


 原著

千葉県君津郡市で流行した百日咳症例の臨床的検討*

永井文栄^{1,2)} 石和田稔彦²⁾ 田島和幸¹⁾
河野陽一²⁾

要旨 当科で百日咳と診断した症例は2002年3例, 2003年2例であったが, 2004年57例, 2005年49例と2004~2005年に百日咳の流行を経験したので臨床的検討を行った。

典型的な痙咳発作や白血球数増多を認めた症例は一部であった。入院例は三種混合ワクチン(DPT)未接種児と気管支喘息児が多かった。DPT既接種児は症状が典型的でない例が多く, DPT未接種児への感染源となっていることが推測された。

はじめに

百日咳は乳児期早期に罹患すると重症化し, 致死的になりうる疾患である。日本では定点医療機関からの報告による感染症発生動向調査が行われており, 現行の三種混合ワクチン(DPT)の普及によって報告数は激減した¹⁾。しかし, 近年, 高いDPT接種率を維持する欧米諸国において百日咳患者数の増加が認められ, 再興感染症として注目されている^{2,3)}。

当科で百日咳と診断した症例は2002年, 2003年にはそれぞれ3例, 2例であったが, 2004年, 2005年にはそれぞれ57例, 49例と2004年から2005年に流行を経験したので臨床的検討を行った。

I. 対象

2004年1月から2005年12月までの2年間に

君津中央病院小児科を受診し, 臨床症状より百日咳が疑われ, 血清学的に百日咳と診断した106例を対象とした。それぞれの診療録より後方視的に年齢, DPT接種歴, 検査データ, 臨床症状などの記録を集計した。

II. 方法

1. 診断基準

血清学的には百日咳凝集素価(東浜株, 山口株)を測定し, DPT未接種児では山口株凝集素価が10倍以上を基準とした。DPT接種児では, 1) 単血清で山口株凝集素価が320倍以上⁴⁾, 2) 単血清で山口株/東浜株比が4倍以上⁵⁾, 3) ペア血清で山口株凝集素価が4倍以上上昇, あるいは, 同症状の家族が血清学的に百日咳確定例, のいずれかを満たすことを基準とした。

2. 統計

2群の有意差の検定にはt検定を用いた。

* A clinical study of pertussis in Kimitsu county, Chiba

Key words : 百日咳, 血清学的診断, 三種混合ワクチン, 気管支喘息

1) 国保直営総合病院君津中央病院小児科 Fumie Nagai, Kazuyuki Tashima

2) 千葉大学大学院医学研究院小児病態学 Fumie Nagai, Naruhiko Ishiwada, Yoichi Kohno
(〒299-0111 市原市姉崎 3426-3 帝京大学ちば総合医療センター小児科医局)

III. 結 果

106例のうちDPT未接種児は58例(55%)、DPT接種児は48例(うち1回接種2例、2回接種0例、3回接種5例、4回接種41例)であった。

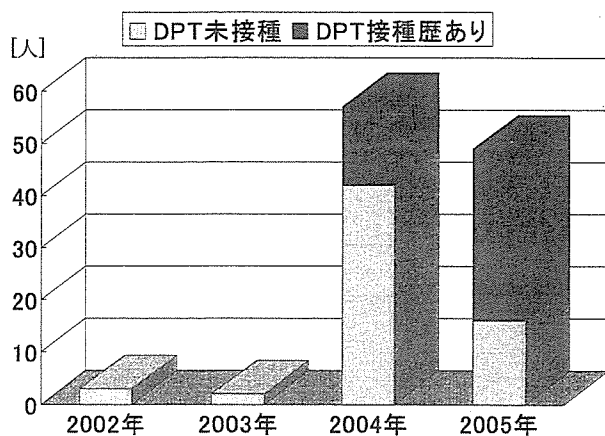


図1 百日咳症例の年別推移

1. 年別推移と月別推移

図1に2002～2005年の年ごとの患者数とDPT接種歴を示す。患者数は2002～2003年に比して2004～2005年に明らかな増加が認められた。2002～2003年はDPT未接種児が100%であったが、2004年は57例中42例(74%)、2005年は49例中16例(33%)であった。すなわち、年々DPT接種児の割合が増加していた。

図2に2004～2005年の月ごとの患者数を示す。2004年は7月が9例(16%)と最も多く、2005年は6月がピークで10例(20%)であった。

2. 年齢 (図3)

1歳未満の乳児が106例中32例(30%)と多く、内訳は0～3カ月14例(13%)、4～7カ月14例(13%)、8～11カ月4例(4%)であった。1～3歳は19例でDPTが4回完了していた児は9例(47%)、4～6歳は26例でDPT完了児は10例(38%)認められた。7～15歳では28例中22例

