

急性咽頭・扁桃炎における *Haemophilus haemolyticus* の検討

河野正充 保富宗城 藤原啓次 山中昇
和歌山県立医科大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科

A Role of *Haemophilus Haemolyticus* in Acute Pharyngotonsillitis.

Masamitsu KONO, Muneki HOTOMI, Keiji FUJIHARA, Noboru YAMANAKA

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Wakayama Medical University, Wakayama, Japan

Haemophilus haemolyticus (*H. haemolyticus*), is the closest relative of *H. influenzae* and considered to be a pharyngeal commensal. Clinical strains of *Haemophilus* spp. isolated from adult acute pharyngo-tonsillitis patients were evaluated for identifying *H. haemolyticus* from *H. influenzae*. *H. influenzae* and non-hemolytic *H. haemolyticus* were originally defined by typical colony morphology on chocolate agar, X and V growth factor dependency, and no reaction in the porphyrin test. Hemolysis was assessed as zones of β -hemolysis surrounding individual colonies grown on horse blood agar to differentiate hemolytic *H. haemolyticus*. The polymerase chain reaction (PCR) primers were designed for 16S rDNA and IgA protease gene (*iga*) to distinguish *H. haemolyticus* from *H. influenzae*. There were less clones identified in *H. hemolyticus*. And to evaluate the involvement of *H. haemolyticus* into acute pharyngotonsillitis, the levels of C-reacting protein (CRP) of patients were compared depend on the culture results for *H. influenzae* or *H. haemolyticus*.

H. haemolyticus is considered to be a pharyngeal commensal. It is important to distinguish the microorganism from causative pathogens. However, the standard methods can not reliably distinguish *H. haemolyticus* from *H. influenzae*. The recognition that some strains of apparent *H. influenzae* are *H. haemolyticus* is essential to understand association of true *H. influenzae* with respiratory tract infections.

はじめに

急性咽頭・扁桃炎において細菌感染は重要な要因のひとつである。 *Haemophilus influenzae* はヒトの咽頭粘膜に無症候性に存在する病原体であるが、時として上・下気道感染症の起炎菌にもなりうる。 *Haemophilus haemolyticus* はインフルエンザ菌と系統的に密接な関係にあり、健常な成人の咽頭からも検出される^{1), 2)}。近年 *H.influenzae* として分離されているものの中に、 *H.haemolyticus* が含まれているという報告が散見される^{1), 3)}。 *H.influenzae* と *H. haemolyticus* を区別することは気道感染症における両菌株の病原性を明確にする上で、非常に重要である。今回、当科では急性咽頭・扁桃炎患者より分離された *Haemophilus species* を PCR 法にて *H.influenzae* と *H. haemolyticus* を分類し、それぞれの薬剤感受性と病的意義を評価した。

方 法

対 象

急性咽頭・扁桃炎の診断は咽頭痛、発熱、口蓋扁桃や咽頭粘膜の発赤を認めるものとした。15～80歳の急性咽頭・扁桃炎患者214人の扁桃陰窩より採取された検体をヒツジ血清寒天培地、チョコレート寒天培地、MacConkey寒天培地にて培養した。*H.influenzae*, *H.influenzae iga variant*, *H. haemolyticus* の non hemolytic *H.haemolyticus* の確認はコロニーの形態、X, V growth factor 依存性、ポルフィリンテスト、ウマ血清寒天培地の溶血および PCR 法にて行った。PCR 法は 16S rDNA (16S Pro, 16S Nor), IgA protease gene (*iga gene*) の3種類のプライマーを用いた (fig.1)。薬剤感受性検査は microbroth dilution method にて levofloxacin (LVFX), cefcapen (CFPN), cefditoren (CDTR), clarithromycin (CAM), ampicillin (AMPC) の5種類の抗菌薬の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。病的意義の評価として *H.influenzae* および *H. haemolyticus* が検出された咽頭・扁桃炎患者の CRP を比較した。

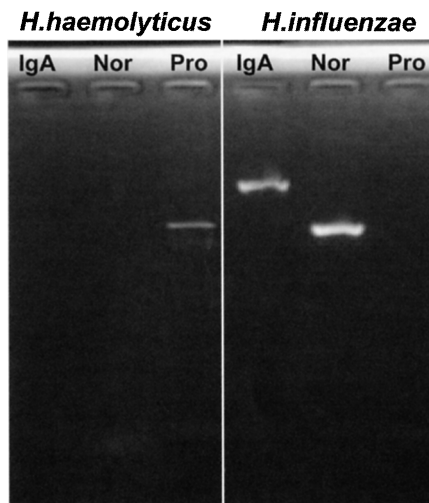


Fig.1 PCR primers were used to amplify 16S ribosomal DNA (rDNA) and IgA protease gene (*iga*) to distinguish *H. haemolyticus* and *H. influenzae*. The nucleotide sequence of the forward primers for the 16S rDNA was 16S-F: 5'-CTCAGATTGAACGCTGGCGGC-3' and the sequences for the reverse primers were 16S-Nor: 5'-TGACATCCTAAGAAGAGC-3' for *H. influenzae* and 16S-Pro: 5'-TGACATCCAT/GG/AGG/AAT/CT/CT/CT/A-3' for *H. haemolyticus*.

