

[原 著]

MALDI-TOF MS により *Haemophilus haemolyticus* と同定された臨床分離株の
生化学的性状に関する検討

藏前 仁¹⁾・松井奈津子¹⁾・犬飼ともみ¹⁾・中村友紀¹⁾・川口公平²⁾・中村清忠¹⁾

¹⁾ 刈谷豊田総合病院臨床検査・病理技術科

²⁾ 栄研化学株式会社生物化学第一研究所

(平成 29 年 4 月 17 日受付, 平成 29 年 10 月 20 日受理)

当院において 2016 年 4 月から 8 月の期間に臨床検体より分離された *Haemophilus* 属菌のうち, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) により *Haemophilus haemolyticus* と同定された 75 株を対象として, 生化学鑑別性状の多様性について検討した。その結果, X, V 両因子を要求し, ウマ血液寒天培地上で溶血性を示す典型的な性状を示した株は 6 株 (8.0%) に過ぎず, X, V 両因子要求性で非溶血株は 26 株 (34.7%) であった。さらに V 因子要求性が 43 株 (57.3%) 分離され *H. haemolyticus* が多様な性状を示した。*Haemophilus* 属菌の同定においては *H. influenzae* との鑑別がとくに重要であるが, 日常検査において X, V 両因子要求性で非溶血型の *H. haemolyticus* と *H. influenzae* との鑑別は困難である。しかしながら本検討にて実施した, スクロースとマンノースの糖分解性試験の結果, V 因子要求性の *H. haemolyticus* の全ての株がスクロースを分解し, X, V 両因子要求性株の 62.5% がマンノースを分解することが明らかとなり, *H. influenzae* との鑑別性状としてある程度有用であった。日常検査にて実施可能な鑑別方法として, 糖分解性試験は *H. influenzae* の同定精度を向上させることが明らかとなった。

Key words: *Haemophilus haemolyticus*, MALDI-TOF MS, 同定, 生化学鑑別性状

序 文

Haemophilus haemolyticus は, まれに侵襲性感染症の起原菌となる^{1,2)}ことが報告されているが, ほとんど病原性を示さない常在菌と考えられている。典型的な *H. haemolyticus* は, X, V 両因子要求性であり, かつウサギ (またはウマ) 血液寒天培地で溶血性を示すことから, 他の *Haemophilus* 属菌と鑑別することができる。しかしながら, 近年, ウマ血液寒天培地上で溶血性を示さない *H. haemolyticus* の存在が報告^{3,4)}されており, この非溶血型の *H. haemolyticus* と *H. influenzae* との鑑別には, 遺伝学的な検討が必要とさ

れることから一般的な細菌検査室での実施は困難である^{5)~7)}。

当院における *Haemophilus* 属菌の同定検査は, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) に加え, X, V 因子要求性, ウマ血液寒天培地による溶血性状の確認によって行っている。その中で我々は, MALDI-TOF MS によって *H. haemolyticus* と同定された菌株のなかに, 溶血性を示さない菌株が高頻度に存在し, さらには X, V 因子要求性が典型的な *H. haemolyticus* と乖離する菌株が散見されることを見出した。そこで本研究では, MALDI-TOF MS により *H. haemolyticus* と同定された臨床分離菌株の生化学鑑別性状に関して検討し, その結果明らかとなった *H. haemolyticus* の多様な性状について報告する。

著者連絡先: (〒448-8505) 愛知県刈谷市住吉町 5-15
刈谷豊田総合病院臨床検査・病理技術科
藏前 仁
TEL: 0566-25-2951
FAX: 0566-25-8216
E-mail: hitoshi.kuramae@toyota-kai.or.jp