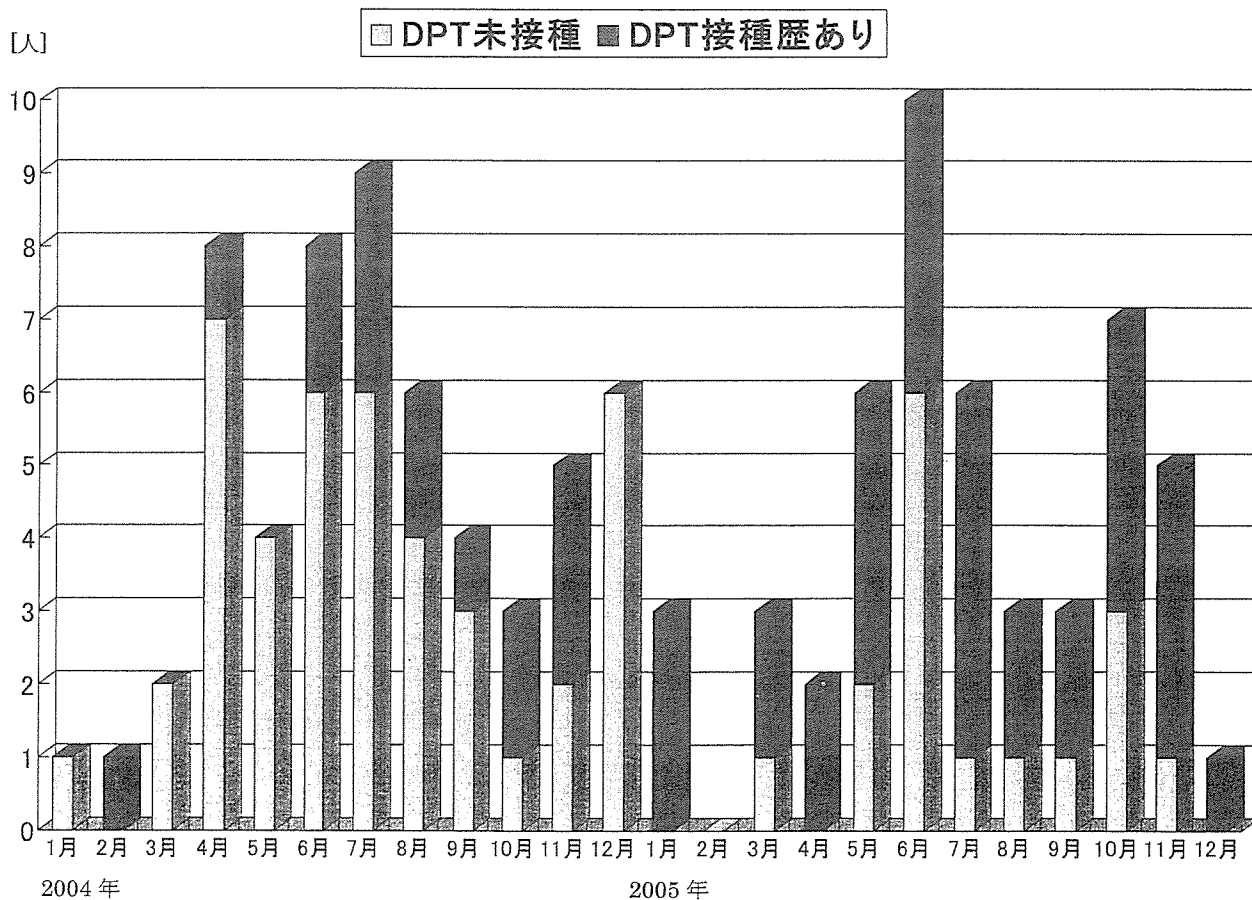


図2 百日咳症例の月別推移

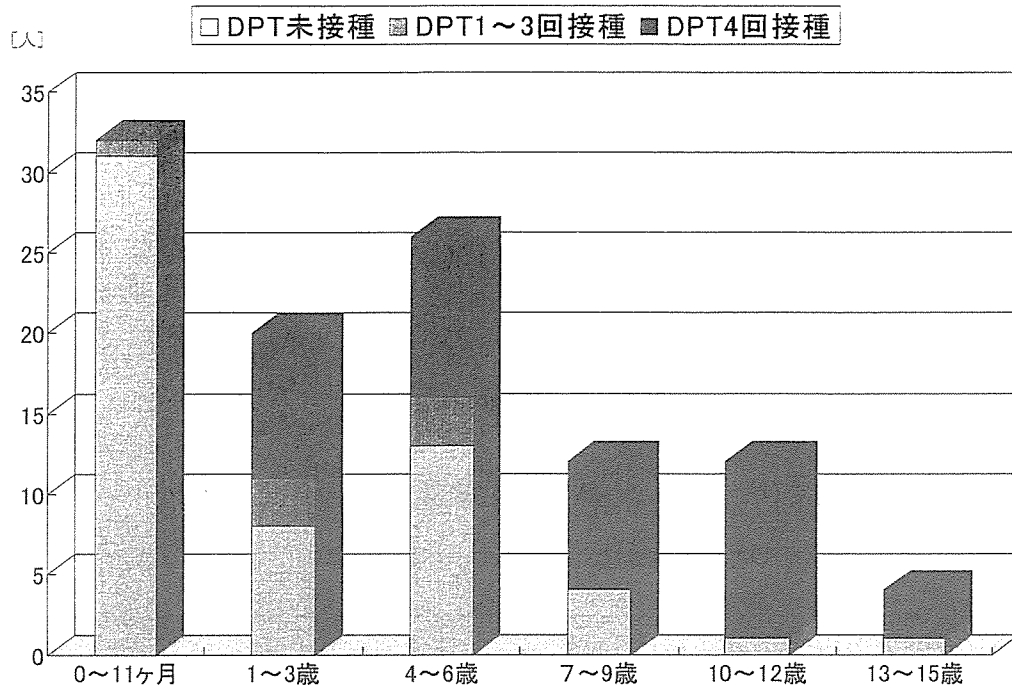


図3 百日咳症例の年齢分布

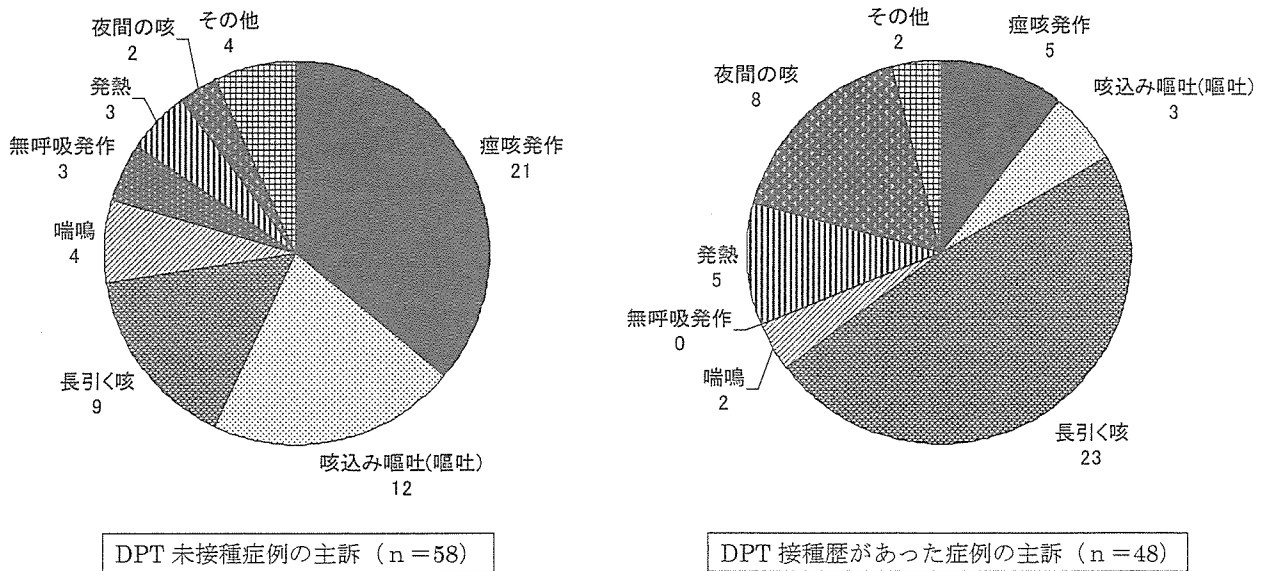


図4 百日咳症例のDPT接種歴別の主訴

(79%)がDPT完了児であり、幼児に比べ割合が高かった。

また、7歳以上の28例中14例(50%)で既往症に気管支喘息があった。

3. 主訴 (図4)

主訴がレプリゼ、発作性の咳嗽、連続性の咳嗽などという痙咳発作であった例は25% (26/

106)にすぎず、長引く咳が30% (32/106)と最も多かった。特にDPT接種歴があった児で痙咳発作を主訴として来院した症例は10% (5/48)のみであり、長引く咳48% (23/48)や夜間の咳17% (8/48)といった非典型的な症状が主訴であった症例の割合が高かった。なお夜間の咳は、入眠困難、咳込みによる目覚めといった「夜ねむれない」症

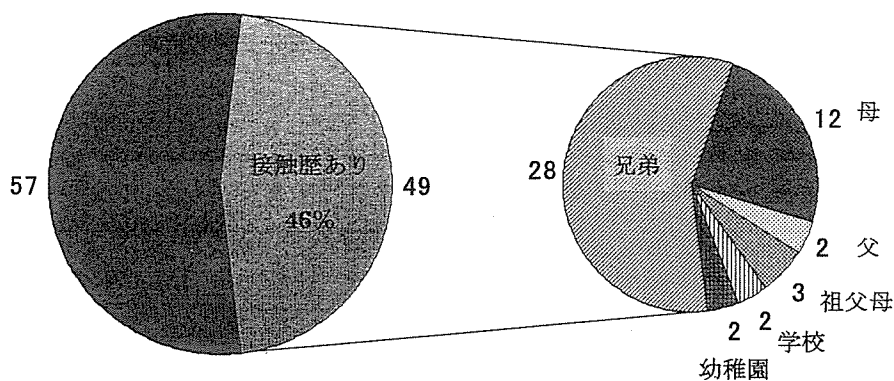


図 5 百日咳症例の接触歴

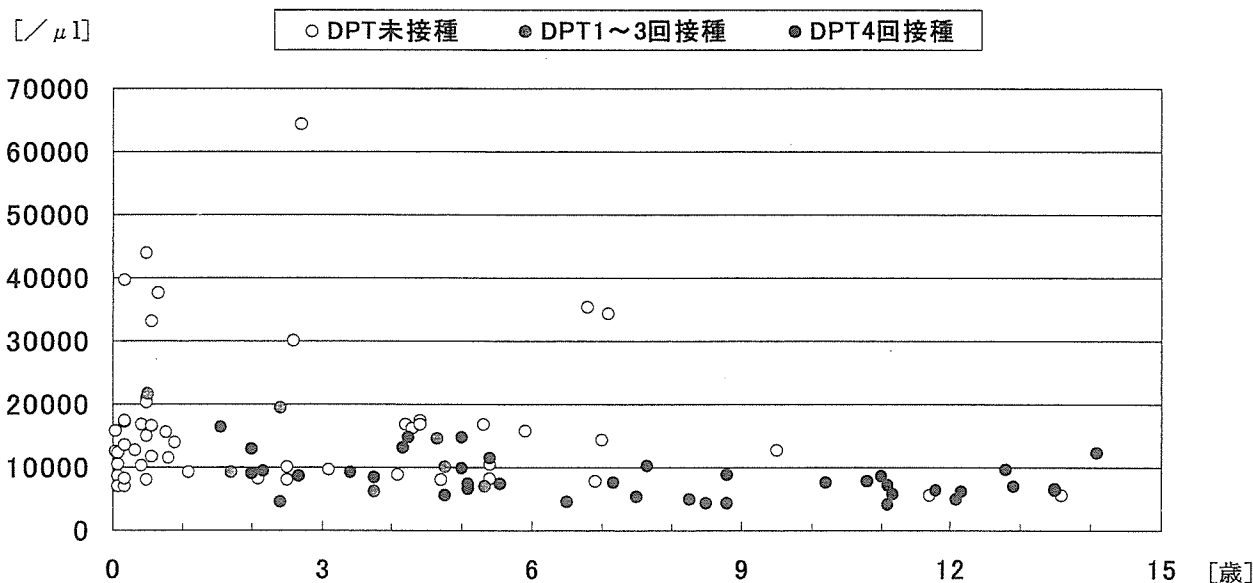


図 6 百日咳症例の DPT 接種歴・年齢と白血球数

状が主体であった。咳込み嘔吐や嘔吐が主訴であった症例は 15 例 (14% ; 15/106) あり、なかにはアセトン血性嘔吐症や脱水をきたしていた症例もあった。喘鳴を主訴とした症例は 6 例 (6% ; 6/106) であり、3 例は気管支喘息発作、3 例は乳児細気管支炎という初期診断名であった。無呼吸発作が主訴であった症例は 3 例認められ、痙攣発作が主訴であった症例中 7 例でも無呼吸が認められた。これら無呼吸発作を呈した 10 例 (9% ; 10/106) はすべて DPT 未接種児であった。年齢別内訳は 0~3 カ月 4 例、4~7 カ月 4 例、8~11 カ月 0 例、1 歳以上が 2 例であった。

