下で形態が変化することを知っておく必要がある。

今回の結果から、MALDI-TOF MS による同定は 16S rRNA 遺伝子と菌種レベルの良好な一致率であったため、数日要する生化学的性状の確認は省略可能と考えるが、MALDI-TOF MS で NVS が同定された場合にも同定結果の妥当性の評価は必要である。すなわち、チョコレート寒天培地や嫌気性菌用寒天培地と比較した SBA 上の発育能（非発育あるいは遅発育）、コロニーのグラム染色所見（グラム不定・多形性）や、カタラーゼ試験が陰性、用手法の PYR 陽性（viridans streptococci は陰性）の結果が NVS の特徴を押えており、短時間かつ少量のコロニーで実施可能なため参考となるであろう。しかし、現状は MALDI-TOF MS や遺伝子検査の設備が整っていない施設が大多数であ

り、NVS の同定精度が十分とは言えないバイテック 2 などで同定が必要である。その場合は、上述の MALDI-TOF MS で同定時に確認すべき性状に加えて、使用する SBA や pseudosatelliting に注意した satellitism test の確認が *Gemella* 属など他菌種との鑑別に重要である。また NVS の菌種同定は、用手法の ADH 陽性が *G. elegans* を *G. adiacens* や *A. defectiva* からの鑑別に、α-GAL 陽性は *A. defectiva* を *G. elegans* や *G. adiacens* から鑑別する上で重要である。

以上より、MALDI-TOF MS は発育の遅い NVS を少量の菌量でバイテック 2 よりも迅速かつ正確に同定可能であった。NVS による感染性心内膜炎は重篤で再発率や死亡率が高く^{3)~5)}、多剤耐性株⁶⁾も存在する。そのため MALDI-TOF MS による迅速かつ正確な同定は、CLSI M45-A2 に基づいた薬剤感受性試験の実施や適切な抗菌薬治療に繋がり臨床に貢献できると考える。

利益相反：なし

文 献

- 1) Ratcliffe, P., H. Fang, E. Thidholm, et al. 2013. Comparison of MALDI-TOF MS and VITEK 2 system for laboratory diagnosis of *Granulicatella* and *Abiotrophia* species causing invasive infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 77: 216-219.

- 2) Neville, S.A., A. Lecordier, H. Ziochos, et al. 2011. Utility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial identification. *J. Clin. Microbiol.* 49: 2980-2984.
- 3) Christensen, J.J., R.R. Facklam. 2001. *Granulicatella* and *Abiotrophia* Species from human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3520-3523.
- 4) Ruoff, K.L. 1991. Nutritionally variant streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 4: 184-190.
- 5) Giuliano, S., R. Caccese, P. Carfagna, et al. 2012. Endocarditis caused by nutritionally variant streptococci: a case report and literature review. *Le Infezioni in Medicina* 20 (2): 67-74.
- 6) 古垣内美智子, 江成 博, 吉田 敦, 他. 2014. PenicillinG に高度耐性かつ多剤耐性を示した *Granulicatella adiacens* が分離された複数菌敗血症性ショックの一例. *日臨微誌* 24: 138-145.
- 7) Holloway, Y., J. Dankert. 1982. Penicillin tolerance in nutritionally variant streptococci. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 22: 1073-1075.
- 8) 菊池 賢, 戸塚恭一, 清水喜八郎, 他. 1994. Nutritionally variant streptococci による感染性心内膜炎の細菌学のおよび臨床検討. *感染症学雑誌* 68: 830-836.
- 9) Liao, C., L. Teng, P. Hsueh, et al. 2004. Nutritionally variant streptococcal infections at a University Hospital in Taiwan: disease emergence and high prevalence of β -lactam and macrolide resistance. *Clin. Infect. Dis.* 38: 452-455.
- 10) Zheng, X., A.F. Freeman, J. Villafranca, et al. 2004. Antimicrobial susceptibilities of invasive pediatric *Abiotrophia* and *Granulicatella* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4323-4326.
- 11) Ruoff, K.L. 2011. *Aerococcus*, *Abiotrophia*, and other aerobic catalase-negative, gram-positive cocci. p. 365-376. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 10th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- 12) 藤田信一, 松原藤雄, 野田八嗣. 1982. Nutritionally Variant Streptococci による感染性心内膜炎の1例. *感染症学雑誌* 56: 705-709.
- 13) 江成 博. 2015. 栄養要求性レンサ球菌の検出と同定に関する問題点. *日臨微誌* 25: 10-18.
- 14) 野々宮百合子, 三浦明子, 山田友紀, 他. 2006. 血液培養から *Granulicatella elegans* が分離された感染性心内膜炎の一例. *日臨微誌* 16: 89-95.
- 15) 大楠清文. 2012. 質量分析技術を利用した細菌の新しい同定法. *モダンメディア* 58: 113-122.
- 16) 大楠清文. 2012. 最近話題の細菌トップ12—珍しい細菌とめぐり逢うコツとノウハウを伝授します—⑩ NVS (nutritionally variant streptococci). *Medical Technology* 40: 397-404.
- 17) Garcia, L.S. 2010. Satellite Test. p. 3.17.44.1-3.17.44.3. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 3rd Edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C..
- 18) 江成 博, 島田園子. 1995. 検査材料から *Streptococcus adjacens* を分離するための培地についての検討. *日臨微誌* 5: 30-36.
- 19) Bouvet, A., F. GRIMONT, PA. GRIMONT. 1989. *Streptococcus defectivus* sp. nov. and *Streptococcus adjacens* sp. nov. Nutritionally Variant Streptococci from Human Clinical Specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 290-294.
- 20) 三澤慶樹. 2013. 栄養要求性レンサ球菌 (nutritionally variant streptococci : NVS) と心内膜炎. *臨床と微生物* 40: 486-489.
- 21) Leung, D.T., E.M. Davis, Q. Qian, et al. 2011. First report of prosthetic joint infection by *Gemella sanguinis* and associated pseudosatelliting phenomenon on culture. *J. Clin. Microbiol.* 49: 3395-3397.
- 22) Collins, M.D., R.A. Hutson, E. Falsen, et al. 1998. Description of *Gemella sanguinis* sp. nov., Isolated from Human Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3090-3093.
- 23) Collins, M.D., P.A. Lawson, R. Monasterio, et al. 1999. *Ignavigranum ruoffiae* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 97-101.
- 24) Collins, M.D., R.R. Facklam, U.M. Rodrigues, et al. 1993. Phylogenetic analysis of some *Aerococcus*-like organisms from clinical sources: description of *Helcococcus kunzii* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 425-429.
- 25) Sridhar, S., JF. Chan, K. Yuen. 2014. First Report of Brain Abscess Caused by a Satelliting Phenotypic Variant of *Helcococcus kunzii*. *J. Clin. Microbiol.* 52: 370-373.
- 26) Collins, M.D., E. Falsen, K. Brownlee, et al. 2004. *Helcococcus sueciensis* sp. nov., isolated from a human wound. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1557-1560.
- 27) Chow, S., J.E. Clarridge III. 2014. Identification and Clinical Significance of *Helcococcus* species, with Description of *Helcococcus seattlensis* sp. nov. from a Patient with Urosepsis. *J. Clin. Microbiol.* 52: 854-858.
- 28) Roggenkamp, A., M. Abele-horn, K. Trebesius, et al. 1998. *Abiotrophia elegans* sp. nov., a possible patho-

