

[原 著]

*Moraxella catarrhalis* 簡易同定法の比較検討

武藤沙起里<sup>1)</sup>・山田景土<sup>2)</sup>・西山宏幸<sup>3)</sup>・齋藤良一<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> 公益財団法人東京都保健医療公社豊島病院検査科

<sup>2)</sup> 東邦大学医療センター大森病院臨床検査部

<sup>3)</sup> 日本大学医学部附属板橋病院臨床検査部

<sup>4)</sup> 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子病原体検査学分野

(令和元年5月7日受付, 令和元年8月23日受理)

*Moraxella catarrhalis* は呼吸器感染症の主要な原因微生物であり, 今後臨床において分離頻度の増加が懸念される。そのため本菌種の迅速同定は重要となるが, マトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型マスマススペクトロメトリー (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; MALDI-TOF MS) や生化学的性状以外の同定方法は十分な検討がなされていない。そこで本研究では, 同定キットを使用しない *M. catarrhalis* の簡易同定方法の比較を行った。使用菌株は *M. catarrhalis* 300 株とその他の菌種 144 株である。簡易同定方法として, butyrate test, 2 種類の選択培地発育性および hockey puck test の 3 方法を比較した。各試験について, 感度および特異度を算出し, それぞれの試験方法を評価した。Butyrate test, 選択培地発育性および hockey puck test の感度・特異度は, それぞれ 100%・99.3%, 98.3-99.0%・83.3-84.7% および 97.3%・97.3% であった。選択培地の発育性は特異度が他法と比較した場合に低く, 判定に一晚培養を要することが欠点である。一方で butyrate test と hockey puck test は, 一部の菌種において偽陽性などが認められたが, 感度・特異度ともに >95% であり, 迅速性にも優れていた。本検討において, 特別な装置を必要としない butyrate test と hockey puck test は感度・特異度および迅速性に優れており, これらの日常検査導入は *M. catarrhalis* の同定精度向上と迅速な結果報告を可能にする。

**Key words:** *Moraxella catarrhalis*, プチレート・ディスク, hockey puck test, 簡易同定

序 文

*Moraxella catarrhalis* は偏性好気性 Gram 陰性の双球菌であり, 肺炎や中耳炎などの呼吸器感染症の原因菌として分離される<sup>1)</sup>。わが国を含め多くの国々では, インフルエンザ b 型ワクチン (Hib ワクチン), および 13 価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13) が定期的なワクチン接種として普及している<sup>2)</sup>。その影響から, 小児における鼻腔常在菌層に変化が認められており, 小児鼻腔常在菌の最優位菌種は *M. catarrhalis* であるという報告も存在する<sup>4)</sup>。今後, 各種肺炎原因菌ワクチン接種の普及に伴い *M. catarrhalis* 保菌者が相対的に増加する可能性がある。その為, 他の呼吸器感染症の原因菌と比べ, *M. catarrhalis* の感染症例も増加する可能性がある。また, 小児における中耳炎は, 成人の慢性閉塞性肺炎患と比較して増悪しやすいという報告も存在し<sup>5)</sup>, 起炎菌として *M. catarrhalis* を疑う場合には迅速かつ精度の高い菌種同定が重要である。

わが国の日常検査における *M. catarrhalis* の同定方法は,

同定キットなどによる生化学的性状を利用した方法が普及している。それ以外では, 選択培地や MALDI-TOF MS を用いた方法も用いられている。しかしこれらの方法は, いずれも時間やコストがかかることが問題点として挙げられる。MALDI-TOF MS による同定は, 迅速同定やコストの低減は可能であるが, 現時点では全ての医療施設で導入・運用することは困難である。

今回我々は, これまでに *M. catarrhalis* の同定方法を詳細に比較した報告はなかったことから, 一般的な医療施設で実施可能かつ簡便な同定方法として, butyrate test, 選択培地および hockey puck test の比較検討を行い, それらの有用性について評価したので報告する。

材料と方法

1. 使用菌株および培養条件

2011 年 2 月から 2018 年 2 月までに東京都保健医療公社豊島病院で分離された菌株 444 株を使用した。それらは MALDI-TOF MS (ブルカー・ジャパン株式会社) を用いて同定後, 必要に応じて BBL Crystal GP (日本ベクトン・ディッキンソン) と rapid ID 32 STREP (バイオメリュー・ジャパン株式会社) でも再同定を行った。使用菌株の内訳は, *M. catarrhalis* (n=300), *Moraxella nonliquefaciens* (n=3), *Neisseria* spp. (n=34), *Haemophilus influenzae* (n=10), *Haemophilus parainfluenzae* (n=3), *Haemophilus haemolyticus*

