

# 侵襲性インフルエンザ菌感染症 検査マニュアル

令和3年12月

## 目次

1	侵襲性インフルエンザ菌感染症の概要と疫学	3
2	検査に関する一般的注意	4
2-1.	検査検体	4
2-2.	検体の輸送	4
2-3.	届出基準	
3	インフルエンザ菌の分離、検出法と菌株保存	5
3-1.	培養による菌の分離	5
3-2.	分離菌の保存	6
3-3.	遺伝子検出法	7
3-4.	抗原検出法	7
4	インフルエンザ菌の同定鑑別法	8
4-1.	生化学的性状試験による同定と鑑別法	8
4-2.	鑑別培地や同定キットによる鑑別法	8
4-3.	溶血性試験	9
4-4.	ポルフィリン試験	10
4-5.	16S rRNA 遺伝子のシーケンシングによる同定法	11
4-6.	MALDI-TOF MS による鑑別	13
5	莢膜型別	13
5-1.	スライド凝集法	14
5-2.	PCR 法	15
5-3.	莢膜関連遺伝子 <i>bexA</i> 、 <i>bexB</i> の PCR	16
6	薬剤感受性	18
6-1.	$\beta$ -lactamase	18
6-2.	E-test	18
6-3.	ディスク拡散法	21
6-4.	微量液体希釈法	21
7	Multi locus sequencing typing (MLST) による菌株の分類	23
	参考文献	25
	執筆者	26

## 1. 侵襲性インフルエンザ菌感染症の概要と疫学

インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) はパスツレラ科ヘモフィルス属のグラム陰性短桿菌で、乳幼児の多くは鼻咽頭に保菌し(1)、髄膜炎、菌血症を伴う肺炎などの侵襲性感染症ならびに中耳炎等の非侵襲性感染症を起こす。侵襲性感染症は、血液や髄液等、本来無菌的な部位から起因菌が分離された場合を指し一般的に重症例が多い。2013年4月1日の感染症法改正において「侵襲性インフルエンザ菌感染症」は5類全数把握疾患に追加され、医師は診断後7日以内の届出が義務付けられた(2)。

インフルエンザ菌は、菌体表面を被う莢膜多糖を有する“有莢膜株”と、莢膜を有さない“無莢膜株”がある。有莢膜株は a、b、c、d、e、f の6型に分類され、b型(Hib)のみワクチン(Hib ワクチン)がある。わが国では、2008年12月に Hib ワクチン任意接種が開始され、2013年4月に定期接種となった。侵襲性 Hib 感染症罹患率(5歳未満小児人口10万人当たり)は、定期接種前の髄膜炎 7.71、非髄膜炎 5.15 に対して、定期接種後はそれぞれ 0.17、0.10 まで減少しその傾向は現在も維持されている(3)。一方、成人では Non-typable *Haemophilus influenzae* (NTHi、無莢膜株)により多数の“菌血症を伴う肺炎”が報告されており、高齢者においては重要な原因菌のひとつである。

感染症発生動向調査(2013–2020年)によると、5歳未満の小児と80歳代の高齢者に発症のピークがあり、5歳未満が10%、60歳以上が72%を占めている(図1)。

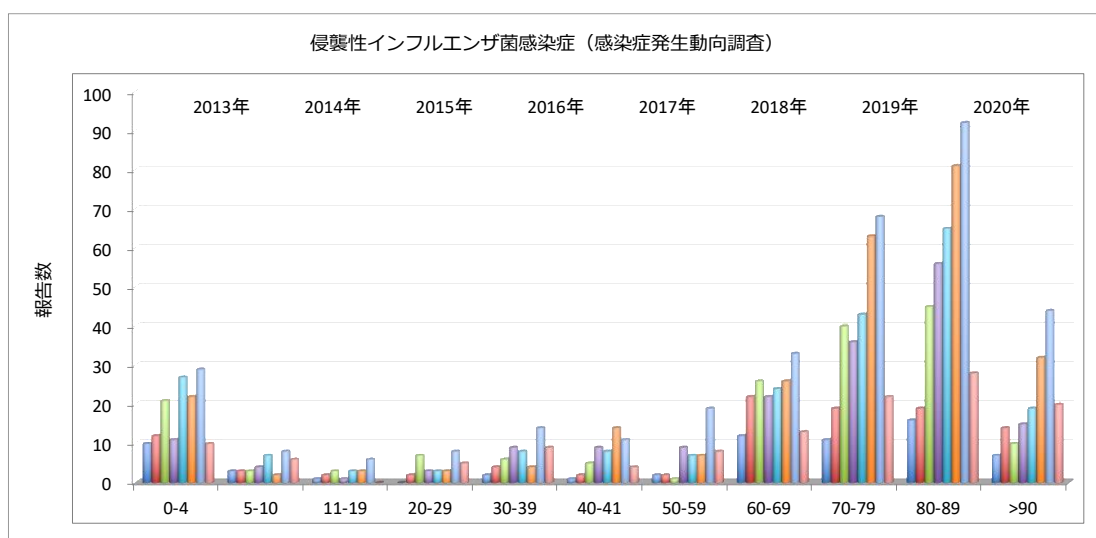


図1 侵襲性インフルエンザ菌感染症の発生推移

国の感染症流行予測調査(東京都、大阪府、新潟県の集計結果)における莢膜型別の解析(2014–2019年)では、NTHiが90%以上を占め、次いでf型7%、b型とe型が各1%となっている(図2)。

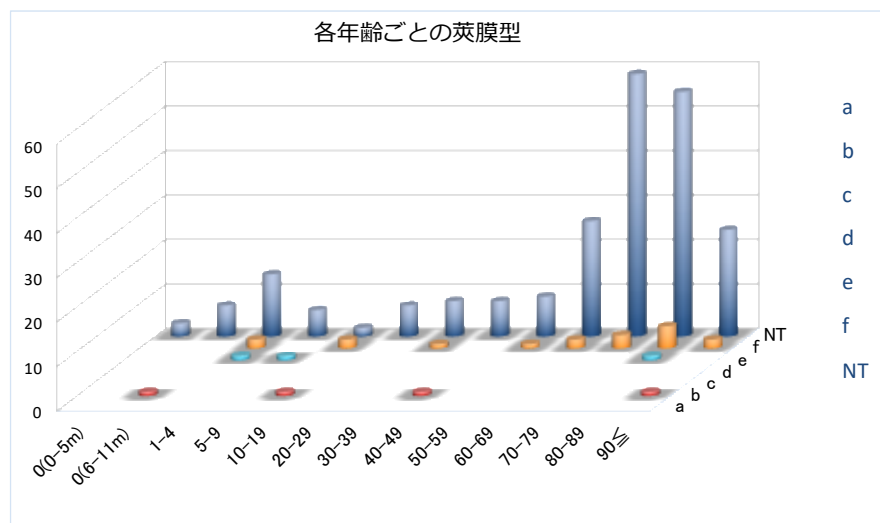


図2 侵襲性インフルエンザ菌感染症の年齢別発生数と莢膜型別

近年、Hib ワクチンの普及により小児における Hib 感染症が激減する一方で、Hia によるまれな感染症例の報告もある(4)。

## 2. 検査に関する一般的注意

### 2-1. 検査検体

検査対象となる患者の髄液、血液、その他の無菌部位から採取された検体を検査材料とする。滅菌された容器に採取し、検体は早めに検査を実施する。

### 2-2. 検体の輸送

インフルエンザ菌および臨床検体は、WHO「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス」で「カテゴリーB」に分類される。検体輸送は下記の情報などに基づき適切に行うこと。