4. 接触歴 (図 5)

明らかな接触歴があった症例は 106 例中 49 例 (46%) であった。咳症状の家族歴があった症例は

45 例、学校や幼稚園で頑固な咳の流行があった例は 4 例認められた。家族内感染は兄弟、両親、祖父母の順に多かった。

5. 血液検査所見 (図 6)

家族歴と症状より百日咳と診断した症例が 106 例中 9 例あり、血液検査を施行した症例は 97 例であった。初診時の白血球数が 15,000/μl 以上かつリンパ球百分率が 70% 以上であった症例は 97 例中 8 例 (8%) のみで、すべて DPT 未接種児であった。

DPT 未接種児の白血球数は 5,600~64,200/μl (平均 16,576/μl, 中央値 13,500/μl), DPT 接種児の白血球数は 4,100~21,600/μl (平均 8,826/μl, 中央値 7,700/μl) であり、有意に DPT 未接種児が多かった (p<0.01)。

リンパ球百分率はDPT未接種児で2~90% (平均57%), DPT接種児は8~67% (平均35%) であり, DTP未接種児で有意に高かった ($p < 0.01$).

CRPはDPT未接種児で0.03~5.11 mg/dl (平均0.56 mg/dl), DPT接種児では0.02~2.62 mg/dl (平均0.48 mg/dl) と, どちらも低値であり有意差は認めなかった ($p = 0.67$).

年齢別の白血球数は, 1歳未満は平均17,067/ μ l, 1~3歳は平均13,994/ μ l, 4~6歳は平均12,156/ μ l, 7~9歳は平均10,660/ μ l, 10~12歳は平均6,708/ μ l, 13~15歳は平均7,650/ μ lであった. 6歳以下と7歳以上では有意差 ($p < 0.01$) をもって7歳以上で白血球数が少なかった.

6. 入院例の検討

入院例は全症例中33例 (31%) あり, DPT接種歴別内訳はDPT未接種児が33例中24例 (73%), 1回接種児が1例 (3%), 3回接種児が2例 (6%), 4回接種児が6例 (18%) であった.

年齢別内訳は1歳未満が33例中19例 (58%), 1~3歳が7例 (21%), 4~6歳が2例 (6%), 7歳以上が5例 (15%) であった. 1歳以上の14例はすべての症例で何らかの合併症があり, 気管支喘息が9例, 肺炎が3例, 気管支喘息かつ肺炎が1例, クループ症候群1例であった.

1例 (11ヵ月女児, 早産・双胎・低出生体重児) で人工呼吸器管理を要した. 患児の入院時体重は6.9 kg, 白血球数は18,400/ μ lであった. DPTは未接種であり, 気管支喘息発作を合併していた.

脳炎・脳症発症例はなく, 全例後遺症なく退院した.

IV. 考 察

2004~2005年に当科で百日咳の流行を経験した. 百日咳はワクチンが普及している近年においても高感受者が蓄積することによって2~5年の周期で流行するといわれている^{6,7)}. 千葉県定点報告数を見ても2000~2003年に比して2004年に増加が認められ⁸⁾, 県内において同時期に流行があったと考えられる. また, 近年欧米諸国で百日咳が増加している理由として, 医師の百日咳に対する意識の向上等があげられている^{2,6,7)}. 百日咳

は「小児の病気」で, 「DPTによって制御」されており, DPTによる「免疫は生涯続く」といった間違った認識によって誤診・過小評価されていたといわれている^{2,9)}. 当科では2004年に引き続き2005年にも百日咳症例が多かったが, 2005年はDPT既接種児の診断割合が大幅に増加していた. これは当科の医師の百日咳に対する認識が高まったことによって, 非典型例に対しても百日咳を疑うようになったためと思われる. 百日咳症例の月別推移では, 従来報告³⁾と同様に夏に多く, 冬に少ない傾向にあった.

年齢別で見ると, 1歳未満の乳児が多く, DPT未接種児が多いことに起因していると考えられた. 年長児ではDPT完了児の割合が高かった. これは, ワクチンによる免疫賦与期間は数年であり^{7,10)}, 年長児で抗体価が低下していること¹¹⁾を反映していると考えられた.

百日咳に特徴的な痙咳発作を認めれば診断は容易であるが, 症状は年齢, DPT接種歴, 合併症の有無など多くの因子の影響で多彩である^{12,13)}. 今回の検討では, 典型的な痙咳発作を主訴に来院した症例は全症例中25%のみであった. 長引く咳などといった非典型的な症状である割合が高く, 特にDPT接種児では岡田¹³⁾やLieseら¹⁴⁾も指摘しているように症状が非典型的であった. 医師が百日咳を疑い, 連続性の咳, 咳込み後の嘔吐や鳴咽, 夜間に目立つ咳, 入眠困難, 咳込みによる覚醒の有無などといった咳の性状を詳細に聴取することが診断上大切である. また, 喘鳴を主訴とした症例も認められ, 気管支喘息発作や細気管支炎の鑑別に百日咳も考慮する必要があると考えられた^{15,16)}.

百日咳は非常に伝染性が強く家族内曝露による感染率は80%といわれている⁷⁾. したがって, 接触歴を聴取することも診断の一助となる^{9,13)}. われわれの検討では兄弟に咳症状が認められた例が最も多く, 学校や幼稚園で頑固な咳嗽が流行しているとの話もあった. そういった場所で百日咳が流行し, 家庭に持ち帰って家族内感染が引き起こされると考えられる. 家庭内にDPT未接種乳児がいれば感染し重症化する危険がある. 米国小児科学会は百日咳患者との濃厚接触者 (すべての家族お

よび託児所関係者など) に対してはエリスロマイシンの予防内服を勧告している¹⁷⁾が、わが国には化学予防の指針は存在せず、保険適応もないのが現状である。

血液検査所見の検討では、DPT 未接種乳児は白血球数が増多している症例が多く、CRP は陰性から弱陽性であった。ただし、白血球数増多がない症例もみうけられた。DPT 接種児では小児呼吸器感染症診療ガイドライン 2004 にもあるように白血球数やリンパ球百分率の増多はないことが多い¹²⁾。今回のわれわれの検討でも DPT 接種児では DPT 未接種児に比べ白血球数・リンパ球百分率とも有意に低かった。また、年長児では DPT 接種歴にかかわらず、白血球数増多が認められない症例が多かった。

以上のように、DPT 接種児や年長児では痙咳発作やリンパ球増多による白血球数上昇が典型的でない例が多く、診断は容易ではなかった。呼吸器症状がある患者では、百日咳も念頭において症状や接触歴などを詳細に聴取することが診断に有用であった。

入院例は 31%あり、DPT 未接種乳児が主体であった。1 歳以上で入院となった症例は全例合併症があり、乳児期以降は百日咳のみで重症となる割合が低いことを反映している。

また、年長児の百日咳症例では既往症に気管支喘息があった症例が 50%と多く、入院例においても気管支喘息発作合併例が多かった。百日咳は喘息発作の増悪因子であり、気管支喘息児では百日咳が重症化するといわれている^{15,18,19)}。気管支喘息発作が長引く場合や咳込みが強い場合などは百日咳も考慮する必要があるだろう。

今回われわれの検討では、いくつかの文献を参考とし百日咳の診断に凝集素価による血清学的診断法を用いた。百日咳の確定診断は百日咳菌の分離によるが、百日咳菌は発症後 3 週間以上経過した場合、抗菌薬の前投与があった場合、DPT 接種歴があった場合などでは分離率が低下する¹⁷⁾。米国小児科学会は発症から 4 週間以内(咳嗽から 3 週間以内)ならば培養と PCR が診断に適切で、咳嗽が 3~4 週間続いているときには PCR と血清学的検査、咳嗽が 4 週間以上続いていた場合は血

清学的検査のみ施行することを推奨している²⁾。百日咳を疑った症例に対しては積極的に培養検査を行うべきであるが、DPT 既接種例や臨床経過の長い例などでは、血清学的診断が主体となる。血清学的検査のなかでは凝集素価測定が古くから広く利用されているが感度は 50~60%と低い^{20,21)}。ペア血清で 4 倍以上の上昇が認められれば特異度は高いが、単血清でのカットオフ値の基準はない。今後、抗体価の基準の標準化が望まれる。