著者連絡先: (〒173-0015) 東京都板橋区栄町 33-1  
公益財団法人東京都保健医療公社豊島病院検査科  
武藤沙起里  
TEL: 03-5375-1234  
FAX: 03-5944-3523  
E-mail: saori\_mutou@tokyo-hmt.jp

(n=1), *Haemophilus parahaemolyticus* (n=1), *Escherichia coli* (n=5), *Enterobacter* spp. (n=4), *Klebsiella* (*Enterobacter*) *aerogenes* (n=5), *Pseudomonas aeruginosa* (n=4), *Acinetobacter* spp. (n=9), *Staphylococcus aureus* (n=8), Coagulase-negative staphylococci (n=25), *Streptococcus anginosus* (n=1), *Streptococcus salivarius* (n=6), *Enterococcus* spp. (n=7), *Lactococcus garvieae* (n=1), *Corynebacterium* spp. (n=17) とした。被験菌株は 10% スキムミルクに濃厚に浮遊させた後、使用するまで -80°C に凍結保存した。

## 2. 同定方法の比較

### 1) Butyrate test

培養したコロニーを爪楊枝で釣菌し、釣菌した集落を滅菌水で湿らせたブチレート・ディスク (スギヤマゲン) に塗布し、ディスクが青色を呈した場合は陽性、無変化の場合を陰性とした。判定時間は 5 分、10 分、15 分および 30 分と経時的に判定した。

### 2) 選択培地を用いた同定

MBC チョコレート寒天培地 (極東製薬工業) とブランハマラ寒天生培地 (セロテック) の 2 社の培地を使用した。被験菌株を滅菌生理食塩水に McFarland No. 0.5 の濃度に調整し、調整後の菌液を 1 スポット当たり約  $10^6$  CFU になるよう 10  $\mu$ L ずつ滴下した。35°C で 18 時間好気培養した後、目視で菌の発育状況を判定した。コロニーが発育した場合を陽性、発育しなかった場合を陰性と判定した。

### 3) Hockey puck test

血液寒天培地上に発育したコロニーを、白金耳を用いて左右どちらか一方に押し、コロニーの形状を保ったまま培地上を動かすかどうかを確認した。0.5 cm 以上そのままの形状で動いた場合は陽性、それ以外は陰性とした。

## 結 果

### 1) Butyrate test を用いた同定結果

Table 1 にそれぞれの経過時間によって陽性反応を示した株数を示した。*M. catarrhalis* では 5 分で 9/300 (3%), 10 分で 235/300 (78.3%), 15 分で 56/300 (18.7%) となり、5~15 分以内に全株が陽性反応を示した。*A. baumannii* において 1 株のみ 15 分で陽性を示し、30 分後には *M. nonliquefaciens* 3 株、*N. flavescens* 1 株、*A. baumannii* 3 株、*A. junii* 2 株、*A. nosocomialis* 1 株、*P. aeruginosa* 2 株、*S. aureus* 4 株、CNS 14 株が陽性となった。

### 2) 選択培地を用いた同定結果

Table 1 に発育した株数を示した。*M. catarrhalis* は MBC チョコレート寒天培地には 295 株発育し、ブランハマラ寒天生培地には 297 株発育した。*M. nonliquefaciens* はブランハマラ寒天生培地にのみ 2 株発育し、*Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa* において両培地に発育が認められた株があり、*H. influenzae* はブランハマラ寒天生培地に 1 株発育が認められた。

### 3) Hockey puck test

Table 1 に陽性株数を示した。*M. catarrhalis* では 292/300 (97.3%) が陽性となり、*N. flavescens*, *N. perflava*, *H. parainfluenzae*, *C. pseudodiphtheriticum* においてそれぞれ 1 株

