

インフルエンザ菌の遺伝子型別法の検討と分離実態の解明（平成 23～24 年度）

## 秋田県における莢膜型インフルエンザ菌の分離状況と 薬剤耐性遺伝子の解析

今野貴之 高橋志保 熊谷優子 和田恵理子 八柳 潤

インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) のうち、特に莢膜の血清型が b 型の菌 (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。平成 20 年 12 月から国内でも Hib ワクチンの接種が可能になり、それに伴い本菌による感染症の動向が注目されている。平成 23～24 年度の調査研究事業では、遺伝子を基にした莢膜型別法（遺伝子型別法）を検討し、平成 20 年から平成 24 年の 5 年間に秋田県内の医療機関から受領したインフルエンザ菌計 666 株について莢膜の型別を実施した。その結果、検討した遺伝子型別法により 43 株の莢膜型インフルエンザ菌を確認した。また、莢膜型インフルエンザ菌について、薬剤耐性に関与する遺伝子として  $\beta$ -lactamase ( $bla_{TEM}$ ,  $bla_{ROB}$ ) 及びペニシリン結合タンパク質の遺伝子 (*ftsI*) の解析を行い、今回確認された莢膜型インフルエンザ菌の多くは、*ftsI* に変異を有する薬剤耐性菌であることを明らかにした。

### 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（莢膜型）と持たない菌（無莢膜型, non-typable: NT）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。平成 20 年 12 月からの小児向け Hib ワクチンの販売開始により、ワクチンに含まれない b 型以外による侵襲性感染症の増加が懸念されており、本菌による感染症の今後の発生動向が注目されている。しかしながら、従来の抗血清を用いた莢膜の型別は、培養条件等の影響により型別困難な場合が多いことが知られている。

平成 23 年度から 24 年度の調査研究事業において、我々は莢膜の遺伝子型別法を検討した。本報では、平成 20 年から平成 24 年の 5 年間に秋田県内の医療機関から受領したインフルエンザ菌計 666 株についての莢膜の型別結果と莢膜型インフルエンザ菌については薬剤耐性遺伝子についても解析したので、その結果を報告する。

### 2. 方法

#### 2.1 莢膜型別

供試した菌株数は平成 20 年 135 株、平成 21 年 126 株、平成 22 年 143 株、平成 23 年 109 株、平成 24 年 153 株の計 666 株であった。

莢膜の型別は、市販の抗血清を用いた免疫学的手法（従来法）と PCR 法（遺伝子型別法）<sup>1)</sup> により行った。遺伝子型別法は、まず莢膜の合成に関与する遺伝子である *bexA* を標的とした PCR により、莢膜型か無莢膜型かを判定し、莢膜型であった株について a～f 型に特異的な PCR を行った。また、PCR により莢膜型別できなかった場合は、*bexA* の相同性解析により莢膜血清型を推定した<sup>2)</sup>。

#### 2.2 薬剤耐性遺伝子の検出

PCR 法により  $\beta$ -lactamase として  $bla_{TEM}$ <sup>3)</sup> 及び  $bla_{ROB}$ <sup>4)</sup> の検出を試みた。また、ペニシリン結合タンパク質遺伝子 (*ftsI*) の変異を検出するため、Ubukata ら<sup>5)</sup> の報告を基に  $\beta$ -lactamase- negative ampicillin-resistant *H. influenzae* (BLNAR) の group I, II 及び III に対応するプライマーを設計し、PCR を行った<sup>6)</sup>。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 従来法と遺伝子型別法の比較

莢膜型別の従来法及び遺伝子型別法による結果を表 1 に示す。従来法と遺伝子型別法の結果が一致しない例は表 1 中に<sup>†</sup>で示したとおり 32 例 (4.8%)、従来法では複数の抗血清に反応するために型別不能 (UT) と判定されたが、遺伝子型別法により型別された例が表 1 中に<sup>‡</sup>で示したとおり 38 例 (5.7%) 確認された。1 株が遺伝子型別法で UT となったが、正確なインフルエンザ菌感染症の発生動向を把握する上で遺伝子型別法は非常に有用であることが示唆された。遺伝子型別法で UT であった 1 株については、*bexA* の相同性解析の結果、b 型であることが示唆された。

表 1 莢膜型別法の結果比較

		遺伝子型別法								total
		a	b	c	d	e	f	UT	NT	
従来法	a								2 <sup>†</sup>	2
	b		15						3 <sup>†</sup>	18
	c								12 <sup>†</sup>	12
	d								7 <sup>†</sup>	7
	e					11			3 <sup>†</sup>	14
	f						7		2 <sup>†</sup>	9
	UT		2 <sup>‡</sup>			5 <sup>‡</sup>			31 <sup>‡</sup>	38
	NT		2 <sup>†</sup>					1 <sup>†</sup>	563	566
	total	0	19	0	0	16	7	1	623	666