ま と め

2004~2005 年、当科では例年にない多数の百日咳症例を経験した。リンパ球増多を伴う白血球数の増多が典型的ではない例が多かった。入院例の主体は DPT 未接種児でありワクチンの重要性を再認した。しかし、DPT 既接種児でも百日咳症例はあり、症状が典型的でない例も多く DPT 未接種児への感染源となっていると推測された。咳を主訴に来院した患者や発作が遷延する気管支喘息患者では、百日咳を疑い咳の性状や家族歴を詳細に聴取することが診断の一助となると考えられた。


文 献

- 1) 感染症研究所感染症情報センター：百日咳 1997-2004. IASR 26 : 61-62, 2005
- 2) Hewlett EL, et al : Pertussis-Not just for kids. N Engl J Med 352 : 1215-1222, 2005
- 3) Tanaka M, et al : Trends in pertussis among infants in the United States 1980-1999. JAMA 290 : 2968-2975, 2003
- 4) Galazka AM : Pertussis. The Immunological Basis for Immunization Series (WHO) 4 : 1-20, 1993
- 5) 梶ヶ谷保彦, 他 : 最近 10 年間に経験した小児百日咳菌感染症 154 例の臨床的検討. 小児科臨床 56 : 385-388, 2003
- 6) Cherry JD : The epidemiology of pertussis : a comparison of the epidemiology of the disease pertussis with the epidemiology of *Bordetella pertussis* Infection. Pediatrics 115 : 1422-1427, 2005
- 7) Long SS : Nelson textbook of pediatrics. 17th ed (Behrman RE, et al), WB Saunders,

- Philadelphia, 2004, 908-912
- 8) 千葉県衛生研究所感染症学研究所 (千葉県感染症情報センター) 千葉県定点あたり報告数
 - 9) Deeks S, et al : Failure of physicians to consider the diagnosis of pertussis in children. Clin Infect Dis 28 : 840-846, 1999
 - 10) Wirsing von Konig CH, et al : Pertussis of adults and infants. Lancet infect Dis 2 : 744-750, 2002
 - 11) Konda T, et al : Distribution of pertussis antibodies among different age groups in Japan. Vaccine 20 : 1711-1717, 2002
 - 12) 上原すゞ子, 砂川慶介(監) : 百日咳. 小児呼吸器感染症診療ガイドライン2004, 日本小児呼吸器疾患学会/日本小児感染症学会, 東京, 2004, 66-69
 - 13) 岡田賢司 : DPT 既接種者の百日咳. 小児内科 36 : 215-219, 2004
 - 14) Liese LG, et al : Clinical and epidemiological picture of *B pertussis* and *B parapertussis* infections after introduction of acellular pertussis vaccines. Arch Dis Child 88 : 684-687, 2003
 - 15) 清益功浩, 他 : DPT 接種歴があって百日咳に罹患した気管支喘息児の2例. 日小ア誌 17 : 526-529, 2003
 - 16) 志村直人, 他 : 細気管支炎と診断された新生児・乳児の百日咳. 小児科臨床 57 : 2105-2108, 2004
 - 17) American Academy of Pediatrics : Pertussis. Red Book, 26th ed, 472-486, 2003
 - 18) 森川昭廣, 西間三馨(監) : 小児気管支喘息の危険因子とその予防. 小児気管支喘息治療・管理ガイドライン2005, 日本アレルギー学会, 東京, 2005, 44-63
 - 19) Williams WO : Long-term sequelae of whooping cough. JRSMB 78 : 707-709, 1985
 - 20) 比企野紀子 : ELISA 法による, 百日咳抗 LPF-HA, 抗 F-HA 抗体価の測定に関する研究. 日児誌 88 : 2609-2620, 1984
 - 21) 井関幹朗 : 百日咳患者に於ける血清抗 F-HA 抗体に関する研究. 日児誌 87 : 1046-1055, 1983

(受付 : 2006 年 8 月 9 日, 受理 : 2006 年 8 月 31 日)

* * *

 ライフサイエンス出版

TEL (03) 3664-7900 (代表)

【禁 無断転載・複製】

アマンタジン耐性株の流行

齋藤玲子 李 丹娟 鈴木康司 鈴木 宏

さいとう れいこ, り だんじゅあん, すずき やすし, すずき ひろし: 新潟大学大学院医歯学総合研究科 国際感染症医学講座 公衆衛生学分野

● 要約

2004年以降, アジアを中心にアマンタジン耐性 A 香港型 (H3N2) インフルエンザが急増している。日本・米国でも 2005~06 年シーズンはアマンタジン耐性インフルエンザが流行の主流を占めた。世界的な広がりをみせはじめた耐性インフルエンザ株の趨勢が注目される。

● はじめに

インフルエンザの治療には M2 阻害薬とノイラミニダーゼ阻害薬が有効である。本邦では M2 阻害薬としてアマンタジン (シンメトレル®) が使用されている。中国で近年ヒトの A 型インフルエンザのアマンタジンに対する耐性化が急速に進行し, 米国においても急増が報告された。本稿では昨今のアマンタジン耐性株流行について, 本邦の状況も含めて報告する。

● 従来までのアマンタジン耐性株頻度

M2 阻害薬であるアマンタジンは, A 型インフルエンザの予防・治療に有効である。本邦では 1998 年に保険適用となった。耐性化はアマンタジンが阻害するウイルス膜蛋白である M2 蛋白遺伝子膜通過部位の, 特定のアミノ酸変異 (26, 27, 30, 31 位) により生じる¹⁾。アマンタジンは安価で安定であるが, 投与後に約 1/3 の患者に耐性株が生じ, 副作用が多いことが問題である。アマンタジン耐性株は高齢者施設や家族などの密に接する集団での伝播感染が報告されていたが, 伝播力は感受性株に比べて弱いと

され²⁾, 市中においてアマンタジン耐性株のみの流行はこれまで起きなかった。一般にヒトの A 型インフルエンザ市中株中の耐性頻度は, 従来世界的に低く, 中国, 香港, 台湾では 2002 年まで 0~10%³⁾, 米国で 2004 年まで 1% 程度²⁾, 英国では 1968~99 年の間 1.5% であった⁴⁾。日本では当教室の調査にて新潟県新潟市で, 1997~98 年から 2004~05 年まで A 型インフルエンザ市中株中での頻度は 1~3%¹⁾, 奈良県でも 2001~02 年から 2004~05 年まで 0~5.3% と低いレベルであった⁵⁾。耐性株の伝播力は感受性株の 1/5 程度のため, アマンタジン耐性株が市中株に広く伝播しないと推測する数学モデルもあるが⁶⁾, 伝播力を減弱させるウイルス学的機序はまだわかっていない。

● アマンタジン耐性株の流行

1 CDC からの報告

昨年 (2005 年) 末, アマンタジン耐性株を取り巻く状況が一変した。2005 年 10 月, 米国疾病対策予防センター (CDC) が 2003 年を境にアジアで A 型インフルエンザ香港型 (A/H3N2 型) のアマンタジン耐性株が急増し, 中国, 香港では 2004 年に耐性株が 70% 前後を占めたと報告した³⁾。SARS と鳥インフルエンザの流行以降, 中国では市販の風邪薬に混合してアマンタジンが多用されたため, 耐性株が大量に出現したとされる。一方, 同報告では 2004 年まで韓国と日本を含めた他のアジア地域, ヨーロッパ, オセアニア, 南北アメリカでは市中株耐性頻度

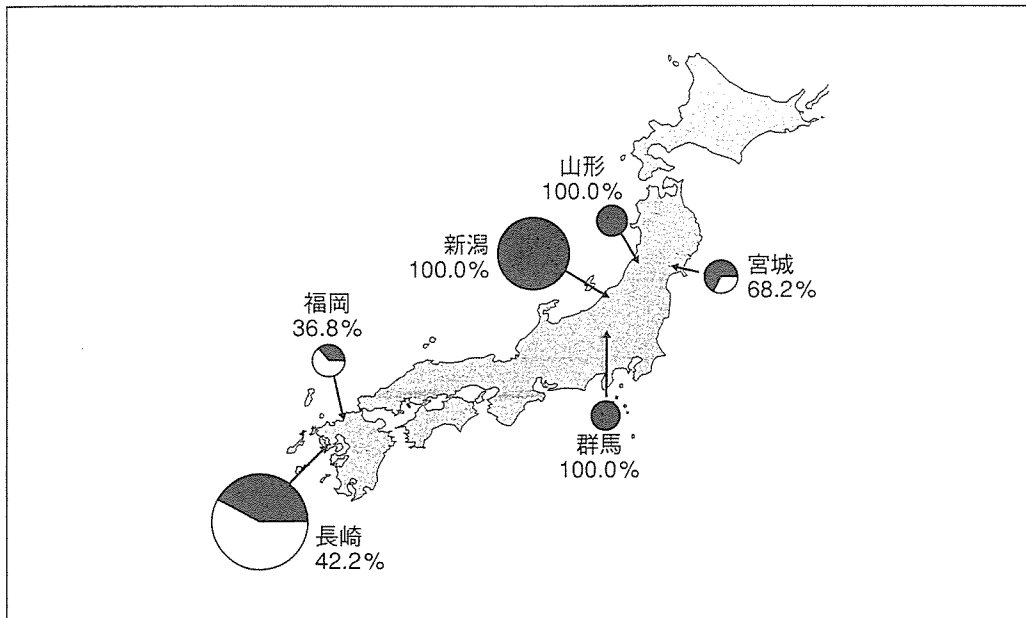


図 1 2005～06 年インフルエンザシーズンにおける本邦各地のアマンタジン耐性 A 香港型 (H3N2) インフルエンザ検出頻度

調査施設：新潟（よいこの小児科さとう）^a、長崎（長崎インフルエンザ研究会：田上病院，白髭内科医院，愛野記念病院，十善会病院，しもむらクリニック，石川内科クリニック）^a、宮城（庄司内科小児科医院）^b、山形（勝島小児科医院）^b、福岡（高崎小児科，しばおクリニック，しんどう小児科，やました小児科，横山小児科医院，あんどう医院）^b、群馬（川島内科クリニック）^{ac}