ずつ陽性となった。

## 4) 各同定法の比較

各検査法の感度および特異度は、butyrate test が双方とも一番高く、100% および 99.3% を示した (Table 2)。

## 考 察

口腔内の常在菌である非病原性 *Neisseria* spp. は *M. catarrhalis* 同様 Gram 陰性球菌の形態を示すが、誤嚥性肺炎等を除き呼吸器感染症の原因菌とは一般的にならない。その為、常在菌として存在する非病原性 *Neisseria* spp. と *M. catarrhalis* は明確に鑑別する必要がある。*M. catarrhalis* の特徴として、オキシダーゼ試験陽性やカタラーゼ試験陽性の他に  $\beta$ -lactamase を産生することが知られている<sup>6)</sup>。これらは *M. catarrhalis* を推定する上では重要な特徴といえるが、確定するには至らない。Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M35-A2 のガイドライン<sup>7)</sup>において、確定同定のための試験として butyrate test 陽性を確認することが推奨されている。*M. catarrhalis* は、プロモクロロインドリルブチレートを加水分解する酵素であるブチレートエステラーゼを産生するとされている<sup>8)</sup>。Butyrate test は、菌の産生するブチレートエステラーゼの作用により、遊離したインドキシル基と大気中の酸素が反応し青色を呈する反応を原理としている<sup>9)</sup>。他の *Neisseriaceae* の多くの菌種ではこの基質を加水分解せず青色を呈さないことから、鑑別が可能となる<sup>10)</sup>。

今回、ブチレート・ディスクの性能評価に加え、従来行われてきた *M. catarrhalis* 同定方法の感度・特異度の評価を行った (Table 2)。

ブチレート・ディスクを用いた方法では、*M. catarrhalis* の 78.3% が 10 分以内に陽性となり、15 分以内には 100% で陽性となったことから、感度および迅速性いずれも優れた鑑別試薬であると言える。*A. baumannii* の 1 株のみ 15 分で陽性となったことに関しては、Perez らの研究において、*Acinetobacter* spp. ではブチレートエステラーゼ活性が証明されており<sup>12)</sup>、それによって陽性となったと考えられる。結果判定 15 分では、感度 100%・特異度 99.3% であったが、30 分では、感度 100%・特異度 81.6% であった。Vaneechoutte らの研究では、*M. catarrhalis* 以外の *Neisseriaceae* や、*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Candida albicans* の菌種において、butyrate test 陽性反応を示す株が認められるとの報告があった<sup>13)</sup>。これらの結果を踏まえた上で、ブチレート・ディスクは簡便かつ迅速に結果が出せる利点があるが、単独で使用する場合は判定時間を延長しすぎないこと、他菌種でも陽性反応を示す菌種が存在することを知らなければならぬ。

選択培地を用いた方法では、菌種によって両培地に発育したものや、どちらか一方の培地に発育したものが認められた。Vaneechoutte らは *Neisseria* spp. の選択的阻害薬としてアセタゾールアミドを発見し、それを培地に添加した *Moraxella* 選択培地を作り、性能を評価している<sup>11)</sup>。この研究では、アセタゾールアミドに加えて、バンコマイシン、トリメトプリム、アンホテリシン B の抗菌薬を対象にし、*M. catarrhalis* では、これらの抗菌薬に対して耐性であることを証明してい

Table 1. 使用菌株と各方法での陽性件数

Species (no. of isolates)	Butyrate test				Selective media		Hockey puck test
	5 min	10 min	15 min	30 min	MBC chocolate agar	Branhamella agar	
<i>Moraxella catarrhalis</i> (300)	9	235	56	—	295	297	292
<i>Moraxella nonliquefaciens</i> (3)	0	0	0	3	0	2	0
Neisseria spp.							
<i>N. flavescens</i> (17)	0	0	0	1	0	0	1
<i>N. macacae</i> (2)	0	0	0	0	0	0	0
<i>N. oralis</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0
<i>N. perflava</i> (9)	0	0	0	0	0	0	1
<i>Neisseria</i> sp. (4)	0	0	0	0	0	0	0
<i>N. subflava</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0
Haemophilus spp.							
<i>H. influenzae</i> (10)	0	0	0	0	1	0	0
<i>H. parainfluenzae</i> (3)	0	0	0	0	0	0	1
<i>H. haemolyticus</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. parahaemolyticus</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0
Acinetobacter spp.							
<i>A. baumannii</i> (6)	0	0	1	3	5	5	0
<i>A. junii</i> (2)	0	0	0	2	2	2	0
<i>A. nosocomialis</i> (1)	0	0	0	1	1	1	0
Enterobacter spp.							
<i>E. cloacae</i> (2)	0	0	0	0	2	2	0
<i>E. kobei</i> (2)	0	0	0	0	2	2	0
<i>Klebsiella aerogenes</i> (5)	0	0	0	0	4	5	0
<i>Escherichia coli</i> (5)	0	0	0	0	1	1	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (4)	0	0	0	2	4	4	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (8)	0	0	0	4	0	1	0
Coagulase-negative staphylococci							
<i>S. epidermidis</i> (22)	0	0	0	12	0	0	0
<i>S. haemolyticus</i> (2)	0	0	0	1	0	0	0
<i>S. lugdunensis</i> (1)	0	0	0	1	0	0	0
<i>Streptococcus anginosus</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus salivarius</i> (6)	0	0	0	0	0	0	0
Enterococcus spp.							
<i>E. faecalis</i> (5)	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. faecium</i> (2)	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactococcus garvieae</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0
Corynebacterium spp.							
<i>C. accolens</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. amycolatum</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. propinquum</i> (3)	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> (3)	0	0	0	0	0	0	1
<i>C. striatum</i> (9)	0	0	0	0	0	0	0