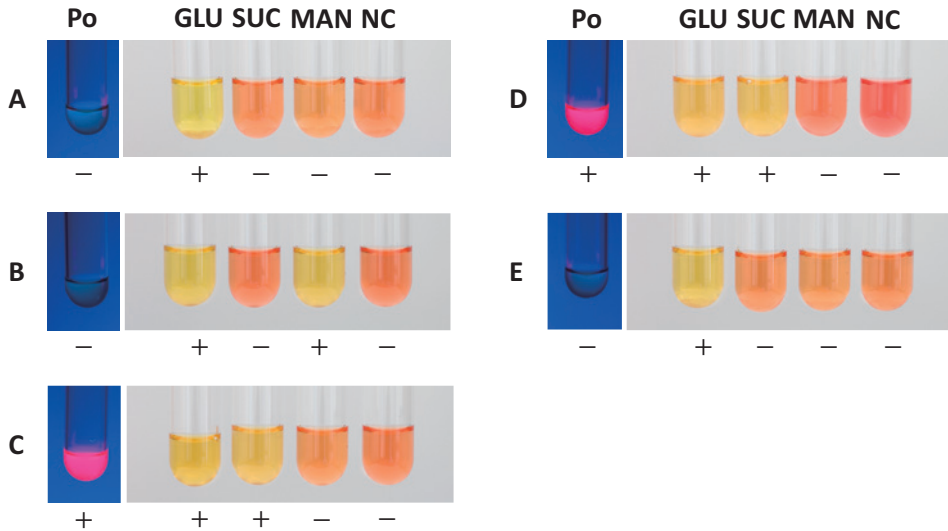


図1. ポルフィリンテスト, 糖分解性状試験

Po: ポルフィリンテスト, GLU: グルコース, SUC: スクロース, MAN: マンノース, NC: 陰性コントロール, A: *H. haemolyticus* (臨床分離株 #16, X, V 因子要求性, 非溶血株), B: *H. haemolyticus* (臨床分離株 #6, X, V 因子要求性, 溶血株), C: *H. haemolyticus* (臨床分離株 #12, V 因子要求性, 溶血株), D: *H. haemolyticus* (臨床分離株 #20, V 因子要求性, 非溶血株), E: *H. influenzae* (臨床分離株 #Hi1, X, V 因子要求性, 非溶血株)

対象と方法

1. 対象および分離方法

2016年4月から8月の期間において臨床検体より分離された *Haemophilus* 属菌のうち microflex LT/SH (Bruker Daltonik, GmbH), ソフトウェアは flex-Control 3.4, flexAnalysis 3.4, MALDI Biotyper RTC 3.1, MALDI Biotyper OC 3.1, ライブラリーは一般細菌 Ver.5.0.0.0 を使用して *H. haemolyticus* と同定された75株を対象とした。同定基準は Score Value 1.7以上とし, 75株のうち67株が2.0以上, 5株が1.9以上, 3株が1.8以上であった。分離培養には CA 羊血液寒天/VCM チョコレート EX II (日本製薬) を用いて5%炭酸ガス環境下で18~24時間培養して行った。同様にして MALDI-TOF MS にて *H. influenzae* と同定された10株を分離した。分離菌株はスキムミルクにて-80℃で凍結保存し, 以後の実験はチョコレート寒天培地(栄研化学)にてサブカルチャーして行った。

2. 16S rRNA 遺伝子の塩基配列による同定

分離した *H. haemolyticus* 75株を対象とし16S rRNA 遺伝子の塩基配列による同定を実施した。DNA抽出は TE Buffer 200 μL に1白金耳量の菌を懸濁し, 95℃にて5分間加温し, その遠心上清100 μL をテンプレート DNA として回収した。PCR は Bacterial 16S rDNA PCR kit (TaKaRa Bio Inc.) を用い, 添付

文書に準拠したプロトコールにて PCR を実施した。塩基配列の決定は Sequencing Primer F1 (bacterial) を使用して上流側を決定し, NCBI の BLAST にて相同性検索を行った。同定は塩基配列の90%以上一致かつ最上位の菌種を同定結果とする第十七改正日本薬局方の遺伝子解析による微生物の迅速同定法に準じて実施した。また, 相同性検索時に *H. haemolyticus* の Type strain である CIP 103290 株 (NR_104930.1) との相同性を確認した。

3. X 因子, V 因子要求性およびウマ血液に対する溶血性状の確認

X, V 因子の要求性およびウマ血液に対する溶血性状は, ヘモフィルス ID4 分画培地 (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いて確認した。接種はコロニーを直接釣菌して行い, 5%炭酸ガス環境下で18~24時間培養し, 判定を行った。ポルフィリンテストは, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.9) に δ-アミノレブリン酸 2 mM, 硫酸マグネシウム 0.8 mM を溶解したものを酵素基質として使用した。酵素基質溶液 0.5 mL に被検菌一白金耳量を接種し 37℃ で4時間反応させた後, UV ランプを照射し, 赤色の蛍光が見られたものを陽性とした (図1)。