ウイルス分離：^a新潟大学大学院医歯学総合研究科 国際感染症医学講座公衆衛生学分野，^b独立行政法人国立病院機構 仙台医療センター・ウイルスセンター，^c原土井病院（アマンタジン耐性試験はすべて新潟大学公衆衛生学分野にて施行）

は低いままであり，地域差が生じていた。

2006 年初旬，米国 CDC は 2005～06 年シーズンに米国内 26 州で採取・分離された A 香港型インフルエンザの 209 株中 193 株 (92.3%) がアマンタジン耐性株であると，米国では当該シーズンのアマンタジン・リマンタジンの使用回避が通達された⁷⁾。

2 日本での現状

一方，日本の今季の流行状況であるが，2005 年 9 月，長崎県で起こった季節はずれの A 香港型インフルエンザ流行は耐性株で生じたことが，われわれの調査で判明した⁸⁾。その後，2005 年 12 月から 2006 年 4 月まで，われわれは全国 6 カ所（新潟，宮城，山形，群馬，長崎，福岡）でアマンタジン耐性株頻度調査を行った結果，A 香港分離株 354 件中 231 件 (65.3%) がアマンタジン耐性であった。新潟，山形，群馬の H3N2 株は 100% 耐性で，宮城，長崎，福岡は感受性株の混じった流行であり，地域別には九州 2 カ所の耐性頻度が低い傾向にあった（図

1)。同時流行の A ソ連型 (H1N1) に耐性株はなかった (0/61 株)。これらの患者にアマンタジン内服歴はなく，すべて耐性株の伝播感染によるものと思われる。同じように横浜市，奈良県でも高率に耐性株が検出されているとのことである（私信）。日本の感染症発生動向調査によると，今シーズンのインフルエンザ流行状況は過去 10 年間では中程度であった (<http://idsc.nih.gov/idwr/kanja/weeklygraph/01flu.html>)。日本全体で，最終的にどの程度耐性株が蔓延したのか，これからの結果が待たれるが，われわれの解析からこれまでにないアマンタジン耐性株の大流行があったことは確かである。

3 アジアとヨーロッパにみる現状

当教室との共同研究で，ベトナムにおいてもアマンタジン耐性頻度調査を行った。市中株中のアマンタジン耐性 A 香港型はそれまでの 0～5% から 2005 年には 45% に上昇したことが判明した。この上昇は，ハノイ市，ホーチミン市，

西部高地で観察されており、ベトナム全土に及んでいると思われる。ミャンマー国ヤンゴン市でも2005年のH3N2株中にアマンタジン耐性株1件が検出された。ニュージーランドから遺伝子データベースに登録された株でも、アマンタジン耐性株が2005年に増加している。このため、このアマンタジン耐性株の大流行は世界的な規模で起こっていると考えられる。ヨーロッパでは2005～06年シーズンはB型とAソ連型(H1N1)の流行が主流で、A香港型は少数であり、今のところ耐性に関する情報は公開されていないものの、来シーズンはヨーロッパでもアマンタジン耐性株が流行を起こして問題となるかもしれない。

● アマンタジン耐性株のウイルス学的特徴

2004年以降、アジア・日本・北米で流行したアマンタジン耐性株にはウイルス学的な特徴がある。アマンタジン耐性化部位である膜通過部位の26, 27, 30, 31位のアミノ酸のうち、今回の株はほぼすべて31位アミノ酸がセリンからアスパラギンへと変異をもつことである。われわれは以前の調査で、アマンタジン耐性株の約7割が31位アミノ酸変異をもつことを突き止めているが、2005～06年の日本の耐性株は100%が31位変異をもち、米国、アジアの株も同じ変異をもち、特定のアミノ酸変異が異常な増加を示している^{3,7)}。われわれは、これらの株が耐性化を規定するM2遺伝子とは別の遺伝子セグメントであるヘマグルチニン遺伝子(HA)に特定のアミノ酸変異をもち、樹形図上一つのグループに属することを明らかにした⁸⁾。2005年にベトナムで採取された耐性株や、遺伝子データベースに登録された米国、ニュージーランドの耐性株もすべて同じHA遺伝子の特徴をもつ。このため、この特定のHA抗原性をもつグループが何らかの機序でアマンタジン耐性を獲得し(逆も考えられる)、アジアから各国へ広がったものと考えられる。伝播率を飛躍的に向上させたのは、このHA遺伝子の変化が原因であるのかもしれない。

同様の現象は高病原性鳥インフルエンザA(H5N1)でもみられている。2003～04年にタイ・ベトナム・カンボジアでトリ、ヒトに感染したA(H5N1)はすべて31位の変異をもつアマンタジン耐性株で、HA遺伝子に特定の変異をもつ。このため、このHA遺伝子変化がA香港型(H3N2)とA(H5N1)とに共通し、耐性株を蔓延させた可能性がある。

● おわりに

2005～06年、日本、米国でアマンタジン耐性インフルエンザがこれまでにみられない大流行を起こした。米国は、アマンタジン使用規制を2006～07年まで延長した⁹⁾。なお、アマンタジン耐性株の臨床経過はアマンタジン投与のない場合、通常インフルエンザと同様である。耐性との判断は実験室レベルであり、それが臨床での結果と必ずしも一致しないことは細菌感染でも知られていることである。耐性株に対してアマンタジンが本当に臨床的に無効であるのかどうか、今後の多数の症例からの解析が待たれる。アマンタジン耐性株が2006～07年も流行するのか、今後もアマンタジン耐性モニタリングを継続して本薬剤の使用を考慮すべきと思われる。

文献

- 1) Suzuki H, Saito R, Masuda H, Oshitani H, Sato M, Sato I. *J Infect Chemother* 2003; 9: 195-200.
- 2) Hayden FG. *N Engl J Med* 2006; 354: 785-8.
- 3) Bright RA, Medina MJ, Xu X, et al. *Lancet* 2005; 366: 1175-81.
- 4) Tooley P. *Lancet* 2002; 360: 1703-4 (author reply 1704).
- 5) Kitahori Y, Nakano M, Inoue Y. *Jpn J Infect Dis* 2006; 59: 197-9.
- 6) Stilianakis NI, Perelson AS, Hayden FG. *J Infect Dis* 1998; 177: 863-73.
- 7) Bright RA, Shay DK, Shu B, Cox NJ, Klimov AI. *JAMA* 2006; 295: 891-4.
- 8) Saito R, Li D, Shimomura C, et al. *Tohoku J Exp Med* 2006; 210: 21-7.
- 9) Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR* 2006; 55: 24-30. (Also available at <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/rr/rr5510.pdf>)

綜合臨牀 第55巻第12号
(平成18年12月1日発行 別刷)

耐性ウイルスの現状と展望

Present and future provision for antiviral resistant influenza

齋藤 玲子
SAITO Reiko

鈴木 宏
SUZUKI Hiroshi

永 井 書 店

耐性ウイルスの現状と展望

Present and future provision for antiviral resistant influenza

特集

齋藤 玲子 鈴木 宏*

SAITO Reiko SUZUKI Hiroshi

2006-2007インフルエンザ対策

Key words M2阻害剤 ノイラミニダーゼ阻害剤 薬剤耐性インフルエンザ
伝播感染

インフルエンザの治療には M2阻害剤とノイラミニダーゼ阻害剤が有効である。本邦では M2阻害剤としてアマンタジン(シンメトレル®)とノイラミニダーゼ阻害剤としてザナミビル(リレンザ®)およびオセルタミビル(タミフル®)が使用されている。2003年に始まった高病原性鳥インフルエンザ A/H5N1の流行を受け、インフルエンザ世界大流行(パンデミック)の懸念が高まっている。パンデミック対策として抗インフルエンザ剤の備蓄が始まっているなか、薬剤の効果を減弱させてしまう耐性インフルエンザは大きな問題である。そのなかで2005~06年はアマンタジン耐性 A 香港型(H3N2)インフルエンザの大流行がみられ話題となった。本稿では M2阻害剤と NA 阻害剤それぞれの耐性ウイルスの出現状況と今後の展望を述べる。