- ・「病原体等の輸送用包装容器～カテゴリーB 容器」

(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-biosafe/947-youkisb.html>)

- ・病原体等の国内輸送について(平成27年度病原体等の包装・運搬講習会/厚生労働省)

(<https://www.pref.ibaraki.jp/hokenfukushi/yobo/kiki/yobo/kansen/idwr/information/other/documents/yupack01.pdf>)

### 2-3. 届出基準

感染症法に基づく侵襲性インフルエンザ菌感染症 (5類感染症 全数把握)の届出基準は次のように定められている。

<https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/01-05-44.html>

(1) 定義

*Haemophilus influenzae* による侵襲性感染症として、本菌が髄液又は血液などの無菌部位から検出された感染症とする。

(2) 臨床的特徴

潜伏期間は不明である。発症は一般に突発的であり、上気道炎や中耳炎を伴って発症することがある。髄膜炎例では、頭痛、発熱、髄膜刺激症状の他、痙攣、意識障害、乳児では大泉門膨隆等の症状を示す。敗血症例では発熱、悪寒、虚脱や発疹を呈すが、臨床症状が特異的ではないことも多く、急速に重症化して肺炎や喉頭蓋炎並びにショックを来すことがある。

(3) 届出基準

ア 患者(確定例)

医師は、(2)の臨床的特徴を有する者を診察した結果、症状や所見から侵襲性インフルエンザ菌感染症が疑われ、かつ、次の表の左欄に掲げる検査方法により、侵襲性インフルエンザ菌感染症患者と診断した場合には、法第12条第1項の規定による届出を7日以内に行わなければならない。この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。

イ 感染症死亡者の死体

医師は、(2)の臨床的特徴を有する死体を検案した結果、症状や所見から、侵襲性インフルエンザ菌感染症が疑われ、かつ、次の表の左欄に掲げる検査方法により、侵襲性インフルエンザ菌感染症により死亡したと判断した場合には、法第12条第1項の規定による届出を7日以内に行わなければならない。この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。

検査方法	検査材料
分離・同定による病原体の検出	髄液、血液、その他の無菌部位
PCR法による病原体の遺伝子の検出	髄液、血液、その他の無菌部位
ラテックス法による病原体抗原の検出	髄液

3. インフルエンザ菌の分離、検出法と菌株保存

3-1. 培養による菌の分離

検体からのインフルエンザ菌の分離培養および継代培養には X 因子(ヘミン)と V 因子(NAD)を含むチョコレート寒天培地を用いる。ウマまたはウサギ血液寒天培地には発育するが、チョコレート寒天培地と比較し発育性は劣る。インフルエンザ菌はヒツジ血液寒天培地には発育しない。インフルエンザ菌は通性嫌気性であり、CO<sub>2</sub> 存在下で増殖が促進される。

① 検体からのインフルエンザ菌の分離培養

検体の1白金耳をチョコレート寒天培地(チョコレートII寒天培地 Becton Dickinson 251169 等)に塗布し、5%CO<sub>2</sub>存在下、35~37°C、18~24時間培養する。

検体が血液である場合は血液培養用ボトルによる培養も可能である。検体を注入したボトルを35~37°Cで培養し、培養液が混濁したら分離用寒天培地に接種する。菌が増殖しても培養液に濁りが認められない場合があるので、適宜寒天培地に接種し分離培養を行う。

② コロニー性状

チョコレート寒天培地上のインフルエンザ菌コロニーは灰白色~白色で光沢があり、湿潤で柔らかい。一般的に、無莢膜型菌は直径0.5~1.5mmの灰色でR型、有莢膜菌は少し大きめ(~4mm)で白濁したS型でムコイド状を呈すると言われているが実際には株によって異なる事が多い(写真)。



無莢膜型菌



莢膜a型菌

③ グラム染色像

インフルエンザ菌は、グラム陰性短桿菌でやや染まりにくく極染色性を示すことがある(5)。多形態性を示すのが特徴で、抗菌薬を使用した患者由来菌では長いフィラメント状になることがある。

3-2. 分離菌の保存

培養分離された菌株は以下の①~③の方法で保存できる。

① グリセロール保存

平板上の新鮮培養菌を綿棒または白金耳でかき取り、滅菌生理食塩水に懸濁して濃い菌液とする。この菌液 250μL に滅菌済の 80%グリセロール 750μL を混合し、保存用チューブに移し、-80°Cで保存する。保存菌を使用するときは、チューブ内の菌液全体が解凍するのを避けるため、加熱滅菌した白金線(熱いまま)で凍結菌液の一部に触れて融かし、新鮮培地に植菌する。フリーザーから保存チューブの出し入れ時も、冷やした容器に入れて運ぶ等、解凍を避けるための注意を払う。

## ② マイクロバンク(PRO-LAB DIAGNOSTICS) 保存

平板上の新鮮培養菌をチューブ内の培地に懸濁した後、4-5回転倒混和する。次に滅菌ピペットで菌液を吸い取り(液が残っていると凍結後ビーズを取り出しにくくなるのを避けるため)、-80°Cで保存する。保存菌を使用する際には、一個のビーズの穴に白金線を入れて取り出し、新鮮培地にビーズで植菌する。使用後のチューブを戻す際には解凍を避ける。

## ③ ゼラチンディスク保存

A 液: グルコース 5g、スキムミルク 3g、活性炭末 0.6g を蒸留水 100 mL に溶解し、110°C で 10 分間滅菌し、4°C で保存。

B 液: 5%L-アスコルビン酸ナトリウム水溶液を濾過滅菌し、分注して-20°C以下で保存する。

C 液: 20%ゼラチン水溶液を 121°C、15 分間滅菌し、4°C で保存する。使用前に 50°C に加温して溶解する。

1. 一株あたり、0.5mL A 液+0.1mL B 液+0.5mL C 液の混合液を調整する。
2. 平板上の新鮮培養菌 1 白金耳程度を 1. に懸濁する。
3. 滅菌シャーレにパラフィン紙や滅菌したクッキングシートをおき、その上に菌液を一滴ずつ滴下する。
4. シリカゲル等と共にデシケーターにいれ、真空ポンプで 20 mmHg 以下に減圧する。
5. 24 時間程度で乾燥してディスク状になるので、滅菌済ピンセットで滅菌チューブ等に回収し、冷凍保存する。(ただし、輸送等により一時的に冷蔵もしくは常温下におくことは可能)。

### 3-3. 遺伝子検出法

呼吸器感染症の原因菌の遺伝子検出キットとして、CycleavePCR™ 呼吸器系感染症起因菌検出キット Ver.2 (TaKaRa) が販売されており、インフルエンザ菌も検出対象に含まれている。

[https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic\\_info.php?unitid=U100005133](https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100005133)

このキットではインフルエンザ菌の 16S rRNA 遺伝子が検出のターゲットになっているが、*Pasteurella multocida* によっても陽性になることがある。また、プライマーの配列から、一部のインフルエンザ菌は検出されにくい可能性が考えられる。このキットを使用して検査を行った場合、精密な判定には、他の検査を併用して判断することが必要だと考えられる。

