

## 血液から分離されたインフルエンザ菌の解析

今野貴之 八柳 潤 高橋志保 熊谷優子 和田恵理子 千葉真知子 齊藤志保子

インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) の一部は、小児の細菌性髄膜炎等の侵襲性感染症の起因菌として知られており、感染症の動向を把握する上で莢膜の血清型を明らかにすることは極めて重要である。平成 24 年 1 月に県内医療機関において、肺炎患者の血液からインフルエンザ菌が分離された。分離株の莢膜の血清型を検査したところ、莢膜の型の中でも比較的まれな e 型であることを確認した。また、薬剤耐性に関与する遺伝子としてペニシリナーゼ ( $bla_{TEM}$ ,  $bla_{ROB}$ ) 及びペニシリン結合タンパク質 (PBP) のアミノ酸変異の検出を PCR にて行った。分離株は  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{ROB}$  に関しては陰性であったが、 $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *H. influenzae* (BLNAR) group III に該当する PBP の変異が検出され、薬剤耐性菌と考えられた。

### 1. はじめに

インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) は、 $1 \times 0.3 \mu\text{m}$  ほどの多形性のグラム陰性桿菌で、菌体の表面に莢膜と呼ばれる構造を持つ菌と持たない菌が存在し、莢膜は血清学的に a~f の 6 型に分けられる。インフルエンザ菌は気管支炎、肺炎、中耳炎、副鼻腔炎といった市中感染症の起因菌となるが、特に b 型 (Hib) は小児の細菌性髄膜炎等の侵襲性感染症の起因菌として知られている。菌型によって重症化する場合があるため、本菌による感染症の動向を把握する上で莢膜の血清型を明らかにすることは極めて重要である。

当センターでは、平成 23 年度からインフルエンザ菌の薬剤耐性遺伝子の検出に加え、莢膜の遺伝子型別法を検討している。本報では、平成 24 年 1 月に県内医療機関から検査依頼のあった血液から分離されたインフルエンザ菌について行った莢膜型別と薬剤耐性遺伝子の解析結果について報告する。

### 2. 症例

患者：76 歳男性。

既往歴：平成 7 年から狭心症として内服治療を受け、平成 18 年 7 月には、症状増悪にて右冠動脈病変に対して Cypher stent が留置されていた。

平成 23 年 1 月に胃角部の胃癌のため腹腔鏡下幽門側胃切除術を受ける。手術自体の合併症は

なかったが、術後から経口摂取不良による栄養障害が著明となり、体重が 48 kg から 38 kg まで減少し、一般状態が低下、全身の衰弱も顕著となっていた。

現病歴：平成 23 年 11 月 22 日、咳嗽が強くなり酸素飽和度が低下、誤嚥性肺炎の診断にて入院となった。入院後ピペラシリン/タゾバクタム (PIPC/TAZ) 2.25 g, 1 日 2 回の点滴などで治療が行われ、肺炎はいったん改善した。入院中に誤嚥性肺炎を再発し、12 月 7 日からセフェピム (CFPM) 1 g, 1 日 2 回で治療が行われた。以後は中心静脈栄養で管理が行われたが、肺炎を回復し、12 月 26 日からはセフメタゾール (CMZ) 1 g, 1 日 2 回で加療されたが高熱が続いた。平成 24 年 1 月 6 日からはセフォペラゾン/スルバクタム (CPZ/SBT) 1 g, 1 日 2 回で加療されたが、臨床的な改善はなく、1 月 18 日には  $\text{CO}_2$  ナルコーシスとなり昏睡状態に至り、平成 24 年 1 月 31 日に死亡した。

### 3. 方法

#### 3.1 莢膜型別

平成 24 年 1 月 5 日の患者の静脈血培養から分離されたインフルエンザ菌 (HI-2544) について、莢膜の型別を市販の抗血清 (デンカ生研) を用いた免疫学的手法と PCR 法<sup>1)</sup> により行った。

### 3.2 薬剤感受性試験及び薬剤耐性遺伝子の検出

ピペラシリン (PIPC), セフォペラゾン/スルバクタム (CPZ/SBT), セファクロル (CCL), セフトジジム (CAZ), セフジニル (CFDN), イミペネム (IPM), レボフロキサシン (LVFX) についてディスク法により阻止円を計測した。また, アンピシリン (ABPC), セフォタキシム (CTX), メロペネム (MEPM) については E-test を用いて最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。

薬剤耐性遺伝子について, PCR 法により *bla*<sub>TEM</sub><sup>2)</sup> 及び *bla*<sub>ROB</sub><sup>3)</sup> の検出を試みた。また, penicillin binding protein (PBP) の変異を検出するため, Ubukata ら<sup>4)</sup> の報告を基に β-lactamase-negative ampicillin-resistant *H. influenzae* (BLNAR) の group I, II 及び III に特徴的なアミノ酸変異部分にプライマーを設計し, PCR を行った。

## 4. 結果

### 4.1 莢膜型別

市販抗血清を用いた血清型別において, HI-2544 は e 型の抗血清に特異的に凝集を示した。また, PCR 法を用いた遺伝子型別においても e 型に特異的なバンドが検出された (図 1)。これらの結果から, HI-2544 は *H. influenzae* e 型と判定された。



図 1 莢膜型特異的 PCR

M:100 bp ladder, a 型:250 bp, b 型:480 bp, c 型:250 bp, d 型:150 bp, e 型:1350 bp, f:450 bp.