M2 阻害剤(アマンタジン)耐性

M2阻害剤であるアマンタジンは、A型インフルエンザの予防・治療に有効である。A型インフルエンザ膜表面の水素イオンチャンネルである M2蛋白を阻害して薬理作用を示す。本邦では1998年に保険適用となった。アマンタジンは安価で安定であるが、投与後、約1/3の患者で耐性株が生じ、副作用が多いことが問題である¹⁾。耐性化はアマンタジンが阻害する M2蛋白遺伝子膜通過部位の特定のアミノ酸変異(26, 27, 30, 31位)により生じる。このアミノ酸変化によりすべての A 型サ

ブタイプ(A/H1N1, A/H3N2, A/H5N1, A/H9N2など)がアマンタジン耐性となる。なお、B型インフルエンザには BM2蛋白という同様の膜チャンネル蛋白が存在するが、分子構造が異なるためアマンタジンは作用せず有効性はない。アマンタジン耐性株は自然条件では非常に少ない割合で感受性株に混在し、薬剤の投与による選択圧で優勢になると考えられる。しかしながら、アマンタジン耐性株の人から人への伝播力は感受性株に比べて弱いとされ²⁾、これまで高齢者施設や家族などの密に接する集団での伝播感染が報告されるのみで、市中においてアマンタジン耐性株のみの流行は起きていなかった。このため、一般に市中株中の耐性頻度は世界的に低く 0~10%程度に留まっていた^{2)~4)}。日本でも当教室の調査では新潟県新

新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染症医学講座公衆衛生学分野 講師 *教授

表1 新潟市内アマンタジン耐性頻度の経時的推移と本邦におけるアマンタジン，オセルタミビル処方推定量

インフルエンザ シーズン	アマンタジン耐性/検査数(%)		アマンタジン処方推定量 ×1,000(人)	オセルタミビル処方推定量 ×1,000(人)
	A/H1N1	A/H3N2		
1997-1998	0/0(0.0)	0/33(0.0)	0 ¹⁾	0
1998-1999	0/0(0.0)	0/22(0.0)	677	0
1999-2000	1/74(1.4)	3/67(4.5)	1,180	0
2000-2001	0/67(0.0)	0/13(0.0)	765	487 ²⁾
2001-2002	0/59(0.0)	1/44(2.3)	1,101	2,106
2002-2003	0/0(0.0)	2/178(1.1)	2,739	7,145
2003-2004	0/0(0.0)	1/167(0.6)	291	5,711
2004-2005	0/0(0.0)	1/142(0.7)	164	8,942
2005-2006	0/51(0.0)	101/101(100.0)	110	7,086

アマンタジン耐性株調査施設：よいこの小児科さとう，新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染症医学講座公衆衛生学教室

1)1998年11月 A 型インフルエンザへ追加認可 2)2001年2月 A・B 型インフルエンザへ認可

潟市の A 型インフルエンザ市中株耐性頻度は 2004～05年シーズンまで 1～4%程度であった(表1)。アマンタジンの処方量は2002～03年シーズンの約300万人をピークとして減少傾向にあり，現在はインフルエンザへの主流処方薬はオセルタミビルに変わっている。一方で，処方量極期の日本のアマンタジン処方量に対して市中株耐性率が低いことが，翻ってアマンタジン耐性株の伝播が少ないことを裏付けている。なお，アマンタジン耐性株の伝播力がなぜ感受性株に比べて低いのかウイルス学的な機序はわかっていない。

2005年末，アマンタジン耐性株を取り巻く状況が一変した。2005年10月，米国疾病対策予防センター(CDC)が2003年を境にアジアで A 型インフルエンザ香港型(A/H3N2型)のアマンタジン耐性株が急増し，中国，香港では2004年に耐性株が70%前後を占めたと報告した³⁾。SARS と鳥インフルエンザの流行以降，中国では市販の風邪薬にアマンタジンが混合され多用されたため耐性株が大量に出現したとされる。

2006年初旬，米国 CDC は2005～06年シーズンに米国内26州で採取・分離された A/H3N2の209株中193株(92.3%)がアマンタジン耐性株であるとし，米国では当該シーズンの M2阻害剤の使用回避が通達された⁵⁾。

日本では，2005年9月，長崎県で起こった季節はずれの A/H3N2インフルエンザ流行がアマンタ

ジン耐性株で生じたことがわれわれの調査で判明した⁶⁾。その後，2005～06年冬に全国6ヵ所(新潟，宮城，山形，群馬，長崎，福岡)でアマンタジン耐性株頻度調査を行ったところ，A/H3N2分離株354件中231件(65.3%)がアマンタジン耐性であった(表2)。新潟，山形，群馬の A/H3N2株は100%耐性，宮城，長崎，福岡は感受性株の混じった流行であり，地域別には九州2ヵ所の耐性頻度が低い傾向にあった。同時流行の A ソ連型(H1N1)にアマンタジン耐性株はなかった(0/61株)。これらの患者にアマンタジン内服歴はなく，すべて耐性株の伝播感染によるものと思われた。年齢層も2ヵ月児から106歳までと幅広く，アマンタジン耐性株があらゆる年齢層に伝播罹患していることが判明した。臨床経過については，われわれの調査では初診時の症状にアマンタジン耐性株と感受性株に違いはなかったが，薬剤投与の効果については現在解析中である。調査患者の1名に渡航歴があり，韓国から長崎へ2005年12月下旬に戻った1日後にアマンタジン耐性株によるインフルエンザを発症しており，交通機関での感染も含め韓国でもアマンタジン耐性インフルエンザが流行していた可能性が示唆された。本邦では横浜市，奈良県でも高率に耐性株が検出されたとの報告があり，われわれの調査と合わせ，2005～06年シーズンは日本中でこれまでにないアマンタジン耐性株の大流行があったことは確かである。

表2 2005～06年シーズン本邦6県におけるアマンタジン耐性頻度と、耐性株罹患患者の年齢、性比

県	ウイルス分離株数/ 調査サンプル数	アマンタジン耐性/検査数				アマンタジン耐性株罹患患者	
		A/H1N1	(%)	A/H3N2	(%)	年齢(歳) 平均(範囲)	性比(%) 男性の割合
宮城	22/22	0/0	(0.0)	15/22	(68.2)	21.3(1-74)	54.5
山形	18/18	0/0	(0.0)	18/18	(100.0)	3.5(0.4-8)	38.9
新潟	152/426	0/51	(0.0)	101/101	(100.0)	5.4(0.2-15)	52.6
群馬	17/28	0/3	(0.0)	14/14	(100.0)	21.2(1-58)	58.8
福岡	20/20	0/1	(0.0)	7/19	(36.8)	8.6(1-35)	45.0
長崎	186/236	0/6	(0.0)	76/180	(42.2)	40.5(5-106)	53.8
計	415/750	0/61	(0.0)	231/354	(65.3)	22.7(0.2-106)	52.5

調査施設：新潟(よいこの小児科さとう) a, 長崎(長崎インフルエンザ研究会：田上病院, 白髭内科医院, 愛野記念病院, 十善会病院, しもむらクリニック, 石川内科クリニック) a, 宮城(庄司内科小児科医院) b, 山形(勝島小児科医院) b, 福岡(高崎小児科, しばおクリニック, しんどう小児科, やました小児科, 横山小児科医院, あんどう医院) b, 群馬(川島内科クリニック) a, c

ウイルス分離施行施設：a 新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染症医学講座公衆衛生学分野, b 独立行政法人国立病院機構仙台医療センター・ウイルスセンター, c 原土井病院

アマンタジン耐性試験はすべて新潟大学公衆衛生学分野にて施行

海外株では、当教室との共同研究より、2005年にベトナムでも A/H3N2 の耐性頻度がそれまでの 0～5% から 2005 年には 45% に耐性率が上昇したことが判明した。同年にミャンマーの株からもアマンタジン耐性株が検出された。最近、オーストラリアにある世界保健機関(WHO)インフルエンザ研究所が2005年アジア一円でアマンタジン耐性株が急増したことを報告した⁷⁾。これらはすべて日本、米国と同様 A/H3N2 の耐性株で、頻度はマカオ100%、シンガポール50%、マレーシア80%とアジアでは高かったが、オーストラリアでは32%と比較的低かった⁷⁾。ニュージーランドからもこの年に遺伝子データベース上へ耐性株が多数登録されており、アマンタジン耐性株の大流行は世界的な規模ではほぼ同時に起こっていると考えられる。ヨーロッパでは2005～06年シーズンはB型とAソ連型(H1N1)の流行が主流であったためか、今のところ耐性に関する情報はない。