### 3-4. 抗原検出法

抗原検出については、b 型インフルエンザ菌のみ以下の検出キットが市販されている。

- ・インフルエンザ菌 b 型 (Hib) 迅速試験 (BML)

<http://uwb01.bml.co.jp/kensa/search/detail/3803293>

- ・PASTOREX メニンジャイティス (バイオ・ラッド)

[https://www.info.pmda.go.jp/tgo/pack/21000AMY00011000\\_A\\_01\\_03/](https://www.info.pmda.go.jp/tgo/pack/21000AMY00011000_A_01_03/)

#### 4. インフルエンザ菌の同定鑑別法

##### 4-1. 生化学的性状試験による同定と鑑別法

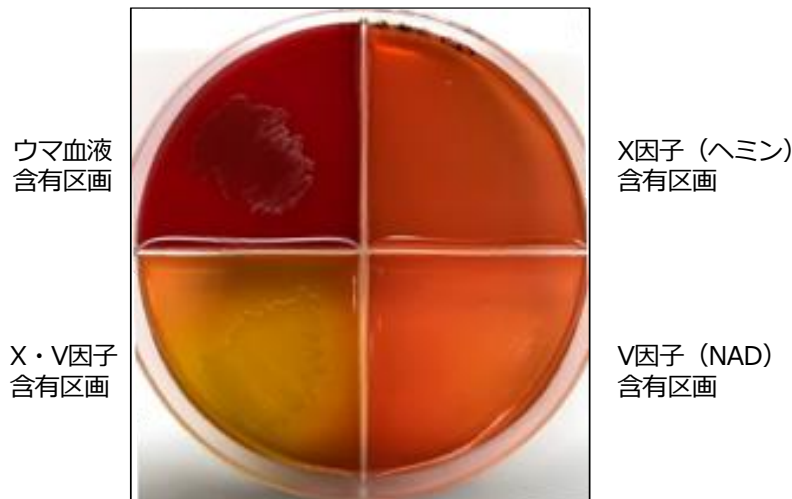
ヘモフィルス属菌は、発育因子として、X 因子(ヘミン)と V 因子(NAD)の両方またはどちらか一方を必要とすることから、X、V 因子の要求性検査がヘモフィルス属の同定には重要である。

- ・ *H. influenzae* は、発育に X 因子、V 因子の両方を要求する。溶血性は無く、カタラーゼ反応は陽性である。糖分解性としてブドウ糖分解、白糖・乳糖・マンノースは非分解性である。
- ・ *H. haemolyticus* は、まれに侵襲性感染症を引き起こすことがある。本来ウマ血液寒天培地上で溶血性を示すが、近年、溶血性を示さない *H. haemolyticus* が報告され(6)、インフルエンザ菌と誤同定されることがあり、判別が必要である。

##### 4-2. 鑑別培地や同定キットによる鑑別法

以下に示す a~e の方法で X 因子、V 因子要求性、溶血性を確認することができる。

- ヘモフィルス鑑別培地(極東製薬工業)：X 因子要求性、V 因子要求性、溶血反応の3つでヘモフィルス属の同定を行う。誤判定を回避するため V 区画に白糖が添加されている。チョコレート寒天培地からの X 因子が V 区画に持ち込まれると、V 因子含有区画で *H. influenzae* の増殖が可能となる。この場合 *H. influenzae* は白糖非分解性のため増殖しても酸は産生されず培地の黄変は認められない。その結果、黄変する *H. parainfluenzae* と区別が可能となる。



ヘモフィルス鑑別培地(極東製薬工業)上のインフルエンザ菌。X因子V因子両方含有の分画に増殖している。ウマ血液を溶血しないが増殖している。

- ヘモフィルス ID4 分画培地(日本 Becton Dickinson)：発育因子を添加した Brain heart infusion 培地の 4 分画平板で、X 因子、V 因子の要求性及び溶血反応でヘモフィルス属の鑑別に用いる。



- c. ポアメディア®Vi ヘモフィルス寒天培地(栄研化学)：ヘモフィルス属菌の選択分離培地であり、抗菌剤によりグラム陽性菌の発育を抑制し、発育因子とウマ脱繊維素血液の添加によりインフルエンザ菌が発育可能となり溶血性の有無を確認することができる。*H. influenzae* 等の白糖およびマンノース非分解菌は灰色コロニー、*H. parainfluenzae* 等の白糖およびマンノース分解菌はアニリンブルーと反応し青色コロニーを形成する。
- d. XVマルチディスク(栄研化学)：X、V および XV の各ディスクをプラスチックスティックに貼付したもので、X ディスクではヘミン、V ディスクでは NAD、XV ディスクではヘミンと NAD を 1cm 角のろ紙(ディスク)に含有している。血液成分を含まない寒天平板に、被検菌を塗抹した上に、本製品をのせて培養する。被検菌が平板上の X ディスクと XV ディスクの周囲に発育した場合には X 因子要求性、V ディスクと XV ディスクの周囲に発育した場合には V 因子要求性、XV ディスクの周囲のみに発育した場合は XV 因子要求性と判定する。
- e. 生化学的性状を利用した同定キットとして、API NH(ビオメリュー)、ID テスト・HN-20 ラピッド(日水製薬)等がある。

#### 4-3. 溶血性試験

ヒツジ血液寒天培地上には *Haemophilus* 属菌は発育しないため、溶血性試験には、ウマあるいはウサギ血液を 5%に加えた寒天培地を用いる(ウサギ血液のほうが明瞭に観察できる)。5%ウサギ血液寒天培地に画線後、5%CO<sub>2</sub>存在下で 35~37°C、18~24 時間培養する。*H. influenzae* は溶血性(-)である。*H. haemolyticus* と *H. parahaemolyticus* は溶血性(+)で、集落の周囲に β 溶血が観察される(5、7)。

\* ヒツジ血液には V 因子破壊酵素が含まれるため、ヒツジ血液寒天培地上にインフルエンザ菌は発育できず、溶血性の観察には V 因子破壊酵素を含まないウサギやウマ血液を使用すること。

表 1 *Hemophilus* 属菌の鑑別

<i>Haemophilus</i> 属菌の鑑別	X, V 因子要求性		β 溶血性 (ウマ血寒天)	糖の発酵				カタラーゼ	CO <sub>2</sub> 要求性
	X*	V		ブドウ糖	白糖	乳糖	マンノース		
<i>H. influenzae</i>	+	+	-	+	-	-	-	+	++
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	-	+	+	-	+	D	D
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-

D:菌株により異なる

\* X 因子要求性株(+)はポルフィリン試験陰性。非要求性株(-)はポルフィリン試験陽性。

\*\* 実際にはCO<sub>2</sub>なしで発育できる株がほとんど。

#### 4-4. ポルフィリン試験

培地を用いた栄養要求性の鑑別では、試験菌の継代時にもとの培地成分の持ち込みが起こり、「X因子、V因子要求株」を「X因子のみ要求株」または「V因子のみ要求株」と誤判定することがある。この誤判定を避けるためポルフィリン試験の併用が推奨される。

ポルフィリン試験は  $\delta$ -アミノレブリン酸からポルフィリンが合成できるかを調べる試験であり、X因子要求株はポルフィリン合成ができず、X因子非要求株はポルフィリン合成ができる。したがって、分離・鑑別培地よりもX因子要求性が明確に判定できる。