Table 2. 各方法の感度および特異度

	Butyrate test	<i>M. catarrhalis</i> grew on selective media	Hockey puck test
Sensitivity (%)	100	98.3-99.0	97.3
Specificity (%)	99.3	83.3-84.7	97.3

る<sup>11)</sup>。今回我々の研究で使用した MBC チョコレート寒天培地には、バンコマイシン、トリメトプリム、アセタゾールアミドといった選択剤が含まれ、ブランハメラ寒天生培地には、アムホテリシン B、トリメトプリム、バンコマイシン、アセ

タゾールアミドが選択剤として含まれているため、*M. catarrhalis* 以外の *Neisseriaceae*、Gram 陽性菌および真菌の発育が抑制される組成となっている。腸内細菌科などの Gram 陰性桿菌が発育したのは、これらの培地は、*Moraxella*

属以外の口腔内常在菌の発育を抑制することが目的であり、Gram 陰性桿菌を抑制するための選択剤が含まれていないためである。また、選択培地の感度は 98.3%-99.0% であったが、特異度は 83.3%-84.7% と、他法と比較した場合低く、判定までに時間を要するという点でも劣っている。

Hockey puck test では、他法と同様に *M. catarrhalis* で陰性と判定されたものや、他菌種で陽性と判定された菌株が認められたが、感度 97.3%、特異度 97.3% と良好な結果を示していた。本検査法は迅速性、コスト面において他法と比較し優れている一方で、コロニーが動いたように見えてしまうことや、検査者の手技によって結果にバラツキが出てしまうことがある。他法では、色調変化や発育の有無など判定し易いが、hockey puck test は判定基準の設定が難しいために偽陽性や偽陰性を示すことがある。

今回の検討では、表現型から *M. catarrhalis* を簡易同定する手法を比較した。その結果、ブチレート・ディスクは高い精度で *M. catarrhalis* を同定できることが示唆された。しかし *M. catarrhalis* の同定に対し、偽陽性や偽陰性は本検討で使用した全ての方法で認められたため、その精度に限界があることも明らかとなった。また、選択培地や同定キットを使用した同定方法は判定までに時間を要することから、ブチレート・ディスクや hockey puck test などの方法を組み合わせることで迅速な判定が可能となる。*M. catarrhalis* を疑う集落所見を示し、簡易同定の結果が疑わしい場合は、Gram 染色による染色所見やオキシダーゼ試験、カタラーゼ試験および  $\beta$ -lactamase 試験などの性状を確認することも重要である。

*M. catarrhalis* を同定するにあたり、ブチレート・ディスクを用いた簡易同定法は、どの施設においても行うことが可能であり、手技も簡便で判定時間も 15 分と短い。また、MALDI-TOF MS による同定が出来ない施設や、その同定の補助として、ブチレート・ディスクを使用するのは有用である。ブチレート・ディスクや hockey puck test は高感度・高特異度であり迅速性に優れることから、これら検査手法の日常検査導入はより迅速な結果の報告も可能となる。

利益相反：申請すべき利益相反なし。

## 文 献

1) Yamada, K., K. Arai, R. Saito, et al. 2017. Antimicrobial susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics and production of BRO  $\beta$ -

lactamase in clinical isolates of *Moraxella catarrhalis* from a Japanese hospital. J. Microbiol. Immunol. Infect. 50: 386-389.