なぜ、これまで伝播率の低かったアマンタジン耐性株が急に人から人への感染を起こしたのか、その原因は不明である。2005～2006年に世界で流行したアマンタジン耐性株にはウイルス学的な特徴があり、今回の株はM2蛋白にほぼすべて31位アミノ酸セリン→アスパラギン変異を持ち、他の変異は見られなかった³⁾⁵⁾⁶⁾。われわれはこのア

マンタジン耐性株が、耐性化を規定するM2遺伝子とは別のインフルエンザ遺伝子セグメントであるヘマグルチニン遺伝子(HA)に特徴的な二重のアミノ酸変化(193位セリン→フェニルアラニン, 225位アスパラギン酸→アスパラギン)が起こっていることを見出した⁶⁾。このHA遺伝子の変化は、日本とベトナムで検出された耐性株、遺伝子データベースに登録された米国とニュージーランドの2005～06年のアマンタジン耐性株すべてに見られており、オーストラリアのグループも同様の所見を報告している。このため、この特定のHA抗原性を持つグループが何らかの機序でアマンタジン耐性を獲得し(逆も考えられる)、アジアから各国へ広がったものと考えられ、それには特徴的なM2とHA遺伝子の共変化が関与している可能性がある。

同様の現象は、2003年よりアジアに端を発し世界中に広がった高病原性鳥インフルエンザA/H5N1でも見られている。2003～04年にタイ・ベトナム・カンボジアで鳥、人に感染し猛威をふるったA/H5N1は全例31位の変異を持つアマンタジン耐性株で、さらにはHA遺伝子に特定の変異を持つ⁸⁾。これらの国々ではアマンタジンは用いられおらず、中国で1990年代後半に鳥インフルエンザのコントロール目的で鳥に同薬剤が濫用さ

れ、その時出現した耐性株の伝播感染と言われる。なお、現在中東、アフリカにまで広がった A/H5N1 は HA 抗原上別のグループに属し、アマンタジン感受性である。M2 遺伝子と HA 遺伝子の特定のアミノ酸の共変化が A/H3N2 と A/H5N1 とに共通し耐性株の伝播率を飛躍的に向上させている可能性がある。



ノイラミニダーゼ阻害剤 (NA 阻害剤)

NA 阻害剤はシアル酸類似構造化合物でウイルス表面蛋白であるノイラミニダーゼ(NA)の作用を阻害して抗インフルエンザ作用を呈する。NA の活性部位は A 型、B 型インフルエンザともに共通の構造をもつため双方へ有効である。M2 阻害剤に比して副作用が少なく、耐性株の出現も低いとされるが、高価である。

NA 阻害剤の耐性化機序としては、① NA の変異、② HA の変異、③ HA と NA 双方の変異があげられる。しかしながら、臨床的に見られるのは NA 変異による耐性株である。M2 阻害剤ではアマンタジンとリマンタジンは相互耐性でサブタイプに関係なく一定のアミノ酸部位が変異するのに対して、NA 阻害剤のオセルタミビルとザナミビルでは耐性化するアミノ酸部位に違いが見られる。これは 2 つの薬剤の化学構造の違いに起因する。オセルタミビルは大きな側鎖を持つため NA 活性部位に作用する際、NA 自体がアミノ酸の構造変化を起こす必要に迫られる。しかし、ザナミビルはそのような側鎖を持たないためアミノ酸変化は起きない。この違いからオセルタミビルは NA 側のアミノ酸変異の影響を受けやすく、耐性が出現しやすいと考えられている。さらにオセルタミビルの耐性化アミノ酸変異はインフルエンザの型・亜型によって異なり、A 型 N1 (H1N1, H5N1) では H274Y、A 型 N2 (H3N2) では R292K, E119V, N294S、B 型では R152K, D198N の変異が多いと報告されている⁹⁾。

オセルタミビル耐性株はその伝播性、病原性共に感受性株に比べ非常に低いとされ⁹⁾、さらに欧米ではこれまで NA 阻害剤の使用量が非常に少なく(大多数の国で保険適用ではない)、臨床からの耐性株の報告は免疫不全の患者や白血病からの患者に限られていた¹⁰⁾。製品発売時の資料によるとオセルタミビルは投与後成人の 0.3%、小児は 4% に耐性株が出現するのみである⁹⁾。耐性出現は主に A 型であり、B 型は非常に少ない¹⁰⁾。ザナミビルでは免疫不全患者からの報告が 1 例あるのみである¹⁰⁾。

本邦では 2001 年の NA 阻害剤の保険認可後、オセルタミビルが毎年数百万人分処方され、世界一位の使用量である(表 1)¹¹⁾。日本人を対象とした研究では、タミフル投与後、H3N2 型の 18% に主に R292K 変異の耐性株出現が見られ¹²⁾、H1N1 型には 16.3% に H274Y 変異耐性株があり、欧米に比し高い頻度であった⁹⁾。使用量の違いに加え、欧米では小児の投与量を体重に応じたスライディングスケール方式(15kg 以下は 30mg, 15~23kg まで 45mg, 23~40kg まで 60mg, 40kg 以上は 75mg)で、日本では小児の投与量は体重あたり換算量を使っており(体重 37.5kg まで 2 mg/kg/日)、小児投与量が日本では少なく設定されているため、耐性が生じやすいのではないかと欧米の研究者から指摘されている⁹⁾¹¹⁾¹³⁾。

世界各国での市中株調査ではタミフル認可以前の検体からは耐性株が検出されていない⁹⁾¹¹⁾。しかしながら認可以降、2003~04 年シーズンに日本で採取された市中株 H3N2 型 1,180 株中 3 件(2.5%)が R292K 耐性株であり、オセルタミビル耐性株の伝播感染が考えられた¹³⁾。同時に調査した欧米の検体からは検出されなかったことから、日本の大量使用に関連ありとされた。最近発表された新しい報告によると、1999~2002 年の間に日本を含む世界各地から採取された野外株 2,287 株のうち 8 株(0.33%)がオセルタミビル耐性であった。これらの患者に薬剤投与歴はなく採取地も世界各地にわたっており、高消費国である日本の株も含

まれていた。耐性株のうち7株はこれまで報告のない新しいアミノ酸変異がNA遺伝子に見つかったため、投与後の患者からの伝播感染は考えにくく自然界に低くはあるがある程度の頻度でオセルタミビル耐性株が存在するのではないかと推察された¹¹⁾。



耐性ウイルス・コントロールの展望

歴史的に抗ウイルス剤の開発・多用とともにさまざまなウイルスで薬剤耐性が問題となった。1990年代はHIV耐性が最も深刻な問題であり、使用法の変化(多剤併用)や新薬開発に拍車をかけ、現在では米国の新薬許可に耐性試験が必須となった¹⁴⁾。この数年はインフルエンザウイルスの薬剤耐性が注目されており、なかでもアマンタジン耐性株の人から人への感染が大きな話題となった。鳥インフルエンザでは、2000年以降アジアで採取された株を中心にさまざまなサブタイプでアマンタジン耐性が増えていることが確認されており¹⁵⁾、さらに今回は人のA/H3N2にアマンタジン耐性が大量に出現した。双方とも中国での動物・人への濫用が原因とされており、今後は国際的な問題提起がなされ、HIVと同様に新薬開発・多剤併用が一層進む可能性がある。実験室レベルではアマンタジンとタミフルの併用で耐性出現が減少するとの報告があるものの、培養細胞レベルのため動物モデルも含めて今後検証が必要であろう¹⁶⁾。

米国では2005～06年シーズンの結果を受けてア

マンタジンの使用規制を2006～07年まで延長した¹⁷⁾。なお、アマンタジン耐性株、タミフル耐性株とも臨床経過に与える影響についての大規模調査はなされていない。これは欧米での臨床処方量が少なくこれまでデータがなかったことにも起因している。このため、抗インフルエンザ剤の高処方国である日本の臨床研究は注目されている。これまでの薬剤耐性の診断は実験室レベルであり、それが臨床での結果と必ずしも一致しない可能性があり、抗インフルエンザ剤耐性株に対して本当に臨床的に薬剤が無効であるのか今後多数の症例からの解析が待たれる。

来るインフルエンザ・パンデミックではA型インフルエンザのうち、どのサブタイプが新型インフルエンザとして人で大流行するのか現時点では予測が不可能である。過去にパンデミックを起こしたアジア風邪A/H2N2や、現在は低病原性である鳥インフルエンザのA/H9N2など、現在の人間に免疫がないサブタイプがパンデミックを引き起こす可能性があることが指摘されているが、正確な予測はできない。パンデミックの際、ワクチンが使用可能になるまで数ヶ月間を要すると言われ、流行の第一波は抗インフルエンザ剤に頼らざるを得ない。このため日本を含めた世界各国でオセルタミビルの備蓄が進んでいる訳であるが、耐性株は使用に際して大きな障害となりうる。今後、既存の抗インフルエンザ剤に対して常に耐性株を迅速に検出して監視し、その情報を臨床にフィードバックし、薬剤選択をする体制を整えていくべきであろう。

文 献

- 1) Suzuki H, Saito R, Masuda H, et al: Emergence of amantadine-resistant influenza A viruses: epidemiological study. *J Infect Chemother* 9: 195-200, 2003.
- 2) Hayden FG: Antiviral resistance in influenza viruses-implications for management and pandemic response. *N Engl J Med* 354: 785-788, 2006.
- 3) Bright RA, Medina MJ, Xu X, et al: Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* 366: 1175-1181, 2005.
- 4) Tooley P: Drug resistance and influenza pandemics. *Lancet* 360: 1703-1704; author reply 1704, 2002.
- 5) Bright RA, Shay DK, Shu B, et al: Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA* 295: 891-894, 2006.