試薬を自家調製する場合は、小試験管に基質液、対照用基質液各0.5ml をとり被検菌を濃厚に懸濁し、35～37°C、4 時間静置後UVランプ(340nm)を照射する。赤色蛍光は陽性(X因子非要求性)、無色は陰性(X因子要求性)と判定する。または、35～37°C、24時間静置後Kovac試薬 0.5mlを添加混合し、静置後下層(水層)赤色は陽性でX因子非要求性、無色は陰性でX因子要求性と判定する。インドール産生菌は上層部が赤色になるので必ず対照を置き比較判定する。Kovac試薬添加前に液層が赤くなっている場合は試薬を加える必要はない。

##### 基質液

$\delta$ -アミノレブリン酸 33.5 mg

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 19.7 mg

0.1mol リン酸緩衝液(pH6.9) 100 ml

##### 対照用基質液(基質液から $\delta$ -アミノレブリン酸を除いた液)

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 19.7 mg

0.1mol リン酸緩衝液(pH6.9) 100 ml

#### 4-5. 16S rRNA 遺伝子のシーケンシングによる同定法

分離株の 16S rRNA 遺伝子を分析し、データベースと照合することによって、インフルエンザ菌の同定を行う。

本法は日本薬局方 (<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000066530.html>) の参考情報にある「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」に採用されている方法と同等なものである(8)。

チョコレート寒天培地で一晚培養したコロニーから、菌株のゲノム DNA を QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) などで抽出する。これを鋳型として、下記のプライマーセットによる PCR で、16S rRNA 遺伝子領域を増幅する。DNA 抽出キットなどを使用せず、適等量のコロニーを TE buffer や精製水に懸濁し、95°C に 10 分加熱する簡便な方法でも PCR 用の鋳型 DNA として使用できる。特に検体数が多い場合は、この簡便な検体調製でコストと時間が節約できる。

この PCR はインフルエンザ菌だけではなく、広い細菌種の 16S rRNA 遺伝子が増幅されるので、鋳型 DNA に試験菌以外の DNA が混入しないように注意する。

#### 16S rRNA 遺伝子分析用プライマーセット

	プライマー	配列 (5'→3')	bp
A	10F	GTTTGATCCTGGCTCA-	790
	800R	TACCAGGGTATCTAATCC	
B	525F	GTGCCAGCAGCCGCGGTA	525
	1050R	CACGAGCTGACGAC	
C	800F	GGATTAGATACCTGGTA	700
	1500R	TACCTTGTTACGACTT	

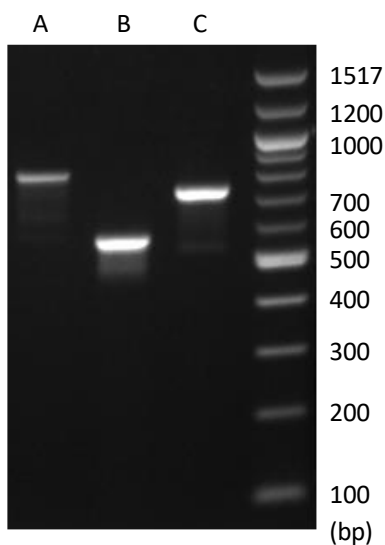
(日本薬局方にはプライマーセット B は記載されていない)

#### PCR 反応条件

Premix EX Taq HS	10 μL	98 °C	10 sec	} 30 cycles
10 μM forward primer	2 μL	98 °C	10 sec	
10 μM reverse primer	2 μL	55 °C	30 sec	
Template DNA	1~2 μL	72 °C	1min	
注射用滅菌水	4~5 μL	4 °C		
合計	20 μL			

## 電気泳動分析とシーケンシング

PCR 産物の 3~5 $\mu$ L を 2%アガロースゲルで泳動し分析し、産物のサイズを確認する(写真)。PCR 産物はゲルのバンド切り出しによる精製、カラム精製、Exo SAP-IT 処理(Thermo Fisher) など適宜必要な処理を行い、シーケンシングのための鋳型 DNA として使用する。この鋳型 DNA を、上記の PCR に使用したものと同一プライマー(1 $\mu$ M)でシーケンシングする。



## シーケンシング反応の例

Template DNA	1 $\mu$ L			
BigDye terminator ver.3.1	1 $\mu$ L	96 °C	1 min	
BigDye terminate x2.5 Buffer	3 $\mu$ L	96 °C	10 sec	} 25 cycles
1 $\mu$ M primer	1.6 $\mu$ L	50 °C	5 sec	
注射用滅菌水	3.4 $\mu$ L	60 °C	4 min	
合計	10 $\mu$ L	4 °C		

反応液は精製後、DNA シーケンサーで分析する。得られた塩基配列で GenBank などのデータベース検索を行い、配列がインフルエンザ菌の 16S rRNA 遺伝子の登録データと一致するかを調べる。

#### 4-6. MALDI-TOF MS による鑑別

Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) を用いて菌体のプロテオームを解析し、その結果から菌株を同定する手法である(9、10)。直接コロニーから同定出来るので、従来よりも約 1 日早く病原菌種名を知ることが可能である。一般細菌では、同定率 90%超であるが 100%ではない。その理由としては、1.データベースのデータ量が不十分、2.適切な前処理の必要性、3.遺伝子レベルで近縁種の区別が困難、が挙げられる(11)。また、使用機種や同定用ソフトウェア・データベースのバージョンにより、同定精度が左右されることにも留意が必要である。

インフルエンザ菌については、サンプルプレートに菌体を塗抹、飽和マトリックス溶液( $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid matrix、HCCA)を乗せる直接塗抹法でターゲットを調整し、Bruker Biotyper システム(Bruker Daltonics)を用いて同定可能であるが、*H. haemolyticus* との誤同定が報告されており注意を要する(12)。

近年、研究用として血液培養から直接同定するための前処理用に Sepsityper キット(Bruker Daltonics)と Vitek MS 血液培養キット(bioMérieux)が販売されている(13)。

#### 5. 莢膜型別

インフルエンザ菌の莢膜には、a、b、c、d、e、f の 6 種の型があり、スライド凝集法と PCR 法により型別が可能である。型別の陽性対照として使用するインフルエンザ菌の標準株を下に示した。

莢膜型	ATCC 番号*	GCMR 番号**
a	ATCC9327	IID983
b	ATCC9334	IID984
c	ATCC9007	IID985
d	ATCC9332	IID986
e	ATCC8142	IID987
f	ATCC9833	IID988
NT	ATCC33391	IID989

\* American Type Culture Collection(ATCC)

\*\* 岐阜大学微生物遺伝資源保存センター(GCMR)

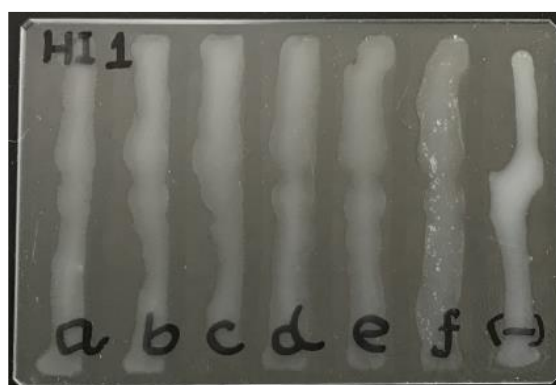
## 5-1. スライド凝集法

用意するもの

- ・ インフルエンザ菌莢膜型別用免疫血清「生研」(デンカ生研)
- ・ スライドグラス (Micro Slide Glass、S9213、松波硝子工業)
- ・ ホワイトマーカー (スーパーパップペンリキッドブロッカー など、大道産業)
- ・ 黒色アクリル板 (判定時あると便利)