結 果

分離頻度

214例の咽頭・扁桃炎患者のうち、23例(10.7%)より *H.haemolyticus*, 52例(約24.3%)より *H.influenzae* が検出された。 *H.influenzae iga variant* および non hemolytic *H.haemolyticus*, 他の *Haemophilus* は検出されなかった。

薬剤感受性

検出された *H.influenzae* の MIC50 (μg/ml) および MIC90 (μg/ml) はそれぞれ LVFX: 0.06 μg/ml 以下および 0.06 μg/ml 以下, CFPN: 0.06 μg/ml 以下および 0.5 μg/ml, CDTR: 0.06 μg/ml 以下および 0.25 μg/ml, CAM: 8 μg/ml および 16 μg/ml, AMPC: 0.25 μg/ml および 8 μg/ml であった (fig.2)。 検出された *H.haemolyticus* の MIC50 (μg/ml) および MIC90 (μg/ml) はそれぞれ LVFX: 0.06 μg/ml 以下および 0.06 μg/ml 以下, CFPN: 0.06 μg/ml 以下および 0.06 μg/ml 以下, CDTR: 0.06 μg/ml 以下および 0.06 μg/ml 以下, CAM: 8 μg/ml および 16 μg/ml, AMPC: 0.12 μg/ml

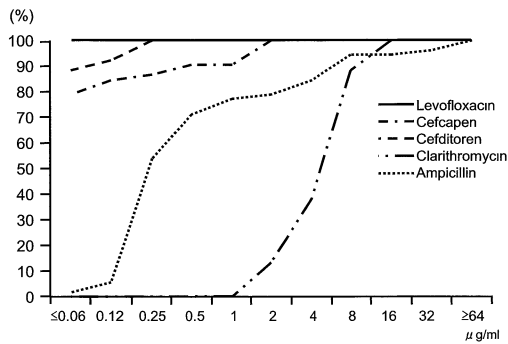


Fig.2 Antimicrobial susceptibilities of *H. influenzae*
The minimal inhibitory concentrations (MICs) of 5 antimicrobial agents to *H. influenzae* were evaluated by microbroth dilution methods. The range of MIC, MIC₅₀ and MIC₉₀ to *H. influenzae* were ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$, ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ and ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ for levofloxacin (LVFX), ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ - 0.25 $\mu\text{g/ml}$, ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ and 0.125 $\mu\text{g/ml}$ for cefcapen (CFPN), ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ - 2 $\mu\text{g/ml}$, ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ for cefditoren (CDTR), 2 $\mu\text{g/ml}$ - 16 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$ and 16 $\mu\text{g/ml}$ for clarithromycin (CAM), ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ - >64 $\mu\text{g/ml}$, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ and 8 $\mu\text{g/ml}$ for amoxicillin (AMX), and ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ - >64 $\mu\text{g/ml}$, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ and 4 $\mu\text{g/ml}$ for ampicillin (AMPC).

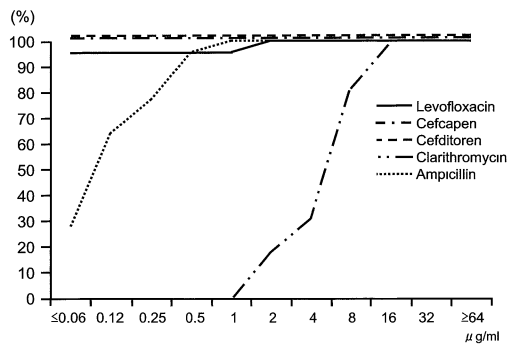


Fig.3 Antimicrobial susceptibilities of *H. haemolyticus*
The minimal inhibitory concentrations (MICs) of 5 antimicrobial agents to *H. haemolyticus* were evaluated by microbroth dilution methods. The range of MIC, MIC₅₀ and MIC₉₀ to *H. haemolyticus* were ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ - 2 $\mu\text{g/ml}$, ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ and ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ for LVFX, ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$, ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ and ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ for CFPN, ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$, ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ and ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ for CDTR, 2 $\mu\text{g/ml}$ - 16 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$ and 16 $\mu\text{g/ml}$ for CAM, and ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ - 1 $\mu\text{g/ml}$, 0.125 $\mu\text{g/ml}$ and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ for AMPC.

g/ml および 0.5 $\mu\text{g/ml}$ であった (fig.3).