### 4.2 薬剤感受性試験及び薬剤耐性遺伝子の検出

HI-2544 の薬剤感受性試験の結果を表 1 に示す。HI-2544 は CCL, CFDN に耐性を示し, ABPC に対する MIC が 2 µg/ml で低感受性であった。

PCR 法により薬剤耐性遺伝子を検索したところ, HI-2544 は *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>ROB</sub> に関しては両者とも陰性であったが, BLNAR group III に該当する PBP の変異が検出された (図 2b)。

表 1 薬剤感受性試験成績.

薬剤	阻止円 (mm)	判定
PIPC	27	S
CPZ/SBT	23	S
CCL	7	R
CAZ	22	S
CFDN	7	R
IPM	19	S
LVFX	27	S

薬剤	MIC (µg/ml)	判定
ABPC	2	I
CTX	2	S
MEPM	0.25	S

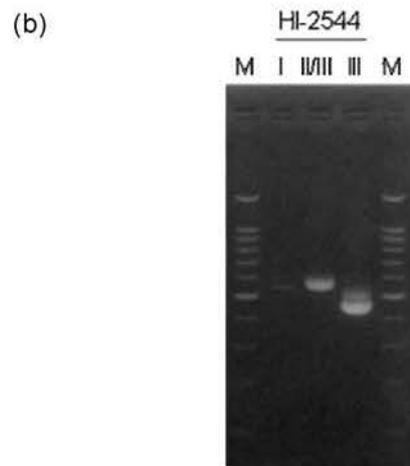
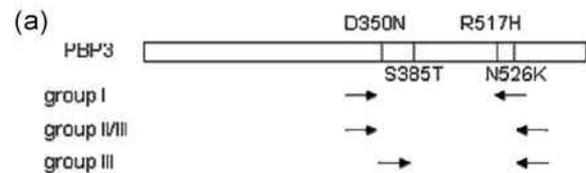


図 2 PCR for BLNAR

(a)primer 設計位置. (b) HI-2544 の BLNAR 型別. M: 100 bp ladder, I: 536 bp, II/III: 569 bp III: 459 bp

## 5. 考察

日本では、平成20年に小児向け Hib ワクチンの販売が開始された。それに伴い、小児の細菌性髄膜炎等の侵襲性感染症を引き起こす菌型が変化する可能性が指摘されている。今回、誤嚥性肺炎から菌血症に至る中で血液培養より *H. influenzae* e 型を確認した。e 型は従来から寝たきり状態の患者における髄膜炎等で分離されることが多かった<sup>5)</sup>。今回の患者も比較的高齢で、一般状態の低下した状態にあった。しかしながら、e 型もその臨床的な特徴は Hib と同様と考えられており<sup>6)</sup>、それによる侵襲性感染症には注意が必要である。今回の事例は、現在注目されているようなワクチン導入による Hib 以外の菌型の増加を示すものではないが、Hib と同様に小児の髄膜炎等の起因菌として知られる肺炎球菌ワクチンでは、導入後に接種対象年齢以外の年代にも集団免疫効果が確認されている<sup>7)</sup>。そのため、Hib ワクチン導入後の秋田県内のインフルエンザ菌感染症の発生動向を把握するためには、小児に限らずその発生を確認していくことが重要である。

また、本事例で分離された菌株は、薬剤感受性試験において ABPC に低感受性を示し、遺伝子検査においても BLNAR group III に該当する変異が検出されたことから、薬剤耐性菌と考えられた。BLNAR の場合、治療に難渋することが多いため、本菌による感染症の動向については莢膜の血清型に併せて、薬剤耐性の状況も注視していくことが必要と思われる。

## 謝辞

本報の内容の一部は、大館市立扇田病院の大本直樹先生、大館市立総合病院の高橋義博先生、太田和子技師長、三浦浩子技師、奈良昇悦技師、佐藤謙太郎技師から提供していただいた情報を基に作成致しました。深謝致します。

## 参考文献

- 1) Falla TJ, Crook DW, Brophy LN, Maskell D, Kroll JS, Moxon ER: PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*, J Clin Microbiol., **32**, 10, 1994, 2382-2386.
- 2) 今野貴之, 八柳潤, 齊藤志保子, 小沼譲, 太田和子, 高橋義博: 秋田県において初めて確認された SHV-12 型 ESBL 産生大腸菌について, 病原微生物検出情報, **31**, 7, 2010, 209-210.
- 3) Tenover FC, Huang MB, Rasheed JK, Persing DH: Development of PCR assays to detect ampicillin resistance genes in cerebrospinal fluid samples containing *Haemophilus influenzae*, J Clin Microbiol., **32**, 11, 1994, 2729-2737.
- 4) Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, Sunakawa K, Inoue M, Konno M: Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*, Antimicrob Agents Chemother., **45**, 6, 2001, 1693-1699.
- 5) Campos J, Román F, Pérez-Vázquez M, Oteo J, Aracil B, Cercenado E; Spanish Study Group for *Haemophilus influenzae* Type E: Infection due to *Haemophilus influenzae* serotype e: microbiological, clinical, and epidemiological features, Clin Infect Dis., **37**, 6, 2003, 841-5.
- 6) Cerquetti M, Ciofi degli Atti ML, Cardines R, Giufre M, Romano A, Mastrantonio P: *Haemophilus influenzae* serotype e meningitis in an infant, Clin Infect Dis., **38**, 7, 2004, 1041.
- 7) Poehling KA, Talbot TR, Griffin MR, Craig AS, Whitney CG, Zell E, Lexau CA, Thomas AR, Harrison LH, Reingold AL, Hadler JL, Farley MM, Anderson BJ, Schaffner W: Invasive pneumococcal disease among infants before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine, JAMA, **295**, 14, 1668-74.