操作手順

- 1) 検体をチョコレート寒天培地に接種し、37°Cで一夜(18~24 時間)培養する。
- 2) マッチ棒の頭 3~5 倍程度の菌体を掻き取り、0.5 mL の生理食塩水に加え懸濁し菌液試料とする。
- 3) ペンでスライドグラスを 7 区画に分け、血清を 1 滴(約 30  $\mu$ L)滴加する。試料が自己凝集を起こしていないことを確認するために、1 区画には対照として血清の代わりに生理食塩水を 30  $\mu$ L 滴加する。
- 4) 菌液試料を 5~10  $\mu$ L ずつおき、白金耳などで各々よく混和する。スライドグラスを前後に傾斜させながら 1 分間反応させて凝集の有無を観察する(写真)。
- 5) a~f 型の抗血清ならびに生理食塩水のいずれにも菌凝集が見られない株は、NTHi (無莢膜株) の可能性が高い。
- 6) 凝集した場合は、凝集塊のバックが透明になるので判別が容易である。



f型と判定した例

## 5-2. PCR 法

インフルエンザ菌をチョコレート寒天培地に植菌し、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで一晩培養する。コロニーを適等量集めて QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)などを用いて DNA を抽出する。抽出した DNA を鋳型にして PCR を行う。

鋳型 DNA の調製は、適等量のコロニーを TE buffer や精製水に懸濁し、95°C に 10 分加熱するような簡便な方法でも行えるので、このようにして迅速に PCR 法を実施してもよい。

莢膜型特異的プライマーを以下に示す。

莢膜型	プライマー	配列 (5'→3')	bp
a	a1	CTACTCATTGCAGCATTTGC	250
	a2	GAATATGACCTGATCTTCTG	
b	b1	GCGAAAGTGAACCTTATCTCTC	480
	b2	GCTTACGCTTCTATCTCGGTGAA	
c	c1	TCTGTGTAGATGATGGTTCA	250
	c2	CAGAGGCAAGCTATTAGTGA	
d	d1	TGATGACCGATACAACCTGT	150
	d2	TCCACTCTTCAAACCATTCT	
e	e1b	CTTTGGTAACGAATGTAGTGGTAG	1350
	e2b	AATGTTGTTATACATAGCTTTACTGTATAAGTCTAG	
f	f1	GCTACTATCAAGTCCAAATC	450
	f2	CGCAATTATGGAAGAAAGCT	

\*Fulla TJ et al.の文献(14)にあるプライマー配列を利用しているが、e 型のみ配列を一部変更している。

注)e 型菌は 2 種類の抗原成分、すなわち e1 と e2 を保有している。少数ながら e2 しかもたない株もある(5)。

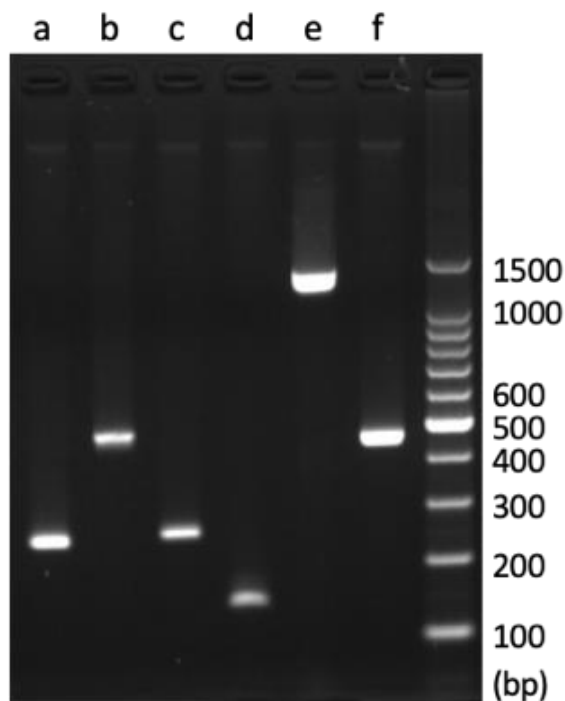
### PCR 反応

Premix EX Taq HS	10 μL	98 °C	10 sec	} 30cycles
10 μM forward primer	2 μL	98 °C	10 sec	
10 μM reverse primer	2 μL	55 °C	30 sec	
Template DNA	2 μL	72 °C	2 min	
注射用滅菌水	4 μL	72 °C	2 min	
合計	20 μL	4 °C		

## 電気泳動

2%アガロースゲル(1xTBE)でPCR産物の約5 $\mu$ Lを泳動。

陽性対照菌では、莢膜型によって a 型: 250 bp、b 型: 480 bp、c 型: 250 bp、d 型: 150 bp、e 型: 1350 bp、f 型: 450 bp のサイズのバンドが検出される(写真)。



\*リアルタイム PCR を用いた莢膜型別については、Maaroufi Y. et al.の方法(15)を参照。

### 5-3. 莢膜関連遺伝子 *bexA*、*bexB* の PCR

無莢膜株では、膜合成に関与する *bexA* または *bexB* 遺伝子が欠損している場合があり、これらの遺伝子を検出することで無莢膜型であるか否かを判定することができる。

莢膜関連遺伝子 *bexA*、*bexB* の PCR 用プライマーを下記に示す(16)。

遺伝子	プライマー	配列 (5'→3')	bp
<i>bexA</i>	HI-1	CGTTTGTATGATGTTGATCCAGAC	343
	HI-2	TGTCCATGTCTTCAAATGATG	
<i>bexB</i>	<i>bexB</i> .1F	GGTGATTAACGCGTTGCTTATGCG	567
	<i>bexB</i> .1R	TTGTGCCTGTGCTGGAAGGTTATG	
<i>pepN</i>	<i>pepN</i> _F	GATGGTCGCCATTGGGTGG	918
	<i>pepN</i> _R	GATCTGCGGTTGGCGGTGTGG	

\* *pepN* 遺伝子はインフルエンザ菌共通の遺伝子

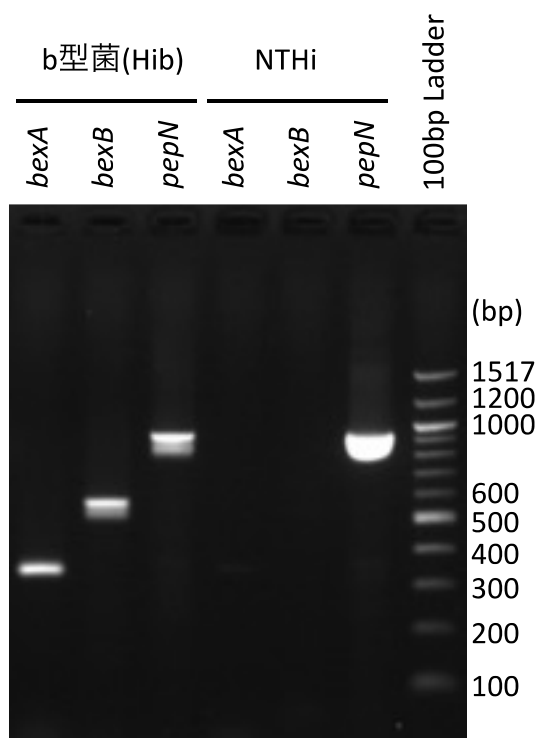


### PCR 反応

Premix EX Taq HS	10 $\mu$ L	98 $^{\circ}$ C	10 sec	} 30cycles
10 $\mu$ M forward primer	1 $\mu$ L	98 $^{\circ}$ C	10 sec	
10 $\mu$ M reverse primer	1 $\mu$ L	55 $^{\circ}$ C	30 sec	
Template DNA	1~2 $\mu$ L	72 $^{\circ}$ C	1 min	
注射用滅菌水	6~7 $\mu$ L	72 $^{\circ}$ C	2 min	
合計	20 $\mu$ L	4 $^{\circ}$ C		