4. 糖分解性状の検討

試験管培地によるグルコース, スクロース, マンノー

表1. 分離された *H. haemolyticus* の生化学鑑別性状

MALDI-TOF MS	ヘモフィルス ID4 分画培地	菌株数 (%)	Po (%)	糖分解試験陽性菌株数		
				グルコース (%)	スクロース (%)	マンノース (%)
<i>H. haemolyticus</i>	X, V 因子要求性, 溶血	6 (8.0)	0 (0.0)	6 (100.0)	0 (0.0)	4 (66.7)
	X, V 因子要求性, 非溶血	26 (34.7)	0 (0.0)	26 (100.0)	2 (7.7)	16 (61.5)
	V 因子要求性, 溶血	13 (17.3)	13 (100.0)	13 (100.0)	13 (100.0)	0 (0.0)
	V 因子要求性, 非溶血	30 (40.0)	30 (100.0)	30 (100.0)	30 (100.0)	4 (13.3)

Po: ポルフィリンテスト

表2. 分離された *H. influenzae* の生化学鑑別性状

MALDI-TOF MS	ヘモフィルス ID4 分画培地	菌株数 (%)	Po (%)	糖分解試験陽性菌株数		
				グルコース (%)	スクロース (%)	マンノース (%)
<i>H. influenzae</i>	X, V 因子要求性, 非溶血	10 (100.0)	0 (0.0)	10 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

Po: ポルフィリンテスト

スの糖分解性の確認試験は Kilian の報告³⁾を参考に、以下のプロトコールにて実施した。基礎培地 (プロテオーゼペプトン No.3 20 g/L, 塩化ナトリウム 10 g/L, フェノールレッド 0.036 g/L) を加温溶解後、ヘマチン 20 mg/L, β -NAD 20 mg/L と、グルコース、スクロース、マンノースをそれぞれ終濃度 2% になるように添加し、pH を 7.2 に調整後、濾過滅菌した。被験菌は生理的食塩水にて McFarland No.4 に調整し、基礎培地と菌液を 0.5 mL ずつ等量混合して 35°C で培養した。判定は、培養 72 時間後に、黄色への色調変化がみられたものを陽性とした (図 1)。

結 果

1. 16S rRNA シーケンス解析

MALDI-TOF MS で *H. haemolyticus* と同定された 75 株について実施した 16S rRNA シーケンス解析では、全ての株で *H. haemolyticus* と同定された。*H. haemolyticus* CIP 103290 株 (NR_104930.1) との相同性は 97.04~100.0% であった。そのうち MALDI-TOF MS で、同定スコアが 1.8 以上 1.9 未満であった 3 株は 98.88~99.32%, 1.9 以上 2.0 未満であった 5 株は 97.81~99.24% の相同性であった。

2. X, V 因子要求性および溶血性

対象とした *H. haemolyticus* 75 株のうち、X, V 両因子要求性が 32 株 (42.7%), V 因子要求性は 43 株 (57.3%) であった。ポルフィリンテストの結果は、X, V 両因子要求性の 32 株が陰性で、V 因子要求性の 43

株が陽性であった。また、溶血性状については溶血株が 19 株 (25.3%), 非溶血株が 56 株 (74.7%) であった。X, V 因子要求性と溶血性状の組合せにおいては、X, V 両因子要求性かつ溶血株は 6 株 (8%) であり、X, V 両因子要求性かつ非溶血株は 26 株 (34.7%) であった。また、V 因子要求性・溶血株は 13 株 (17.3%), V 因子要求性・非溶血株は 30 株 (40%) であった (表 1)。一方で、*H. influenzae* は全て X, V 両因子を要求し、非溶血であった (表 2)。

3. 糖分解性

X, V 両因子要求性の *H. haemolyticus* 32 株の糖分解性は、グルコース分解 32 株 (100%), スクロース分解 2 株 (6.3%), マンノース分解 20 株 (62.5%) であった。V 因子要求性の 43 株の糖分解性は、グルコース分解 43 株 (100%), スクロース分解 43 株 (100%), マンノース分解 4 株 (9.3%) であった (表 1)。*H. influenzae* は 10 株全てでグルコースを分解し、スクロース、マンノースは非分解であった (表 2)。