UT: 型別不能, NT: 無莢膜型

### 3.2 莢膜型インフルエンザ菌の分離状況

表 2 に遺伝子型別法により確認された莢膜型インフルエンザ菌の (イ) 診療科別及び (ロ) 検体種別の分離状況を示す。b 型 (UT 含む) は小児科領域からの分離が多く、鼻腔からの分離が目立った。一方、e 型は内科領域からの分離が多く、検体種も喀痰から多く分離されていた。f 型については、分離数は少ないが小児科領域及び内科領域どちらにおいても分離が確認され、検体種は鼻腔若しくは喀痰であった。海外では Hib ワクチンの導入後、a 型による侵襲性インフルエンザ菌感染症の増加が指摘されているが<sup>7)</sup>、秋田県において医療機関で分離される莢膜型インフルエンザ菌については b 型と同様に e 型が多い傾向が明らかになった。その多くは、

成人・高齢者と考えられるが、小児からの分離もみられ、小児の症例ではないが菌血症を伴う肺炎の事例も確認された<sup>6)</sup>。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>8)</sup>、e 型は今後注意すべき血清型と考えられる。

表 2 莢膜型インフルエンザ菌の分離状況 (イ) 診療科別

	b型	e型	f型
小児科	8	4	1
耳鼻科	3	2	3
内科	1	10	3
その他	1		
不明	7		

(ロ) 検体種別

	b型	e型	f型
鼻腔	6	3	4
眼脂	1		
咽頭	2	3	
喀痰	1	9	3
血液	1	1	
その他	2		
不明	7		

### 3.3 莢膜型インフルエンザ菌の薬剤耐性遺伝子の解析

*ftsI* の変異のうち、S385T, R517H, N526K のアミノ酸置換を引き起こす変異は特に耐性化に関与することが分かっている<sup>5)</sup>。*ftsI* 変異 I, II 及び III はそれぞれ R517H, N526K, S385T と N526K の変異を有し、変異箇所が多いほど耐性が強まる傾向がある。表 3 に莢膜型インフルエンザ菌の薬剤耐性関連遺伝子の検出状況を示す。当センターには、医療機関から薬剤耐性を疑う場合に菌株が送付されてくることが多いため、結果は必ずしも莢膜型インフルエンザ菌の薬剤耐性化の割合を示すものではないが、今回確認された莢膜型インフルエンザ菌の多くは *ftsI* に変異を持つタイプの耐性菌であり、そのほとんどが BLNAR group III に該当した。また、小児科領域の眼脂由来の b 型 1 株は更に TEM 型

の  $\beta$ -lactamase も保有していることが確認された。これら薬剤耐性菌の場合、治療に難渋することが多く、臨床上的重大な問題となる。

近年、これら薬剤耐性インフルエンザ菌による侵襲性感染症の増加が危惧されており<sup>9)</sup>、莢膜型インフルエンザ菌の薬剤耐性化の状況については今後も注視していく必要がある。

表3 薬剤耐性遺伝子の検出状況

耐性機構		b型	e型	f型
感受性	なし		1	1
耐性	$\beta$ -lactamase産生			
	<i>ftsI</i> 変異Ⅰ			
	<i>ftsI</i> 変異Ⅱ	6		1
	<i>ftsI</i> 変異Ⅲ	13	15	5
	$\beta$ -lactamase産生 <i>ftsI</i> 変異Ⅲ	1		

### 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) Zhou J, Law DK, Sill ML, Tsang RS: Nucleotide sequence diversity of the *bexA* gene in serotypeable *Haemophilus influenzae* strains recovered from invasive disease patients in Canada, J Clin Microbiol., **45**, 6, 2007, 1996-1999.
- 3) 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, Infectious Agents Surveillance Report, **31**, 7, 2010, 209-210.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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: 血液から分離されたインフルエンザ菌の解析, 秋田県健康環境センター年報, **7**, 2011, 67-69.
- 7) Bruce MG, Deeks SL, Zulz T, Navarro C, Palacios C, Case C, Hemsley C, Hennessy T, Corriveau A, Larke B, Sobel I, Lovgren M, Debyle C, Tsang R, Parkinson AJ: Epidemiology of *Haemophilus influenzae* serotype a, North American Arctic, 2000-2005., Emerg Infect Dis., **14**, 1, 48-55, 2008
- 8) 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.
- 9) 生方公子, わが国における侵襲性感染症由来インフルエンザ菌の薬剤耐性化動向, Infectious Agents Surveillance Report, **31**, 4, 2010, 98-99.