### 電気泳動

2%アガロースゲル(1XTBE)で PCR 産物の約 5 $\mu$ L を泳動する。  
 莢膜を有する菌 (b 型菌) では、*bexA* (343bp)、*bexB* (567bp) が検出される。一方、無莢膜株 (NTHi) では、*bexA*、*bexB* は検出されない(写真)。*pepN* 遺伝子は両方の型で検出される。  
*pepN* はまれに検出されない場合もある。



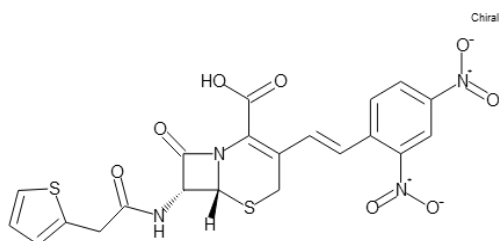
## 6. 薬剤感受性

病原細菌の薬剤耐性動向を把握することは疫学調査上重要である。インフルエンザ菌の薬剤感受性試験は、次のような方法で実施する。

### 6-1. $\beta$ -lactamase

セフィナーゼディスクを用いて  $\beta$ -lactamase の有無を調べる(17)。

原理:  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌であればニトロセフィン(セファロスポリンに色素を結合させた人工基質)を加水分解して赤色に呈色する。



ニトロセフィン

- 操作: 1) 滅菌ピンセットを使用し、シャーレ上に必要な数だけセフィナーゼディスクを置く。  
2) 滅菌水 1~2 滴をセフィナーゼディスクに滴下して湿らせる。  
3) 滅菌した白金耳を使用して、分離されたコロニーをディスク表面に塗りつける。  
4) ディスクの色の変化を観察する。

※ 陽性対照株は *S. aureus* ATCC29213、陰性対照株は *H. influenzae* ATCC10211 を用いる。

結果: 陽性は菌を接種した箇所が赤色に変化する(右)。陰性はディスクの色に変化なし(左)。



### 6-2. E-test

用意するもの

- ・ ヘモフィルステスト寒天培地 (HTM agar, BD) (18)
- ・ 滅菌生理食塩水
- ・ McFarland Standard 0.5 及び 1
- ・ 滅菌綿棒

- Quality control 株: *H. influenzae* ATCC 49247 ( $\beta$ -lactamase non-producing ampicillin-resistant[BLNAR])、*H. influenzae* ATCC 49766

#### HTM agarの作製(19)

MH-II broth medium (cation adjusted)	22 g
Yeast extract (BBL)	5 g
Hematin stock solution <sup>1)</sup>	30 mL
Agar	15 g
DW	1000 mL
↓ Autoclave	
↓ Cool completely	
NAD stock solution <sup>2)</sup>	3 mL

↓

Plating (25mL/plate ea)

<sup>1)</sup> Hematin stock solution: Hematin 50mg/100ml of 0.01MNaOH (−30°C保存)

<sup>2)</sup> NAD stock solution: NAD 50mg/10mL DW、0.22 or 0.45 $\mu$ m filtration (−30°C保存)

#### 菌液の調製

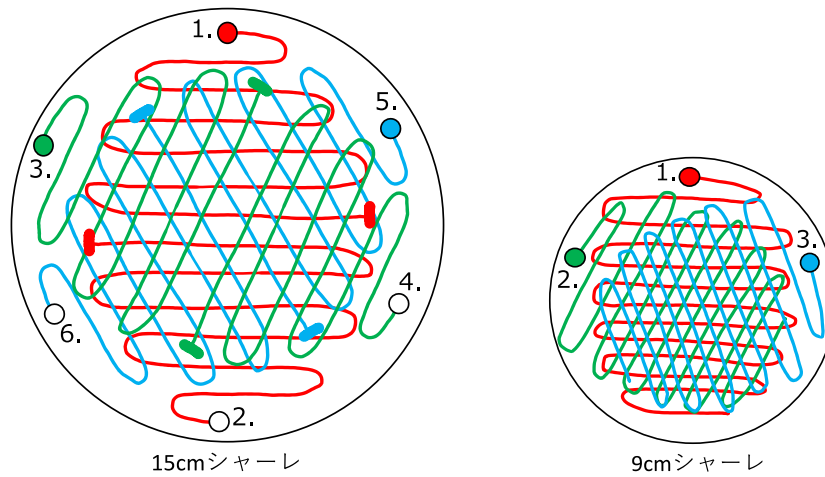
チョコレート寒天培地で一晚培養後、よく分離されたコロニーを採取。生理食塩水 1~2ml で濁度を 0.5 McFarland に調整。栄養要求の厳しいヘモフィルス属菌は、15 分以内に菌液調製と接種を終えるようにする。

#### 菌液の接種(シャーレへの塗布)

滅菌綿棒等を菌液に浸し、試験管の内壁に押し付けて過剰な水分を除去する。注意深く、培地表面全体にシャーレを 60 度ずつ回転させながら、隙間を開けず塗布する。

15 cm シャーレ(図左)の場合、1、2、3、4、5、6 の順に塗布する。1、3、5 のみ綿棒に菌液を浸し、シャーレの半分まで塗布したらシャーレを 180 度回転しそのままの綿棒で塗布を続ける。

9 cm シャーレの場合(図右)は、1、2、3 の順に隙間を開けず菌液を付けた綿棒で最後まで塗布する。E-test ストリップを配置する前に、培地表面は乾いた状態にしておく。

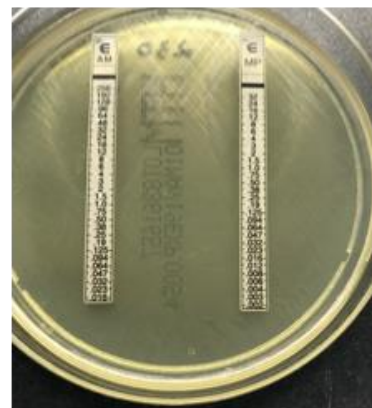
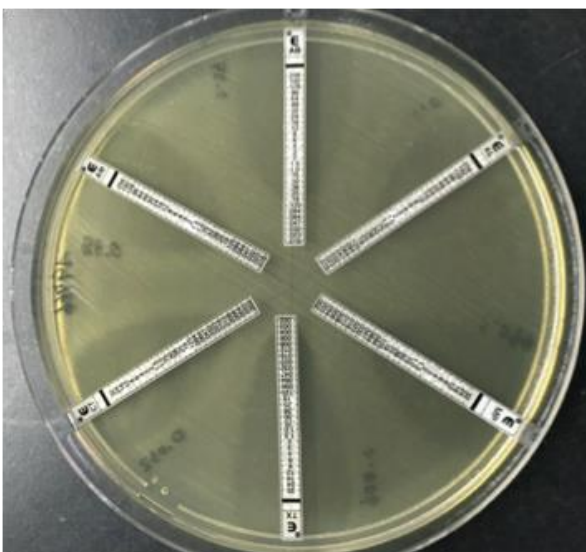