考 察

Haemophilus 属菌には *H. influenzae* のほかに *H. haemolyticus*, *H. parainfluenzae*, *H. parahaemolyticus* が主要な菌種として存在する。とくに *H. influenzae* は呼吸器感染症のほか、髄膜炎などの侵襲性感染症の起因菌となる臨床上非常に重要な菌種である⁸⁾ため、その他の *Haemophilus* 属菌との鑑別は重要である。日常検査において、*Haemophilus* 属菌の同定は、

X, V 因子要求性の確認をまず実施するが, X, V 因子の要求性のみでは *H. influenzae* と *H. haemolyticus* を鑑別することはできない。典型的な *H. haemolyticus* はウサギ (またはウマ) 血液寒天培地にて β 溶血を示すことで鑑別が可能であるが, 継代培養で溶血性を失うことや, 非溶血の *H. haemolyticus* の存在も明らかとなっている⁴⁾。

本検討では *H. haemolyticus* の同定を MALDI-TOF MS と 16S rRNA のシーケンス解析によって行った。非溶血の *H. haemolyticus* と *H. influenzae* との正確な鑑別は困難であり, 16S rRNA のシーケンス解析を含め, 単独で 100% 鑑別できる方法は確立されていない⁶⁾が, 今回分離した MALDI-TOF MS にて *H. haemolyticus* と同定された 75 株は全て 16S rRNA シーケンス解析結果と一致していた。その 75 株のうち, X, V 両因子要求性でかつ, ウマ血液寒天培地で溶血性を有している典型的な *H. haemolyticus* は 6 株に過ぎず, 全体の 8% であった。また, X, V 因子の要求性についても V 因子要求性株が半数以上分離された。X, V 因子要求性で, ウマ血液寒天培地上で溶血性を示さない *H. haemolyticus* は 26 株分離され, X, V 因子要求性と溶血性の確認まで実施しても, *H. influenzae* との鑑別は困難である。Nørskov らは, V 因子要求性株で ONPG 陰性を示し, さらにポルフィリンテスト陽性, スクロース分解の性状を示す “*Haemophilus intermedius* subsp. *intermedius*”, ポルフィリンテスト陰性, マンノース分解の性状を示す “*Haemophilus intermedius* subsp. *gazogenes*” に関する生化学鑑別性状, 遺伝学的解析結果について報告している⁹⁾¹⁰⁾。本検討で分離された V 因子要求性の *H. haemolyticus* は 43 株で, 全ての株がスクロース分解陽性であった。X, V 両因子要求性株は 32 株分離され, そのうち 20 株 (62.5%) がマンノース分解陽性であったことから, 本検討により分離された非典型的な性状を示す *H. haemolyticus* の多くはこれらのグループに属するものと考えられた。“*Haemophilus intermedius*” は菌種として正式に認められておらず, ライブラリーに登録されていないため同定されないが, MALDI-TOF MS においては *H. haemolyticus* として同定されることがすでに報告されており¹⁰⁾, 本検討とも一致する。

本検討により, *H. haemolyticus* が多様な性状を示すことが確認され, *Haemophilus* 属菌に対する正確な同定が困難であることが推察された。典型的な鑑別性状に従えば, V 因子要求性の *H. haemolyticus* は, 溶血を示せば *H. parahaemolyticus*, 非溶血であれば *H. parainfluenzae* に誤って同定される可能性が考え

られたが, 臨床検査上最も問題となる点は, *H. influenzae* と X, V 因子要求性でなおかつ非溶血の *H. haemolyticus* との鑑別である。すなわち, X, V 因子要求性と溶血性状だけで *Haemophilus* 属菌を鑑別した場合, *H. influenzae* と同定される株の一部に, *H. haemolyticus* が含まれることである。実際に Murphy ら⁵⁾は, *H. influenzae* と推定された喀痰由来の分離菌株 258 株のうち, 16S rRNA の特異配列を標的とした PCR と P6 タンパク質に対するイムノプロット法による鑑別の結果, 102 株が *H. haemolyticus* であったと報告している。