- 6) Saito R, Li D, Shimomura C, et al : An off-seasonal amantadine resistant H3N2 influenza outbreak in Japan. *Tohoku J Exp Med* 210 : 21-27, 2006.
- 7) Barr IG, Hurt AC, Iannello P, et al : Increased adamantane resistance in influenza A(H3) viruses in Australia and neighbouring countries in 2005. *Antiviral Res* : (Epub ahead of print), 2006.
- 8) The World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerg Infect Dis* 11 : 1515-1521, 2005.
- 9) Ward P, Small I, Smith J, et al : Oseltamivir (Tamiflu) and its potential for use in the event of an influenza pandemic. *J Antimicrob Chemother* 55 Suppl 1 : i5-i21, 2005.
- 10) Gubareva LV : Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Res* 103 : 199-203, 2004.
- 11) Monto AS, McKimm-Breschkin JL, Macken C, et al : Detection of Influenza Viruses Resistant to Neuraminidase Inhibitors in Global Surveillance during the First 3 Years of Their Use. *Antimicrob Agents Chemother* 50 : 2395-2402, 2006.
- 12) Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, et al : Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir : descriptive study. *Lancet* 364 : 759-765, 2004.
- 13) Moscona A : Oseltamivir resistance - disabling our influenza defenses. *N Engl J Med* 353 : 2633-2636, 2005.
- 14) Richman DD : Antiviral drug resistance. *Antiviral Res* 71 : 117-121, 2006.
- 15) Ilyushina NA, Govorkova EA, Webster RG : Detection of amantadine-resistant variants among avian influenza viruses isolated in North America and Asia. *Virology* 341 : 102-106, 2005.
- 16) Ilyushina NA, Bovin NV, Webster RG, et al : Combination chemotherapy, a potential strategy for reducing the emergence of drug-resistant influenza A variants. *Antiviral Res* 70 : 121-131, 2006.
- 17) Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and Control of Influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 55 : 24-30 (Also available at <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/rr/rr5510.pdf>), 2006.



Rapid identification of nontypeable and serotype b *Haemophilus influenzae* from nasopharyngeal secretions by the multiplex PCR

Dewan S. Billal^a, Muneki Hotomi^a, Masaki Suzumoto^a,
Kazuma Yamauchi^a, Intetsu Kobayashi^b, Keiji Fujihara^a,
Noboru Yamanaka^{a,*}

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

^b Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories, Tokyo, Japan

Received 26 July 2006; received in revised form 13 October 2006; accepted 15 October 2006

KEYWORDS

Haemophilus influenzae;
Nontypeable;
Serotype;
Multiplex PCR;
Slide agglutination test

Summary

Objective: *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) is an important pathogen responsible for both invasive and non-invasive infectious diseases. While encapsulated type b strain recognized as a major cause of severe invasive diseases, nontypeable strains are the major causes of non-invasive infectious diseases. Detection of this pathogen from nasopharyngeal secretions (NPS) is important.

Methods: We developed a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for rapid identification of nontypeable and serotype b *H. influenzae* from nasopharyngeal secretions.

Results: A total 25 nasopharyngeal secretions were evaluated in this study. The multiplex PCR provided rapid and unequivocal results for determining either nontypeable or encapsulated typeable especially type b strains including a determination of β -lactamase productions.

Conclusion: The multiplex PCR based serotyping provided more reliable results than slide agglutination test (SAT) and is a valuable and expeditious method for identification of *H. influenzae* with determining capsular serotypes.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author at: Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Wakayama Medical University, 811-1 Kimiddera, Wakayama-shi 641-0012, Wakayama, Japan.
Tel.: +81 73 441 0651; fax: +81 73 446 3846.
E-mail address: ynobi@wakayama-med.ac.jp (N. Yamanaka).

1. Introduction

Haemophilus influenzae colonizes in the human nasopharynx and becomes a leading cause for a variety of infectious disease such as acute otitis

media (AOM), sinusitis, pneumonia, sepsis and meningitis [1–4]. The pathogens are classified into six encapsulated strains called typeable depending on the serologically distinct capsular polysaccharides (serotypes a–f) and non-capsulated/nontypeable strain. While encapsulated type b strain recognized as a major cause of severe invasive diseases such as meningitis and bacteremia, nontypeable strains are the major causes of non-invasive infectious disease such as otitis media [5,6].

Serotypes of *H. influenzae* have usually been determined by the slide agglutination test (SAT) with six specific antisera against each type of capsular polysaccharides. The test is easy and simple to be applied. However, the results are sometimes unreliable because of atypical agglutinations [7,8]. In the current pre-vaccination era, more exact procedures are required to determine either typeable strains, especially type b strain, or nontypeable strains for reducing risks of severe invasive infections caused by typeable strains among children and for further development of vaccine against nontypeable strains [9,10]. To determine typeable strains more clearly, recent studies focused on detections of *bexA* gene encoding common capsular polysaccharide sequences of *H. influenzae* [7,11–14].

In this study, we applied multiplex polymerase chain reaction (PCR) to determine nontypeable or encapsulated typeable strains and production of β -lactamase.

2. Material and methods

2.1. Strains

Seven encapsulated typeable *H. influenzae* strains (ATCC9327, ATCC9334, ATCC9007, ATCC9332,

ATCC8142, ATCC9833, one clinical isolate) and one nontypeable *H. influenzae* (ATCC49247) were used as positive controls in this study. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (ATCC25922) and *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) (ATCC49619 and BAA-3) were also used as negative controls (Table 1).

2.2. Samples

A total 25 nasopharyngeal secretions (NPS) were collected from children (12–48 months old) with acute otitis media at the outpatient clinic of Otolaryngology-Head and Neck Surgery of Wakayama Medical University Hospital. Nasopharyngeal secretions were collected by the suction with a fine, flexible plastic catheter (no. 5, French) and syringe. Informed consents were obtained from patient's parents or guardians prior to the collection of samples according to the institutional review board.

2.3. Identification of *H. influenzae*

The 100 μ l of NPS were cultured on chocolate agar plate and incubated at 37 °C for 24–48 h. *H. influenzae* strains were identified by colony morphology on the chocolate agar plates, no growth in blood agar plate, Gram's staining, catalase test and requirement of X and V factors. The growth of *H. influenzae* were semi-quantitatively determined as 1+, 2+ and 3+ that represent the growth in first, second and third quadrant of chocolate agar plate, respectively. Productions of β -lactamase were examined by nitrocefinase disc (Nippon Becton Dickinson Company Ltd., Tokyo, Japan). Serotypes of *H. influenzae* were determined by the slide agglutination test with six specific antisera against each type of capsular polysaccharides (Denka Seiken Co., Ltd., Tokyo).

Table 1 *H. influenzae* and other strains in this study

Strains	Serological agglutination test	β -lactamase	PCR			
			P6	bexA	typeb	TEM-1
<i>H. influenzae</i> ATCC 9327	Type a	–	+	+	–	–
<i>H. influenzae</i> ATCC 9334	Type b	–	+	+	+	–
<i>H. influenzae</i> ATCC 9007	Type c	–	+	+	–	–
<i>H. influenzae</i> ATCC 9332	Type d	–	+	+	–	–
<i>H. influenzae</i> ATCC 8142	Type e	–	+	+	–	–
<i>H. influenzae</i> ATCC 9833	Type f	–	+	+	–	–
<i>H. influenzae</i> clinical isolates	Type b	+	+	+	+	+
<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	Nontypeable	–	+	–	–	–
<i>S. aureus</i> ATCC 25922	N/A	N/A	–	–	–	N/A
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	N/A	N/A	–	–	–	N/A
<i>S. pneumoniae</i> ATCC BAA-3	N/A	N/A	–	–	–	N/A

N/A, not assessed.