### 薬剤の配置

ピンセット等を用いて、MIC 値の目盛が表示されている部分が表側になるように等間隔に配置する。一度置いたら動かさない。3～6本のストリップを配置する場合は150mmシャーレを使用し、1～2本のストリップを配置する場合は90mmシャーレを使用する。ストリップと培地表面に隙間のないように配置し、隙間ができた場合には上からストリップを軽く押す(写真)。

通常の薬剤感受性試験には以下の6薬剤を使用している。

- Ampicillin (ABPC)
- Ampicillin-sulbactam (ABPC/SBT)
- Piperacillin (PIPC)
- Meropenem (MEPM)
- Cefotaxime (CTX)
- Ceftriaxone (CTRX)



### 6-3. ディスク拡散法

薬剤を染み込ませたディスクを HTM 寒天平板上に乗せて培養し、発育阻止円の大きさから感受性を判定する方法で、以下のように市販のものがある。

- BD センシ・ディスク™ 薬剤感受性試験(一般細菌用) (Becton Dickinson)

<https://www.bdj.co.jp/micro/products/1f3pro000009us3w.html>

- KB ディスク(栄研)

[https://www.eiken.co.jp/products\\_technique/clinical/microbiology/kanjusei.html](https://www.eiken.co.jp/products_technique/clinical/microbiology/kanjusei.html)

### 6-4. 微量液体希釈法

液体希釈法のうち、マイクロプレートを用いて少ない液量で実施するのが微量液体希釈法である(19)。

#### CLSI-M07-ED11 記載の方法

用意するもの

- 滅菌生理食塩水
- 滅菌綿棒
- ヘモフィルステストブロス(HTM broth)
- McFarland Standard 0.5
- Quality control 株: *H. influenzae* ATCC 49247 ( $\beta$ -lactamase non-producing ampicillin-resistant[BLNAR])、*H. influenzae* ATCC 49766

#### HTM brothの作製

MH-II broth medium (cation adjusted)	22g
Yeast extract (BBL)	5g
Hematin stock solution <sup>1)</sup>	30mL
DW	1000mL
↓ autoclave	
↓ cool completely	
NAD stock solution <sup>2)</sup>	3mL

<sup>1)</sup> Hematin stock solution: Hematin 50mg/100ml of 0.01MNaOH (−30℃保存)

<sup>2)</sup> NAD stock solution: NAD 50mg/10mL DW、0.22 or 0.45 $\mu$ m filtration (−30℃保存)

1. チョコレート寒天培地上の新鮮コロニーを釣菌し、生理食塩水で 0.5 McFarland (*H. influenzae* 菌濃度  $1\sim 4\times 10^8$  CFU/mL) に調整する。
2. 菌液を、生理食塩水またはブロスで 1:20 の割合<sup>\*)</sup>となるように希釈する。
3. あらかじめ抗菌薬および HTM ブロス 100  $\mu$ L が分注された 96 穴マイクロプレートに、2. の希釈菌液を 10  $\mu$ L/穴添加する。

<sup>\*)</sup> 最終菌濃度  $2\sim 8\times 10^5$  CFU/mL となるように適宜希釈倍率を調整する。

ドライプレートを用いた方法（栄研化学の添付手順書に準ずる）

用意するもの

- ・ 滅菌生理食塩水
- ・ 滅菌綿棒
- ・ ヘモフィルステスト用菌濁度液 H‘栄研’
- ・ ミュラーヒントンブイヨン‘栄研’
- ・ ストレプト・ヘモサプリメント‘栄研’ (5.5 mL の滅菌 DW を加え、溶かしておく)
- ・ ドライプレート‘栄研’ (9DDP44、9DDPD 等) Quality control 株: *H. influenzae* ATCC 49247 ( $\beta$ -lactamase non-producing ampicillin-resistant [BLNAR])、*H. influenzae* ATCC 49766

1. チョコレート寒天培地上の新鮮コロニーを釣菌し、生理食塩水でヘモフィルステスト用菌濁度液 H と同じ濁度に調整する。(1×10<sup>8</sup> CFU/mL 程度)
2. ミュラーヒントンブイヨン 12 mL にストレプト・ヘモサプリメント溶解液 1 mL を添加する。
3. 2. に菌液 25  $\mu$ L を添加、混合し、接種用菌液とする。
4. ドライプレートに接種用菌液を 100 $\mu$ L/穴接種する。(最終菌濃度 2×10<sup>5</sup> CFU/mL 程度)

培養と判定

1. プレートを好気条件にて 35±2°C で 20～24 時間培養する。
2. 各ウェルの菌発育の有無を観察し、MIC 値(ブレイクポイント、 $\mu$ g/mL)を求める。
3. CLSI-M100-ED31:2021 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 31st Edition Table2E を参照にして MIC 値から S(感受性)、I(中間型)、R(耐性)を判定する(20)。

定期的に Quality control 株(ATCC49247、ATCC49766)の測定を実施し、MIC 値が既定の範囲内であることを確認する。

\*ブレイクポイント (BP) は抗菌薬の臨床的有効性を推定するための一指標である。本邦では、米国 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のブレイクポイントが引用されることが多いが、欧州の The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) あるいは日本化学療法学会も独自のブレイクポイントを発表している。3つのブレイクポイントは微妙に異なっているが、この差異は BP 自体の限界を示しているものである。

## 7. Multi locus sequencing typing (MLST) による菌株の分類

7 つのハウスキーピング遺伝子座について塩基配列を決定し、菌株ごとの違いを調べる方法である。分析した塩基配列を PubMLST データベース (<https://pubmlst.org>) に照合することで、各遺伝子の allele 型が決まり、その組み合わせで解析株の ST (sequence type) が決まる。この情報が分離菌の由来を知ることや疫学調査の手がかりとなる(21)。解析した塩基配列がデータベースに登録されている配列に一致しない、あるいは allele 型の組み合わせが既報の ST と一致しない場合は、新しい型として登録する必要がある。

下表に MLST 分析に使用されている 7 個のハウスキーピング遺伝子領域と、それを PCR 増幅するためのプライマーセットの配列を示す。

Primer	配列 (5'→3')	遺伝子	bp
adk-up	GGTGCACCGGGTGCAGGTAA	Adenylate kinase	477
adk-dn	CCTAAGATTTTATCTAACTC		
atpG-up	ATGGCAGGTGCAAAAGAGAT	ATP synthase F1 subunit gamma	447
atpG-dn	TTGTACAACAGGCTTTTGCG		
frdB-up	CTTATCGTTGGTCTTGCCGT	Fumarate reductase iron-sulfur protein	489
frdB-dn	TTGGCACTTTCCACTTTTCC		
fucK-up	ACCACTTTCGGCGTGGATGG	Fuculokinase	345
fucK-dn	AAGATTTCCAGGTGCCAGA		
mdh-up	TCATTGTATGATATTGCCCC	Malate dehydrogenase	405
mdh-dn	ACTTCTGTACCTGCATTTTG		
pgi-up	GGTGAAAAAATCAATCGTAC	Glucose-6-phosphate isomerase	468
pgi-dn	ATTGAAAGACCAATAGCTGA		
recA-up	ATGGCAACTCAAGAAGAAAA	RecA protein	426
recA-dn	TTACCAAACATCACGCCTAT		