一方で, MALDI-TOF MS によって *H. haemolyticus* と同定された菌株は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列による同定結果と一致しており, MALDI-TOF MS による同定精度は非典型的な性状を示す *H. haemolyticus* に対しても非常に高いものと推察された。また, 属レベルの信頼度とされる同定スコア 1.7 以上 2.0 未満であった 8 株については, その同定精度に関して今後更なる検討が必要であるが, 今回の分離株においては 16S rRNA 遺伝子の塩基配列による同定結果と一致した。MALDI-TOF MS による微生物同定法における *H. influenzae* と *H. haemolyticus* の鑑別精度についてはすでに報告があり, 適切なデータベースが整備されていれば結果に信頼性がある¹¹⁾¹²⁾とされている。Bruin ら¹³⁾は *H. influenzae* 244 株と *H. haemolyticus* 33 株を試験したとき, ゴールドスタンダードとして用いた MLST 法と MALDI-TOF MS との一致率は 99.6% であり, MALDI-TOF MS はこの両菌種の鑑別において信頼性があると報告している。以上のことから, MALDI-TOF MS は, 細菌検査室での日常業務で実施可能な方法として, 最も現実的な検査法と思われる。MALDI-TOF MS を用いることができない場合, 非溶血の *H. haemolyticus* と *H. influenzae* との鑑別方法として, 16S rRNA 遺伝子シーケンスや, マルチプレックス PCR, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 等が報告されている¹²⁾¹⁴⁾¹⁵⁾が, コスト, 労力面に課題があり日常検査で行うのは現実的ではない。

日常検査における非溶血の *H. haemolyticus* と *H. influenzae* の鑑別法として, 本検討結果から糖分解性状がある程度有用であると思われる。本検討の結果において, *H. haemolyticus* の糖分解性状は溶血の有無による大きな差は無かったが, X, V 因子の要求性とは関連性があり, V 因子要求株はスクロースを分解し, X, V 因子要求株はマンノースを分解する傾向が多かった。一方の *H. influenzae* は Oberhofer ら¹⁶⁾の報告によると, スクロースは非分解であり, マンノー

スは biotype によって 0~6% が分解するとしている。しかしマンノースの分解性については, Manual of Clinical Microbiology¹⁷⁾や他の報告⁹⁾, 本検討結果を踏まえると, 一般的に非分解であると考えられた。X, V 因子要求性の試験, 溶血性状の確認のほか, マンノース分解試験を追加することで, 非溶血性 *H. haemolyticus* の 6 割程度を *H. influenzae* と鑑別することができたため, マンノース分解性の確認は鑑別性状として有用と考えられた。