gen in patients with culture-negative endocarditis. J. Clin. Microbiol. 36: 100-104.
29) 竹内弘明, 村上康弘, 中村正夫. 1996. *Streptococcus*

adjacens による感染性心内膜炎の 1 例. 日臨微誌 6: 46-50.

Comparative study of identification methods for NVS by two different MALDI-TOF MS based devices, VITEK 2 and conventional biochemical test

Michiko Furugaito¹⁾, Hiroshi Enari³⁾, Atsushi Yoshida^{4) 6)}, Katsuko Okuzumi⁵⁾, Yoshiaki Kawamura⁷⁾,
Kaori Eguchi¹⁾, Hirofumi Toda¹⁾, Koji Utsunomiya¹⁾, Hiromi Matsuura¹⁾,
Toshihiro Yamaguchi¹⁾, Toshinori Kamisako²⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Kindai University Hospital

²⁾Department of Clinical Laboratory Medicine, Kindai University School of Medicine

³⁾Division of Anaerobe Research, Life Science Research Center, Gifu University

⁴⁾Department of Clinical Laboratory Medicine, Dokkyo Medical University Hospital

⁵⁾Division of Infection Control, Dokkyo Medical University Hospital

⁶⁾Department of Infectious Diseases, Tokyo Women's Medical University

⁷⁾Department of Microbiology, Aichigakuin University, School of Pharmacy

Nutritionally variant streptococci (NVS) have been known to be significant causative agents of endocarditis. These organisms have caused major diagnostic difficulties due to fastidious culturing. In this study, we evaluated the performance of 2 matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems, VITEK MS (sysmex biomerieux) and MALDI Biotyper (Bruker), and the automatic phenotypic test system VITEK 2 (sysmex biomerieux). Sequence of the 16S rRNA gene was used as the reference method. In addition, we evaluated conventional biochemical tests. Twenty six NVS strains consist of 3 type strains and 3 clinical isolates and 20 isolates from oral cavity of healthy adults were analyzed. As a result, the VITEK MS accurately identified 100% strains, and the Biotyper identified 84.6% strains, but the VITEK 2 could only identify 65.4% strains, compared with 16S rRNA gene sequencing at the species level. When NVS were identified by the MALDI-TOF MS, we should confirm growth ability of these organisms on the sheep blood agar (non-growth, or slowly growth) compared with chocolate agar or anaerobic blood agar or medium for anaerobic bacteria, and gram strain of the colonies (gram-variable, pleomorphic), and catalase test (negative), PYR test (positive) which can perform quickly. But, in the microbiology laboratories where MALDI-TOF MS is not introduced, it is necessary to examine arginine dihydrolase, α -galactosidase, satellitism test et al. in addition to phenotypic tests described above. In conclusion, the MALDI-TOF MS could identify NVS more rapid and accurate than the VITEK 2 system. The rapid and accurate identification of NVS may contribute to various NVS infections.