全身炎症所見 (fig.4)

H. influenzae が検出された群では *H. haemolyticus* が検出された群と比較して CRP が 8 mg/dl 以上の例を有意に認めた。

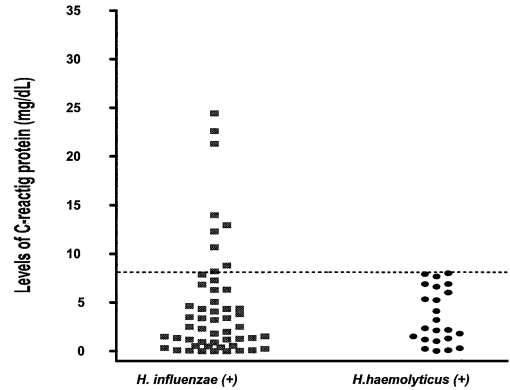


Fig.4 The mean \pm S.D. levels of CRP of patients with *H. haemolyticus* and *H. influenzae* were 3.57 ± 0.59 and 4.60 ± 0.80 , respectively. There were no differences between the mean levels of CRP between patients with *H. haemolyticus* and *H. influenzae*. There was no patient with *H. haemolyticus* showed CRP ≥ 8.0 mg/dL while 9 (17.3%) out of 52 patients with *H. influenzae* showed CRP ≥ 8.0 mg/dL. The ratio of patients showing CRP ≥ 8.0 mg/dL was significantly higher among cases with *H. influenzae* than in cases with *H. haemolyticus* ($p < 0.05$, OR 0.10, 95% CI 0.01 to 1.75).

考 察

H. haemolyticus は血液寒天培地にて溶血能を有する株として *H. influenzae* より 1919 年に初めて分類された。その後、さまざまな議論を経て β 溶血環を形成する株を *H. haemolyticus* として認識されるようになった⁴⁾。 *H. haemolyticus* は成人の咽頭からも分離される *H. influenzae* と遺伝的に非常に近い関係にある。Murphy らは慢性閉塞性肺疾患患者の喀痰より *H. influenzae* として得られた株の 40% 近くが実は *H. haemolyticus* であり、 *H. influenzae* は COPD の急性増悪に関与しているが、 *H. haemophilus* は関与しないと報告している²⁾。

今回我々は 16S rDNA および iga 遺伝子の PCR を用いて *H. haemolyticus* と *H. influenzae* を判別した。 *H. influenzae* の 90% は IgA protease を産生し iga 遺伝子陽性となるが、 *H. haemolyticus* は陰性である。 16S rDNA の配列は *H. influenzae* および *H. haemolyticus* それぞれの株に特異的な 16S Pro, 16S Nor を検索した。 両菌株の亜型として IgA protease 陰性の *H. influenzae*

iga variant, 溶血能をもたない nonhemolytic *H. haemophilus* が報告されているが, 今回はいずれの亜型も検出されなかった.

薬剤感受性を検討すると, *H. influenzae* はすでに CAM, AMPC に高度な耐性を獲得しており, CDTR, CFPN にも耐性を示す傾向がある. *H. haemolyticus* は CAM, AMPC には耐性を認めるが, CDTR, CFPN に対する感受性は良好である. LVFX は両菌株に対して感受性は良好であった. 全身炎症所見は *H. influenzae* 陽性群で高かったのに対し, *H. haemolyticus* 陽性群では有意に低く, *H. haemolyticus* の急性咽頭・扁桃炎における病的意義は低いものと思われた.

以上より, 急性咽頭・扁桃炎を含む上気道感染症において病原性を有する *H. influenzae* と常在菌的な側面が強い *H. haemolyticus* を明確に区別し, 適切に抗菌薬を使用することが重要と思われる.

参 考 文 献

- 1) McCrea, K. W., J. Xie, N. LaCross, M. Patel, D. Mukundan, T. F. Murphy, C. F. Marrs, and J. R. Gilsdorf. Relationships of nontypable

Haemophilus influenzae strains to hemolytic and nonhemolytic *Haemophilus haemolyticus* strains. J Clin Microbiol. 46 : 406-416, 2008

- 2) Murphy, T. F., A. L. Brauer, S. Sethi, M. Kilian, X. Cai, A. J. Lesse. *Haemophilus haemolyticus* : a human respiratory tract commensal to be distinguished from *Haemophilus influenzae*. J Infect Dis. 195 : 81-89, 2007
- 3) Mukundan, D., Z. Ecevit, M. Patel, C. F. Marrs, and J. R. Gilsdorf. Pharyngeal colonization dynamics of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* in healthy adult carriers. J Clin Microbiol. 45 : 3207-3217, 2007
- 4) Branson, D. Bacteriology and clinical significance of hemolytic *Haemophilus* in the throat. Appl. Microbiol. 16 : 256-259, 1968

連絡先：河野正充

〒641-0012

和歌山県和歌山市紀三寿 811-1

和歌山県立医科大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科

TEL 073-447-2300 (代表) 内線 5417