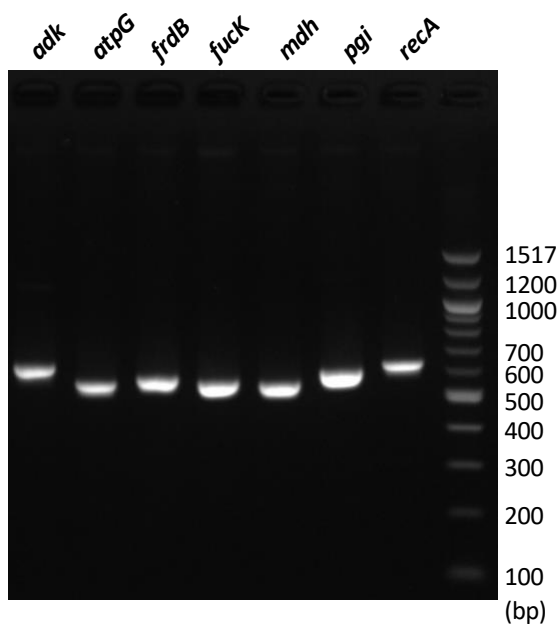
上記7組のプライマーセットを使用し、分析する菌株の遺伝子を下記のような条件で PCR 増幅する。

## PCR 反応

Premix EX Taq HS	15 $\mu$ L	98°C	10 sec	} 30cycles
10 $\mu$ M up primer	1.5 $\mu$ L	98°C	10 sec	
10 $\mu$ M dn primer	1.5 $\mu$ L	55°C	30 sec	
Template DNA	1 $\mu$ L	72°C	1 min	
注射用滅菌水	11 $\mu$ L	72°C	2 min	
合計	30 $\mu$ L	4°C		

## 電気泳動とシーケンシング

2%アガロースゲルでそれぞれの PCR 産物を泳動し、増幅されているサイズ (bp) が理論値と合っているか確認する(写真)。PCR 産物はゲルからの切り出し抽出、またはカラムによる精製等を行った後、PCR に使用したのと同じプライマー (1 $\mu$ M) で DNA 塩基配列を決定する。



決定したそれぞれの遺伝子配列を、PubMLST データベースの ”*Haemophilus influenzae* typing” ([https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst\\_hinfluenzae\\_seqdef](https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_hinfluenzae_seqdef)) で分析し、ST を決定する。ひとつひとつの配列を用いる時は ”Single Sequence”、7 遺伝子をマルチ fasta 形式にまとめている時は ”Batch Sequences” を用いて分析するとよい。次世代シーケンサーで得られた全ゲノム配列 (fasta またはマルチ fasta) にも対応している。



## 参考文献

- 1 侵襲性インフルエンザ菌感染症. 病原微生物検出情報 (IASR) Vol.34, No.7, 2013.7, p9: 2013年7月号. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/ihd-m/ihd-iasrtpc/3719-tpc401-j.html>
- 2 届出基準 <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-05-44.html>
- 3 Suga S. et al. Vaccine, 2018 Sep 11;36(38):5678-5684. A nationwide population-based surveillance of invasive *Haemophilus influenzae* diseases in children after the introduction of the *Haemophilus influenzae* type b vaccine in Japan.
- 4 小児侵襲性インフルエンザ菌感染症患者より分離された本邦初の a 型インフルエンザ菌—東京都 (IASR) Vol. 42 p65-66: 2021年3月号  
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/ihd-m/ihd-iasrd/10246-493d02.html>
- 5 戸田細菌学 改定34版 南山堂 III.細菌学各論、8.ヘモフィルスとパスツレラ p295
- 6 藏前 仁・松井奈津子・犬飼ともみ・中村友紀・川口公平・中村清忠. 「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」日本臨床微生物学雑誌 Vol. 28 No. 2 2018.
- 7 小栗豊子「*Haemophilus* 属が血液寒天培地に発育困難である理由」臨床検査 vol. 39 no.12 1995 11.
- 8 Sasaki T. et al. Evaluation of a new method for identification of bacteria based on sequence homology of 16S rRNA gene. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 51, 242-247, 1997.
- 9 Chen JHK. et al. J Clin Microbiol. 2017, Sep;55(9):2679-2685. Rapid Differentiation of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with ClinProTools Mass Spectrum Analysis.
- 10 Zhu B. et al. PLoS One. 2013;8(2) :e56139. doi: 10.1371/journal.pone.0056139. Epub 2013 Feb 14. MALDI-TOF MS distinctly differentiates nontypable *Haemophilus influenzae* from *Haemophilus haemolyticus*.
- 11 野村文夫. 総説 プロテオーム解析を用いた臨床微生物検査, Proteome Letters 2018;3:1-13.
- 12 Chen JHK, Cheng VCC, Wong CP, Wong SCY, Yam WC, Yuen KY. Rapid Differentiation of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry with ClinProTools Mass Spectrum Analysis. J Clin Microbiol. 2017 Sep;55(9):2679-2685.
- 13 Faron M. et al. J Clin Microbiol. 2017; 55:3328–3338. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for use with positive blood cultures: Methodology, performance, and optimization.
- 14 Falla TJ. et al. J Clin Microbiol. 1994 Oct;32(10):2382-6. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*.
- 15 Maaroufi Y. et al. J Clin Microbiol 45:2305–2308, 2007. Real-Time PCR for determining capsular serotypes of *Haemophilus influenzae*.
- 16 Davis GS. et al., J. Clin. Microbiol. (2011) vol.49, p2594-2601. Use of *bexB* to detect the

Calpsule Locus in *Haemophilus influenzae*

- 17 日本 BD セフィナーゼテスト <https://www.bdj.co.jp/micro/products/1f3pro00000b0xfb.html>,
- 18 ヘモフィルステスト寒天培地 (Haemophilus Test Medium Agar, HTM agar, BD)  
[https://www.bdj.co.jp/micro/products/1f3pro00000rxh7f.html#block\\_top1](https://www.bdj.co.jp/micro/products/1f3pro00000rxh7f.html#block_top1)
- 19 CLSI M07-A10, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacterial That Grow Aerobically; Approved Standard -Tenth Edition p19, 27, -32
- 20 CLSI-M100-ED31:2021 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 31st Edition-Table2E [各種薬剤の MIC 値(break point,µg/mL)]  
<http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED31:2021&sbssok=CLSI%20M100%20ED31:2021%20TABLE%20E&format=HTML&hl=Haemophilus%20influenzae>
- 21 Meats E. et al. J Clin Microbiol, 2003 Apr;41(4):1623-36. Characterization of encapsulated and noncapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing.

執筆者

東京都健康安全研究センター  
内谷 友美

神奈川県衛生研究所  
陳内 理生

大阪健康安全基盤研究所  
河原 隆二

国立感染症研究所 細菌第二部  
久保田 眞由美  
佐々木 裕子  
見理 剛