- 2) Infectious Agents Surveillance Report (IASR). 2018. 13 価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13) 導入後の小児侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) の現状. 112-113.
- 3) Bernhard, S., V. Spaniol, C. Aebi, et al. 2012. Molecular pathogenesis of infections caused by *Moraxella catarrhalis* in children. Swiss. Med. Wkly. 142: w13694.
- 4) Khan, MA., JB. Northwood, F. Levy, et al. 2010.  $\beta$ -lactamase and antibiotic resistances in a global cross-sectional study of *Moraxella catarrhalis* from children and adults. J. Antimicrob. Chemother. 65: 91-97.
- 5) Shi, W., D. Wen, C. Chen, et al. 2018.  $\beta$ -lactamase production and antibiotic susceptibility pattern of *Moraxella catarrhalis* isolates collected from two county hospitals in China. BMC. Microbiology. 18: 77.
- 6) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): abbreviated identification of bacteria and yeast; approved guideline - second edition; document M35-A2, November 2008.
- 7) Dealler, SF., M. Abbott, MJ. Croughan, et al. 1989. Identification of *Branhamella catarrhalis* in 2.5 min with an indoxyl butyrate strip test. J. Clin. Microbiol. 27: 1390-1391.
- 8) Speeleveld, E., JM. Fossepre, B. Gordts, et al. 1994. Comparison of three rapid methods, tributyrine, 4-methylumbelliferyl butyrate, and indoxyl acetate, for rapid identification of *Moraxella catarrhalis*. J. Clin. Microbiol. 32: 1362-1363.
- 9) Janda, WM., P. Ruther. 1989. B.cat confirm, a rapid test for confirmation of *Branhamella catarrhalis*. J. Clin. Microbiol. 27: 1130-1131.
- 10) Vaneechoutte, M., G. Verschraegen, G. Claeys, et al. 1998. Selective medium for *Branhamella catarrhalis* with acetazolamide as a specific inhibitor of *Neisseria* spp. J. Clin. Microbiol. 26: 2544-2548.
- 11) Perez, JL., A. Pulido, F. Pantozzi, et al. 1990. Butyrate esterase (tributyrin) spot test, a simple method for immediate identification of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*. J. Clin. Microbiol. 28: 2347-2348.
- 12) Vaneechoutte, M., G. Verschragen, G. Claeys, et al. 1998. Rapid identification of *Branhamella catarrhalis* with 4-methylumbelliferyl butyrate. J. Clin. Microbiol. 26: 1227-1228.

Comparison of butyrate test, selective media, and hockey puck test  
as a simple identification method for *Moraxella catarrhalis*

Saori Muto<sup>1)</sup>, Kageto Yamada<sup>2)</sup>, Hiroyuki Nishiyama<sup>3)</sup>, Ryoichi Saito<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Clinical Laboratory, Tokyo Metropolitan Health and Medical Treatment Corporation Toshima Hospital

<sup>2)</sup>Department of Clinical Laboratory, Toho University Medical Center Omori Hospital

<sup>3)</sup>Department of Clinical Laboratory, Nihon University Itabashi Hospital

<sup>4)</sup>Department of Molecular Microbiology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

*Moraxella catarrhalis* is a pathogen responsible for a large number of respiratory tract infection. With the exception of MALDI-TOF MS, no phenotype-based *M. catarrhalis* identification tests have been established in Japan. To address this deficiency, we evaluated three candidate methods for phenotypic identification of *M. catarrhalis* phenotype-based examined methods for *M. catarrhalis*. Three hundred isolates of *M. catarrhalis*, and 144 isolates of other bacteria were used in this study. The three methods, the butyrate test, growth on selective media, and the hockey puck test were compared. The three identification methods compared were the butyrate test, growth in selective media, and the hockey puck test. The sensitivities of the butyrate test, growth potential in selective media, and the hockey puck test were 100%, 98.3-99.0%, and 97.3%, respectively. Specificities were 99.3%, 83.3-84.7%, and 97.3% respectively. The specificity of growth in selective media was lower than that of other identification methods, and another disadvantage was that overnight culture was required for analysis. Although false positives and negatives were observed with the butyrate and hockey puck tests, sensitivity and specificity both >95%. In addition, results were rapidly obtainable with both butyrate test and hockey puck test. Our study results indicate that the butyrate and hockey puck tests can be performed without special equipment, and are superior in sensitivity, specificity, and rapidity. In conclusion, this study suggests that adoption of the butyrate test and hockey puck test could enable accurate and rapid identification of *M. catarrhalis* in a clinical microbiological laboratory.