これまで述べてきたように, MALDI-TOF MS によって *H. haemolyticus* と同定された菌株の生化学的性状について検討した結果, 溶血性の有無や X, V 因子要求性には多様性があり, *H. haemolyticus* として典型的な性状を示す菌株はむしろ少数であることが明らかとなった。非典型的な性状を示す菌株は, 特に生化学的性状を利用した同定方法においては他菌種に誤同定されることが想定されるが, 糖分解性状による鑑別がある程度可能であった。よって, これまで日常検査として実施してきた X, V 因子要求性試験と溶血性状の確認に, 糖分解試験を加えることにより, *Haemophilus* 属菌の同定精度が向上することが期待される。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- Morton, D. J., R. J. Hempel, P. W. Whitby, et al. 2012. An Invasive *Haemophilus haemolyticus* Isolate. *J. Clin. Microbiol.* 50: 1502-1503.
- Anderson, R., X. Wang, E. C. Briere, et al. 2012. *Haemophilus haemolyticus* Isolates Causing Clinical Disease. *J. Clin. Microbiol.* 50: 2462-2465.
- Kilian, M. 1976. A Taxonomic Study of the Genus *Haemophilus*, with the Proposal of a New Species. *J. Gen. Microbiol.* 93: 9-62.
- Fenger, M. G., W. Ridderberg, H. V. Olesen, et al. 2012. Low occurrence of 'non-haemolytic *Haemophilus haemolyticus*' misidentified as *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis respiratory specimens, and frequent recurrence of persistent *H. influenzae* clones despite antimicrobial treatment. *Int. J. med. Microbiol.* 302: 315-319.
- Murphy, M. F., A. L. Brauer, S. Sethi, et al. 2007. *Haemophilus haemolyticus*: A Human Respiratory Tract Commensal to Be Distinguished from *Haemophilus influenzae*. *J. infect. Dis.* 195: 81-89.
- 矢野寿一, 角田梨紗子, 小澤大樹, 他. 2015. 小児気道感染症におけるインフルエンザ菌のトピックス. *日臨微誌* 25: 13-18.
- Hinz, R., A. E. Zautner, R. M. Hagen, et al. 2015. DIFFICULT IDENTIFICATION OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*, A TYPICAL CAUSE OF UPPER RESPIRATORY TRACT INFECTIONS, IN THE MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTIC ROUTINE. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 5: 62-67.
- Turk, D. C.. 1984. THE PATHOGENICITY OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*. *J. Med. Microbiol.* 18: 1-16.
- Nørskov-Lauritsen, N., M. D. Overballe, M. Kilian. 2009. Delineation of the Species *Haemophilus influenzae* by Phenotype, Multilocus Sequence Phylogeny, and Detection of Marker Genes. *J. Bacteriol.* 191: 822-831.
- Nørskov-Lauritsen, N. 2014. Classification, Identification, and Clinical Significance of *Haemophilus* and *Aggregatibacter* Species with Host Specificity for Humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 27: 214-240.
- Zhu, B., D. Xiao, Y. Zhang, et al. 2013. MALDI-TOF MS Distinctly Differentiates Nontypable *Haemophilus influenzae* from *Haemophilus haemolyticus*. *PLoS One.* 8: e56139.
- Frickmann, H., M. Christner, M. Donat, et al. 2013. Rapid Discrimination of *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, and *H. haemolyticus* by Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) and Two Matrix-Assisted Laser-Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) Platforms. *Plos One.* 8: e63222.
- Bruin, JP, M Kostrzewa, A van der Ende, et al. 2014. Identification of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33: 279-284.
- McCrea, K. W., J. Xie, N. LaCross, et al. 2008. Relationships of Nontypeable *Haemophilus influenzae* Strains to Hemolytic and Nonhemolytic *Haemophilus haemolyticus*. Strains. *J. Clin. Microbiol.* 46: 406-416.
- Nørskov-Lauritsen, N. 2009. Detection of Cryptic Genospecies Misidentified as *Haemophilus influenzae* in Routine Clinical Samples by Assessment of Marker Genes *fucK*, *hap*, and *sodC*. *J. Clin. Microbiol.* 47: 2590-2592.
- Oberhofer, TR, AE Back. 1979. Biotypes of *Haemophilus* encountered in clinical laboratories. *J. Clin. Mi-*

crobiol. 10: 168-174.

17) Nathan, A. L., V. D. Gary. 2015. *Haemophilus*. p. 667-684. In: Manual of clinical microbiology 11th ed,

American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Examination of biochemical characteristics for the differentiation of clinically isolated strains identified as *Haemophilus haemolyticus* using MALDI-TOF MS

Hitoshi Kuramae¹⁾, Natsuko Matsui¹⁾, Tomomi Inukai¹⁾, Yuki Nakamura¹⁾,
Kouhei Kawaguchi²⁾, Kiyotada Nakamura¹⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory Pathology, Kariya Toyota General Hospital

²⁾Biochemical Research Laboratory-1, Eiken Chemical Co., Ltd.

Among bacteria of the genus *Haemophilus* isolated from clinical samples between April and August 2016 in our hospital, 75 strains identified as *Haemophilus haemolyticus* using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) were investigated to determine diversity in their biochemical characteristics for species differentiation. Only six strains (8.0%) exhibited typical diagnostic characteristics of requiring X and V factors and also displayed hemolysis on house blood agar, whereas 26 isolates (34.7%) were non-hemolytic strains requiring X and V factors. Moreover, 43 strains (57.3%) requiring only V factor were isolated, revealing diverse characteristics of *H. haemolyticus*. Despite the particular importance of identification of *H. influenzae*, it is difficult to distinguish non-hemolytic types of *H. haemolyticus* from *H. influenzae* based on requirement for X and V factors and hemolysis in routine tests. However, the glycolysis test employing sucrose and mannose, which was performed in this investigation, revealed that all strains of *H. haemolyticus* requiring only V factor metabolized sucrose, whereas 62.5% of strains requiring X and V factors metabolized mannose, which proved to be valuable as a characteristic for differentiation of *H. haemolyticus* from *H. influenzae*. The glycolysis test was a feasible differentiation method that improves accuracy of identification of *H. influenzae* in biochemical characteristics tests.